



PLS – Formazione docenti – Incontro dell'11 gennaio 2017 in collaborazione con ANISN

COSTRUZIONE DI UN PLASMIDE RICOMBINANTE - TRASFORMAZIONE DI *Escherichia coli* – VISUALIZZAZIONE DEI CLONI RICOMBINANTI

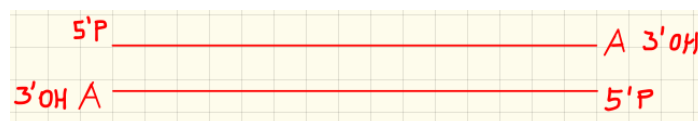
Attività 1 – Preparazione di un vettore ricombinante mediante reazione di ligasi plasmide + inserto

L'obiettivo di questa attività è inserire un frammento di DNA in un plasmide, o come si dice "clonare" un DNA in un vettore plasmidico.

I plasmidi sono molecole di DNA circolari, generalmente molto piccole (poche migliaia di coppie di basi (bp)) che si trovano praticamente in tutti i procarioti. I plasmidi si possono purificare facilmente e da decenni vengono usati come "vettori" artificiali di DNA. Infatti è relativamente semplice prendere il DNA di un plasmide, tagliarlo con uno o più enzimi di restrizione e saldarvi un frammento di DNA estraneo al plasmide, tagliato con gli stessi enzimi di restrizione utilizzati per digerire il plasmide, creando un plasmide "ricombinante". Da quando esiste la PCR non è più necessario tagliare vettori e inserti per clonare un frammento di DNA, ma si può appunto saldare direttamente il prodotto di PCR a un vettore plasmidico.

Questa operazione è esattamente ciò che viene descritto in questa attività.

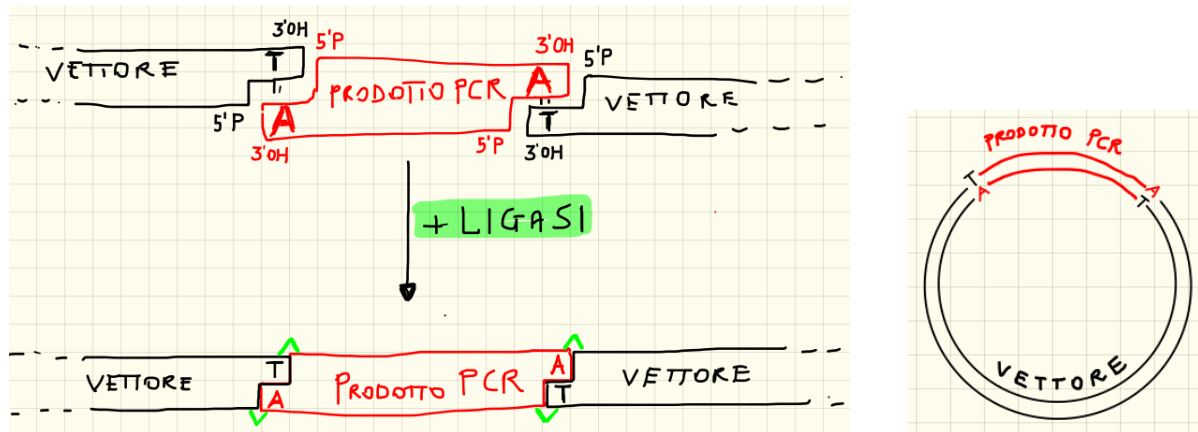
La particolarità del clonaggio di un prodotto PCR è che la *Taq* Polimerasi, l'enzima usato nella PCR, aggiunge ad ogni frammento di DNA amplificato una A all'estremità 3'OH, in modo tale che un qualunque frammento amplificato si può rappresentare in questo modo:



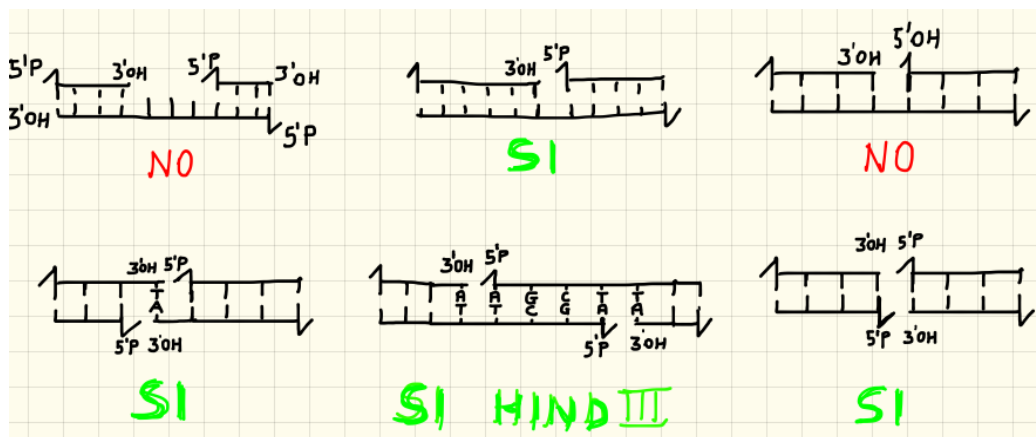
Per saldare in modo ottimale tali frammenti a un vettore plasmidico si usano plasmidi linearizzati contenenti una T che sporge al 3'OH di entrambi i filamenti del DNA del vettore. In questo modo quando i due DNA (frammento PCR e plasmide) vengono combinati, le basi A e T si associano in quanto complementari e creano una molecola "ricombinante".

Tale molecola però non è stabile perché i due frammenti (vettore e inserto) non sono legati covalentemente. Allo scopo si aggiunge alla miscela dei due DNA un enzima chiamato DNA ligasi proprio perché salda covalentemente le estremità 5'P con quelle 3'OH. Nella nostra attività useremo una DNA ligasi estratta dal batteriofago T4.

La figura seguente riassume l'azione della ligasi. In verde sono indicati i legami covalenti tra i gruppi 5'P e 3'OH del frammento di PCR e del vettore.



L'azione che la DNA ligasi compie avviene a livello della successione di desossiribosi e fosfati che si susseguono a formare i due filamenti antiparalleli di una doppia elica e richiede obbligatoriamente un gruppo 5'P **adiacente** a un gruppo 3'OH. Perché la saldatura sia effettiva è sufficiente che avvenga su un filamento. Nella figura che segue sono riportati alcuni esempi di situazioni in cui la DNA ligasi funziona e altri in cui non funziona.



Per l'attività verrà utilizzato un particolare vettore già linearizzato con estremità 3'OH T, che si chiama pGEM-T Easy. La mappa del plasmide è visibile alla fine della dispensa

1.1 Procedura per l'allestimento della reazione di ligasi tra vettore e frammento PCR

Ogni banco avrà a disposizione aliquote di sali 2X per la DNA ligasi, del vettore pGEM-T Easy, del frammento di PCR da clonare e di H₂O (che potrà servire o meno a seconda di come verrà realizzata la reazione di ligasi, vedi dopo e vedi le eventuali indicazioni degli istruttori). Il frammento di PCR, lungo 841 bp, è una regione dei geni ribosomali (rDNA) di *Saccharomyces cerevisiae*.



La reazione di ligasi va preparata in un tubo Eppendorf da 0.5 ml. Ciascuno contrassegni il proprio tubo con il numero del banco e una lettera (es. 1A, 1B, 2A, 2B, ecc.) e poi proceda come segue:

Tampone di reazione ligasi rapida 2X	5
Frammento PCR 5 ng/microlitro ca	2.5
DNA plasmide pGEM-T Easy, 12.5 ng/microlitro	2
DNA Ligasi T4 5U/microlitro	0.5
<hr/> Totale	<hr/> 10 microlitri

* l'aggiunta della Ligasi verrà fatta dagli istruttori

Incubare la reazione a temperatura ambiente per 1 h o comunque fino alla trasformazione.

Attività 2 – Trasformazione di *Escherichia coli*

La trasformazione dipende dalla capacità di una cellula del microorganismo di assorbire DNA dall'esterno, capacità che viene definita "competenza". La competenza può essere una condizione naturale, ad es. *Bacillus subtilis* - che è un Gram positivo - è competente per l'assorbimento di DNA in condizioni fisiologiche, a un certo stadio di crescita. Al contrario, *Escherichia coli* - che è un Gram negativo - non acquisisce mai naturalmente lo stato di competenza che deve essere indotto mediante specifici trattamenti in laboratorio.

Nell'attività descritta useremo cellule di *Escherichia coli* (un ceppo che si chiama DH5 α) che sono state rese competenti precedentemente, aliquotate e congelate a -80°C in attesa del loro utilizzo.

In sintesi, ciascuna trasformazione richiede di miscelare il DNA (la reazione di ligazione) alle cellule competenti; segue una incubazione in ghiaccio e poi un breve shock termico, quindi si trasferiscono le cellule in terreno ricco perché si riprendano e infine si piastrano su terreno selettivo.

Nello svolgere questa attività fate attenzione alle seguenti raccomandazioni:

cercate di lavorare in **condizioni di sterilità**, seguendo le raccomandazioni degli istruttori. Di regola ricordatevi di **non lasciare mai i tubi aperti**, di **usare puntali e/o pipette sterili** e di **cambiare puntale/pipetta ogni volta che eseguite una operazione**; **tenete sempre le cellule competenti in ghiaccio**. Sono molto sensibili al calore e si rovinano subito fuori dal ghiaccio. Quindi, riceverete l'aliquota di cellule competenti mettetela subito nel ghiaccio e aspettate che si sciolgano in ghiaccio senza prendere continuamente il tubo tra le mani per controllare.

2.1 Procedura per la trasformazione

Ogni banco avrà un'aliquota di cellule competenti di *E. coli* DH5 α sufficiente per più trasformazioni, delle provette sterili da 10 ml e una provetta Falcon da 50 ml con un'aliquota di terreno SOC. Ciascuno avrà infine il tubo della propria reazione di ligasi.



1. Contrassegnare una provetta da 10 ml con il codice della propria reazione di ligasi, aggiungervi **sterilmente** 0.9 ml di terreno SOC
2. **Banchi da 1 a 4** Contrassegnare una provetta con la sigla CT+
Banchi da 5 a 8 Contrassegnare una provetta con la sigla CT-
3. **Tutti i banchi**
Non appena le cellule competenti si saranno sciolte prelevare a turno 100 microlitri di cellule e trasferirle nel tubo eppendorf della propria reazione di ligasi mescolando brevemente e rimettere il tubo in ghiaccio.
4. **Banchi da 1 a 4**
A 100 microlitri di cellule aggiungere 2 microlitri del plasmide di controllo pUC19 (10 ng/microlitro) e incubare il tubo in ghiaccio. Questo campione costituisce il controllo positivo o CT+
Banchi da 5 a 8
Aggiungere a 100 microlitri di cellule 10 microlitri di H₂O e incubare in ghiaccio; questo campione costituisce il controllo negativo o CT-
5. Lasciare i tubi in ghiaccio almeno 20 minuti
6. Trasferire i tubi in un bagnetto a 42°C per 90 secondi (**precisi**).
7. Passati 90 secondi trasferire di nuovo i tubi in ghiaccio per un paio di minuti
8. Trasferire le cellule dai tubi nelle corrispondenti provette da 10 ml contenenti 0.9 ml di terreno SOC
9. Incubare le provette per 1 ora a 37°C con agitazione

Attività 3 – Preparazione delle piastre di terreno LB contenenti Ampicillina, IPTG e X-Gal

Le piastre serviranno a seminare e far crescere le cellule dopo la trasformazione.

Il terreno si chiama LB (Luria Broth) e contiene le componenti necessarie a far crescere le cellule contenenti il plasmide e a distinguere cellule con il plasmide ricombinante da quelle contenenti il plasmide senza inserto. Maggiori dettagli sulla funzione di IPTG e X-Gal saranno date durante la spiegazione dell'attività.

Ricetta per un litro di terreno LB per piastre:

Bacto Triptone	10 gr
Estratto di Lievito	5 gr
NaCl	10 gr
Agar	18 gr
H ₂ O	q.b. ad un litro

N.B. Lo stesso terreno può essere usato per crescere le cellule in liquido; in questo caso NON si mette Agar.



Il terreno va sterilizzato in autoclave (20 minuti a 118°C, 0.8 atm di pressione). Dopo la sterilizzazione va lasciato raffreddare fino a ca 50-55°C e poi vi si aggiungono (le aggiunte le faranno gli istruttori):

Ampicillina 100 microgrammi/ml concentrazione finale

IPTG 0.5 mM finale

X-Gal 40 microgrammi/ml finale

Dopo avere mescolato, si versa il terreno nelle piastre di Petri cercando di non formare bolle, che si possono nel caso rimuovere spostandole verso i bordi delle piastre con una punta sterile, oppure mescolando il terreno “disegnando” con la piastra sul banco un otto, oppure sfiammando con il Bunsen (gli istruttori vi faranno vedere se necessario).

Una volta solidificate, le piastre vanno fatte asciugare in stufa per eliminare la condensa.

Attività 4 – Piastramento delle cellule trasformate e selezione dei cloni ricombinanti

Il piastramento consiste nel depositare e far crescere le cellule trasformate con le miscele di ligasi su piastre contenenti il terreno solido selettivo LB descritto precedentemente.

Materiali

Ogni banco avrà piastre di terreno LB selettivo, anse monouso sterili, provette sterili da 10 ml, terreno SOC,

4.1 Procedura di piastramento

Ciascuno piastrerà la propria aliquota di cellule trasformate con la miscela di ligasi **due volte, vedi di seguito.**

1. recuperare le provette con le cellule dall'incubazione a 37°C (fine attività di trasformazione);
2. diluire 1 a 10 in terreno SOC le cellule in una seconda provetta sterile da 10 ml e contrassegnarla con il codice della miscela seguito da 10⁻¹ (es. 1A-10⁻¹);
3. contrassegnare il retro - non il coperchio - di due piastre di terreno LB con il codice della propria miscela di ligasi per una piastra e con il codice seguito da 10⁻¹ per la seconda piastra;
4. prelevare sterilmente 100 microlitri di cellule da una delle provette da 10 ml e depositarle al centro della piastra con il codice corrispondente;
5. estrarre l'ansa per il piastramento dalla confezione monouso fornita sul banco e “spatolare” cioè distribuire le cellule sulla piastra mentre con l'altra mano si fa girare continuamente la piastra fino a che tutto la sospensione cellulare non si è assorbita in modo uniforme al terreno della piastra;
6. ripetere il piastramento per l'altra provetta, prelevando sempre 100 microlitri e spatolandoli sulla piastra con il codice corrispondente;
7. spatolare anche 100 microlitri prelevati dalla provetta CT+ (banchi da 1 a 4) e 100 microlitri prelevati dalla provetta CT- (banchi da 5 a 8);
8. trasferire le piastre in un termostato a 37°C e incubare fino al giorno dopo.

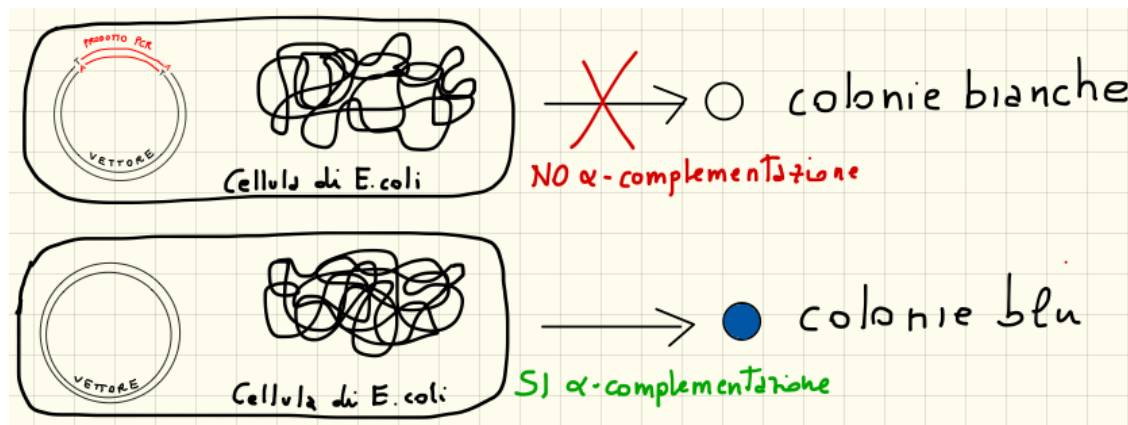


Risultati attesi e interpretazione

Durante l'attività verranno spiegate in dettaglio le caratteristiche del vettore e in particolare l' α -complementazione tra il gene portato dal vettore pGEM-T Easy (il frammento α della β -Galattosidasi) e quello portato dal ceppo DH5 α di *E. coli* utilizzato nella trasformazione (il frammento ω della β -Galattosidasi).

In sintesi:

- se la cellula viene trasformata dal vettore senza inserto avviene l' α complementazione e le colonie saranno colorate in blu perché ci sarà attività della β -Galattosidasi;
- se la cellula viene trasformata dal vettore con l'inserto (il frammento di PCR) l' α complementazione non avverrà perché nel vettore l'inserto interrompe il gene del frammento α -galattosidasi. Di conseguenza le cellule con il vettore + inserto formeranno colonie bianche in quanto prive di attività β -galattosidasi.



TERRENI E TAMPONI

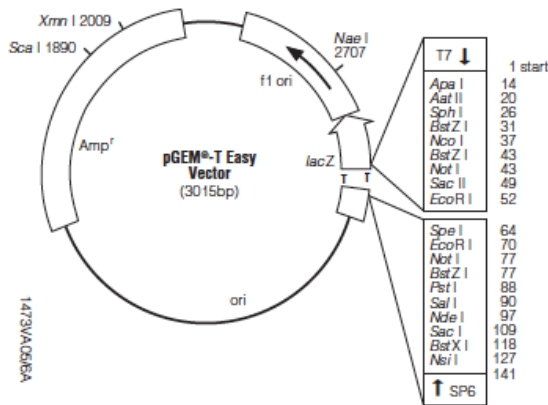
Terreno SOC	Tampone T4 DNA ligasi 2X (Rapid Ligation Buffer)
Bactotriptone 2%	Tris-HCl, pH 7.8 60 mM
Estratto di Lievito 0.5%	MgCl ₂ 20 mM
NaCl 10 mM	DTT (Ditiotreitolo) 20 mM
KCl 2.5 mM	ATP 20 mM
MgCl ₂ 10 mM	Polietilene Glicole (MW8000) 10%
MgSO ₄ 10 mM	
Glucosio 20 mM	
pH 6.8-7	



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
LABORATORIO DI BIOLOGIA SPERIMENTALE
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE
I - 27100 PAVIA (Italia) – Via Ferrata 9



pGEM®-T Easy Vector Circle Map and Sequence Reference Points



pGEM®-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β -lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3