



Biotechnology Explorer™

Kit di trasformazione batterica con pGLO™

Numero di catalogo
166-0003EDU

explorer.bio-rad.com

Conservare il kit a temperatura ambiente

La copia parziale o totale di questo manuale è consentita solo per lo svolgimento della lezione.

BIO-RAD

Assistenza tecnica per l'Italia.....Per gli U.S.A. 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723)

4006097

Cosa può insegnarci una medusa?

Una delle principali difficoltà che affrontano gli studenti ai loro primi approcci con le biotecnologie o la biologia molecolare consiste nel fatto che molti dei processi studiati non si possono visualizzare. Il programma “Biotechnology Explorer” propone una soluzione, che consiste in un modello basato su un gene appartenente ad una medusa bioluminescente e sulla proteina fluorescente verde, GFP (GFP=green fluorescent protein), prodotta a partire da esso.

La GFP emana luce verde brillante quando eccitata da radiazione ultravioletta (U.V.) emanata, p.es., da una lampada U.V. portatile (lampada da geologo).

Il gene codificante la GFP fu in origine isolato dal genoma della medusa *Aequorea victoria*. Esso venne in seguito modificato da una compagnia di biotecnologie, la Maxygen Inc. di Santa Clara, California.

Le modificazioni consistono in specifiche mutazioni nella sequenza del DNA, le quali aumentano considerevolmente la fluorescenza della GFP. Il gene mutato della GFP è stato poi inserito nel plasmide pGLO della Bio-Rad ed è ora disponibile esclusivamente per l'utilizzo didattico previsto dal programma Bio-Rad “Biotechnology Explorer”.

La GFP è estremamente brillante. La trasformazione batterica condotta utilizzando il pGLO permette quindi agli studenti di osservare l'espressione genica in tempo reale. Il kit Bio-Rad per la purificazione della GFP, utilizzabile successivamente alla trasformazione, permette agli studenti di isolare con un semplice processo cromatografico, la GFP geneticamente modificata a partire dalle cellule trasformate, da essi stessi prodotte. Le varie fasi del processo di purificazione possono essere seguite con la lampada U.V. portatile.

Ricerca guidata

Lo scopo di questa guida è di illustrare agli studenti la procedura mentale seguita nell'approccio scientifico utilizzato in laboratorio. Si focalizza non tanto il risultato (e le risposte che da questo derivano), quanto come questo venga ottenuto e come possa essere supportato da un'attenta osservazione e dall'analisi dei dati. Ciò significa proporre un approccio all'attività di laboratorio basato sull'indagine.

Nel procedere, vengono enfatizzati la comprensione del processo e l'analisi dei dati da parte dello studente. Piuttosto che fornire agli studenti spiegazioni ed interpretazioni, il manuale per lo studente propone una serie di domande che focalizzano e stimolano il ragionamento su tutti gli aspetti coinvolti nella ricerca. Le risposte sono contenute nella “guida delle risposte” per l'istruttore.

Il coinvolgimento dello studente in questo processo si tradurrà in una migliore comprensione sia dell'approccio scientifico che dell'importanza di procedere verso un obiettivo, in modo logico ed ordinato.

Ci aspettiamo quindi dagli studenti che, nell'affrontare questo tipo di approccio, possano sviluppare un atteggiamento positivo nei confronti della loro capacità di comprendere ed applicare il metodo scientifico.

Il corso Bio-Rad sulle biotecnologie è unico nel panorama educativo ed ha prodotto un elevato livello di interesse fra gli insegnanti di discipline biologiche. E' sottoposto a costante revisione come pure i relativi prodotti. Il vostro stimolo è prezioso per noi e vi invitiamo a sottoporci commenti e suggerimenti.

Ron Mardigian

Direttore del programma “Biotechnology Explorer”, laboratori Bio-Rad

ron_mardigian@bio-rad.com

Indice

| | Pagina |
|---|---------------|
| Guida per l'istruttore | |
| Introduzione alla trasformazione..... | 4 |
| Il sistema pGLO..... | 4 |
| Lista di controllo dei componenti del kit..... | 5 |
| Calendario delle attività..... | 6 |
| Aspetti importanti della lezione..... | 6 |
| Tecniche generali di laboratorio..... | 6 |
| Aspetti pratici..... | 7 |
| Aspetti teorici..... | 8 |
| Organizzazione dell'attività di laboratorio..... | 9 |
| Lista di controllo delle postazioni..... | 9 |
| Guida all'attività di laboratorio..... | 11 |
| Guida rapida per immagini..... | 15 |
| Appendice: guida dell'istruttore alle risposte..... | 18 |

Manuale dello studente

| | |
|---|----|
| Lezione 1 Introduzione alla trasformazione..... | 25 |
| Domande di ripasso..... | 25 |
| Lezione 2 Attività di laboratorio..... | 27 |
| Domande di riepilogo..... | 33 |
| Lezione 3 Raccolta dei dati e loro analisi..... | 34 |
| A. Raccolta dei dati..... | 34 |
| B. Analisi dei risultati..... | 35 |
| Domande di riepilogo..... | 35 |
| Lezione 4 Ulteriore attività: calcolo dell'efficienza di trasformazione..... | 36 |

Appendici

| | |
|--|----|
| Appendice A Legami storici con le biotecnologie..... | 41 |
| Appendice B Glossario dei termini..... | 43 |
| Appendice C Concetti fondamentali e terminologia di biologia molecolare..... | 44 |
| Appendice D Regolazione genica..... | 48 |
| Appendice E Bibliografia..... | 50 |

Guida per l'istruttore

Introduzione alla trasformazione

Con questo esperimento, gli studenti seguiranno una procedura conosciuta come trasformazione genetica. Una trasformazione genetica avviene quando una cellula acquisisce ed esprime un tratto estraneo di materiale genetico. Questa nuova informazione genetica conferisce spesso all'organismo un carattere identificabile dopo la trasformazione. Alla lettera, la trasformazione genetica indica un cambio causato dai geni e implica l'inserzione di uno o più di essi nell'organismo al fine di ottenere dei cambiamenti nel suo fenotipo.

La trasformazione genetica è utilizzata in molti settori delle biotecnologie. In agricoltura, è sfruttata per inserire nelle piante geni codificanti per caratteri quali la resistenza al gelo, a parassiti o a fitofarmaci. Batteri trasformati geneticamente con geni che li rendono capaci di degradare gli idrocarburi vengono utilizzati per il recupero di tratti di costa inquinati da "maree nere". In medicina, malattie dovute a geni mutati, possono essere combattute con la terapia genica che consiste nel trasformare geneticamente cellule di una persona malata con copie normali del gene mutato, causa della malattia.

I geni possono essere prelevati dal genoma di qualsiasi organismo—uomo, animali, piante, altri microrganismi—e trasferiti nei batteri. P. es., il gene corretto dell'insulina umana può essere inserito nei batteri i quali, nelle opportune condizioni, possono produrre questo ormone. L'insulina così ottenuta può essere usata per la cura del diabete, patologia causata da un difetto genetico che si traduce nella scarsa o nulla funzionalità della proteina prodotta.

Il sistema pGLO

Con il kit pGLO di trasformazione, gli studenti eseguono una semplice procedura per trasformare i batteri utilizzando il gene che codifica per la proteina GFP, gene che in natura appartiene alla medusa bioluminescente *Aequorea victoria*. La GFP è responsabile del fenomeno della fluorescenza e fa perciò brillare nel buio la medusa. In seguito al processo di trasformazione, i batteri esprimono il gene della medusa così acquisito, producendo la proteina fluorescente. Se esposti a radiazione U.V., i batteri emettono quindi una luce verde brillante.

Con questo esperimento gli studenti indagheranno il processo di trasferimento di geni da un organismo ad un altro, mediato da un plasmide. Oltre ad un lungo cromosoma, i batteri possono contenere una o più molecole di DNA di piccole dimensioni, chiamate plasmidi. Un plasmide di solito contiene geni per uno o più caratteri che possono conferire al batterio caratteristiche utili alla sua sopravvivenza. In natura i plasmidi possono passare da un batterio all'altro e viceversa, processo che permette la condivisione di geni utili. Questo meccanismo naturale permette ai batteri di adattarsi rapidamente a nuovi ambienti. Un classico esempio di questo fenomeno è l'insorgenza di ceppi batterici resistenti ai trattamenti con antibiotici.

Il plasmide pGLO del kit contiene, oltre al gene della GFP, un gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina. Il pGLO contiene inoltre un particolare sistema di regolazione genica che può essere usato per controllare l'espressione della proteina fluorescente nelle cellule trasformate. Il gene per la GFP può essere attivato, nelle cellule trasformate, semplicemente aggiungendo lo zucchero arabinosio al terreno di crescita contenuto nelle piastre. Le cellule trasformate con il pGLO vengono selezionate facendole crescere in piastre contenenti ampicillina. Le cellule trasformate cresceranno ed appariranno bianche (fenotipo selvatico) se cresciute in piastre senza arabinosio, mentre saranno verdi fluorescenti in presenza dello zucchero. Le particolari caratteristiche del pGLO permettono all'insegnante ed agli allievi, per la prima volta, di esplorare facilmente i meccanismi dell'espressione genica (appendice D) e della selezione genetica. L'intero processo è osservabile con il semplice ausilio di una economica lampada portatile ad U.V.

Argomenti importanti che lo studente deve conoscere per un ottimale comprensione dell'esperimento sono il concetto di gene ed i meccanismi che governano la sintesi proteica. Per una discussione più dettagliata di questi ed altri importanti concetti e termini di biologia molecolare, si rimanda ai contenuti dell'appendice B.

Il kit di trasformazione batterica dà l'opportunità di procedere con un ulteriore esperimento. Questo consiste nella purificazione della proteina fluorescente a partire dalle stesse cellule trasformate ed è possibile con il kit per la purificazione cromatografica della GFP (numero di catalogo 166-0005EDU).

Lista di controllo (X) dei componenti del kit

In questa sezione sono elencati i componenti contenuti nel kit di trasformazione batterica. Sono anche elencati gli accessori indispensabili. Ogni kit contiene il materiale necessario affinché 8 studenti possano lavorare individualmente. Utilizzate questa sezione per verificare il materiale in dotazione, prima di iniziare gli esperimenti. Tutti i componenti del kit si possono conservare, prima dell'uso, a temperatura ambiente.

| Componenti del kit (□) | quantità | (X) |
|--|-------------|--------------------------|
| 1. <i>E. coli</i> HB101 K-12, liofilizzato | 1 fiala | <input type="checkbox"/> |
| 2. Plasmide (pGLO), liofilizzato, 20 µg | 1 fiala | <input type="checkbox"/> |
| 3. Ampicillina, liofilizzata, 30 mg | 1 fiala | <input type="checkbox"/> |
| 4. L (+) arabinosio, liofilizzato, 600 mg | 1 fiala | <input type="checkbox"/> |
| 5. Soluzione di trasformazione (50 mM CaCl ₂ , pH 6.1), sterile, 15 ml | 1 bottiglia | <input type="checkbox"/> |
| 6. Brodo nutriente LB, sterile, 10 ml | 1 bottiglia | <input type="checkbox"/> |
| 7. Brodo nutriente LB+agar, in polvere, sterile (per ottenere 500 ml) | 1 sacchetto | <input type="checkbox"/> |
| 8. Pipette, sterili, in confezione individuale | 50 | <input type="checkbox"/> |
| 9. Anse per inoculare, sterili, da 10 µl, 10 anse per pacchetto | 8 pacchetti | <input type="checkbox"/> |
| 10. Capsule Petri, 60 mm, sterili, 20 capsule per pacchetto | 2 pacchetti | <input type="checkbox"/> |
| 11. Microprovette, sterili, da 2.0 ml (10 di ogni colore: giallo, verde, blu, arancione, lavanda, rosa) | 60 | <input type="checkbox"/> |
| 12. Portaprovette in schiuma | 8 | <input type="checkbox"/> |
| 13. Manuale di istruzione | 1 | <input type="checkbox"/> |

Accessori necessari – Non inclusi nel kit

| | | |
|--|-------------|--------------------------|
| 1. Lampada U.V.—ampia lunghezza d'onda (numero di catalogo 166-0500EDU) | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 2. Cronometro od orologio per misurare 50 secondi | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 3. Forno a microonde | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 4. Incubatore a 37°C * (numero di catalogo 166-0501EDU) | 1 opzionale | <input type="checkbox"/> |
| 5. Bagno termostato **, capacità 1–6 litri (numero di catalogo 166-0508EDU) | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 6. Termometro per misurare 42°C | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 7. Beuta, capacità 1 litro | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 8. Cilindro graduato, capacità 500 ml | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 9. Acqua distillata (dal supermercato) | 500 ml | <input type="checkbox"/> |
| 10. Ghiaccio tritato e contenitori (p.es., bicchieri di plastica) | 8 | <input type="checkbox"/> |
| 11. Candeggina (per uso domestico) | 10 ml | <input type="checkbox"/> |
| 12. Pennarello indelebile | 4–8 | <input type="checkbox"/> |

* Se l'incubatore non è disponibile, si può usare una coperta elettrica o costruirne uno artigianale inserendo una lampada a basso voltaggio dentro ad una scatola di polistirolo o di cartone. In alternativa si possono lasciare le capsule per 48-72 ore a temperatura ambiente (vedi tecniche generali di laboratorio—incubazione).

** Se un bagno termostato non è disponibile, si può riempire una scatola di polistirolo con acqua alla temperatura di 42°C.

Calendario delle attività

Ciascuna delle tre sessioni di laboratorio è concepita per essere portata a termine in circa 50 minuti. Il protocollo dettagliato di laboratorio è riportato nel manuale per lo studente.

Programma di laboratorio consigliato per gli studenti

| | | |
|----------------|---|--|
| Primo giorno | Approccio alle tematiche inerenti al kit | Discussione Considerazioni degli studenti 1- 4 |
| Secondo giorno | Esecuzione dell'esperimento di trasformazione | Trasformazione batterica ed inoculo piastre. Puntualizzare l'attività svolta in laboratorio |
| Terzo giorno | Raccolta dati e loro analisi | Osservare le cellule trasformate ed i controlli. Analisi ed interpretazione dei risultati. Considerazioni degli studenti |
| Quarto giorno | Ulteriori attività. | Calcolo dell'efficienza di trasformazione. Eventuale uso del kit "GFP chromatography" (numero di catalogo 166-0005EDU) |

Aspetti importanti della lezione

Questa sessione descrive i punti sperimentali e teorici utili ai fini dell'apprendimento degli studenti. Questi punti sono estremamente importanti per un' ottimale riuscita dell'esperimento.

Gli istruttori devono richiamare l'attenzione degli studenti su di essi e, quando possibile, spiegare la tecnica da utilizzare prima che gli studenti procedano con la relativa attività.

Gli studenti debbono porre la massima attenzione nel mettere i reagenti indicati nelle provette specificate e nelle piastre corrette. Perciò l'attenzione nell'operare, l'organizzazione ed il marcare chiaramente i tubi e le piastre sono aspetti fondamentali per una buona riuscita dell'esperimento. Con la guida rapida lo studente può organizzare il proprio esperimento. Il protocollo di laboratorio, corredato di disegni, fornisce una descrizione visiva di tutti i passi da compiere per eseguire l'esperimento della trasformazione.

Tecniche generali di laboratorio

Lavorare in sterilità

Nell'applicare qualsiasi tecnica microbiologica (p.es. colture batteriche e loro manipolazione), si deve evitare la contaminazione con microrganismi estranei all'esperimento.

Dal momento che i microrganismi sono ubiquitari e si possono trovare quindi su polpastrelli, superfici di lavoro, ecc., bisogna porre la massima cura nell'evitare il contatto con fonti di possibile contaminazione.

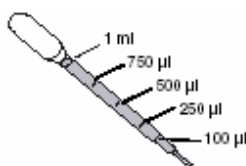
Nelle fasi in cui gli studenti operano direttamente con i batteri, deve quindi essere evitato il rischio di contaminazione.

In particolare essi devono evitare qualsiasi contatto dell'ansa per inoculare, dell'estremità del puntale, delle capsule Petri, ecc. con qualsiasi superficie.

Una piccola contaminazione non rovinerà certo l'esperimento ma è importante comunque che gli studenti comprendano l'importanza del concetto di sterilità, non solo per le tecniche di laboratorio ma anche dal punto di vista dell'igiene e della salute umana.

Uso della pipetta

Prima di operare in laboratorio, spiegare agli studenti l'uso della pipetta e la graduazione che riporta, così che imparino a prelevare 100, 250 o 1000 μ l (1 ml), come richiesto durante l'esperimento.



Lavorare con *E. coli*

Il batterio *E. Coli* – ceppo K-12 – contenuto in questo kit, il vettore contenente il gene della GFP ricombinante e le cellule trasformate originatesi dalla loro combinazione non sono organismi patogeni, come il ceppo O157:H7, salito alla ribalta della cronaca. Tuttavia, maneggiare le cellule derivanti dalla trasformazione, implica l'applicazione di regole standard di microbiologia. Ciò comporta quanto segue.

Le superfici di lavoro devono essere decontaminate giornalmente ed ogni qualvolta si verifichi una contaminazione con materiale biologico.

Tutti i rifiuti solidi e liquidi contaminati devono essere decontaminati prima dell'eliminazione.

Ci si deve lavare le mani dopo aver lavorato con organismi contenenti molecole di DNA ricombinante e, sempre e comunque, prima di uscire dal laboratorio.

Quanto sopra deve essere fatto con attenzione, per ridurre al minimo la produzione di aerosol.

Sono ammessi solo apparati per il pipettamento meccanico. E' vietato pipettare con la bocca.

In laboratorio non è ammesso mangiare, bere, fumare e utilizzare cosmetici.

E' consigliato l'uso di occhiali e guanti protettivi.

Decontaminazione ed eliminazione dei rifiuti

Se non si dispone di un'autoclave, sarà cura dotare ogni banco di lavoro di un apposito recipiente contenente una soluzione di sterilizzazione (10 % di candeggina, preparata al momento). Tutte le soluzioni ed il materiale (anse e pipette) venute in contatto con i batteri devono essere raccolte nel recipiente e lasciate per almeno 20 minuti, al fine di sterilizzarli.

Bisogna sempre sterilizzare le anse e le pipette utilizzate per l'esperimento.

Le capsule Petri vanno sterilizzate versandoci dentro la soluzione di sterilizzazione. Questa, dopo aver agito per almeno un'ora, può essere eliminata direttamente nello scarico. Una volta trattate, le piastre possono essere eliminate come normali rifiuti.

E' consigliato l'uso di occhiali quando si utilizza la soluzione sterilizzante

Lampade ad ultravioletti (UV)

La radiazione ultravioletta può provocare danni agli occhi ed alla pelle. Raggi UV di corta lunghezza d'onda producono più danni di quelli a lunghezza d'onda maggiore. La lampada UV Bio-Rad raccomandata per questa esperienza è ad ampia lunghezza d'onda.

Se possibile, usare occhiali o schermi protettivi, che filtrino la radiazione UV

Incubazione

Questa guida presuppone la disponibilità di un incubatore a 37°C. L'esperimento di trasformazione può comunque essere condotto senza tale apparecchio considerando però che, a temperatura ambiente, i tempi di sviluppo delle colonie sono sensibilmente più lunghi. I migliori risultati si ottengono utilizzando cellule prelevate da colonie (diametro 1-1.5 mm) recentemente sviluppatesi su piastra (24-48 ore di crescita). **Cellule conservate in frigorifero hanno una bassa efficienza di trasformazione.** La temperatura ottimale di sviluppo per *E. Coli* è di 37°C, per cui valori minori daranno luogo ad una minore velocità di crescita. A 28°C ci vogliono due giorni per poter osservare i risultati e tre ad una temperatura di 21°C. Bisogna quindi tener conto di questo aspetto nel programmare i tempi dell'esperimento.

Aspetti pratici

Familiarizzare con le tecniche

C'è chi preferisce iniziare l'attività simulando le varie tecniche dell'esperimento. Si dovrà decidere che approccio seguire, in funzione della conoscenza degli studenti delle tecniche e della manualità da essi posseduta.

Trasferimento delle colonie batteriche dalle piastre alle microprovette

Strisciando l'ansa per inoculare su di una singola colonia batterica di circa 1 mm, si prelevano milioni di cellule, sufficienti per la trasformazione.

Trasferimento del DNA

E' di fondamentale importanza il trasferimento corretto del DNA plasmidico, dalla provetta che lo contiene a quella con le cellule da trasformare. Per cui gli studenti devono osservare con attenzione il cerchietto dell'ansa per verificare che si sia prodotto un velo di liquido nel prelevare la soluzione plasmidica. Così come succede quando si fanno le bolle di sapone.

Shock termico

Per aumentare l'ingresso di DNA esogeno nel batterio, si sottopone quest'ultimo a **shock termico**. I tempi di questo processo sono molto importanti così come il rapido cambio di temperatura e la durata dello shock termico. Il risultato ottimale lo si ottiene trasferendo rapidamente le cellule dal ghiaccio all'acqua a 42°C, lasciandole per 50 secondi e riportandole altrettanto rapidamente di nuovo in ghiaccio. Si ottengono invece 10 volte meno cellule trasformate senza lo shock termico o il 50% in meno se lo shock dura 90 secondi. Anche se non in condizioni ottimali, vengono prodotte comunque cellule trasformate.

Piastrare le cellule

Trasferire troppa sospensione cellulare nelle piastre è controproducente. Un eccesso di liquido non verrà assorbito e le cellule non si distribuiranno in modo uniforme sulla superficie. L'operazione di trasferimento va condotta con attenzione. Dal momento che i batteri tendono a precipitare, bisogna risospenderli. Ciò si ottiene colpendo con il dito indice la provetta contenente i batteri e retta, a livello del tappo, fra pollice e indice dell'altra mano. Bisogna assicurarsi che gli studenti tappino correttamente la provetta e mescolino la sospensione cellulare pipettando, prima di prelevarla. Gli studenti devono inoltre coprire la piastra col coperchio subito dopo avervi trasferito le cellule trasformate e averle distribuite sulla superficie.

Kit per la cromatografia della proteina fluorescente verde (GFP)

Se dopo la trasformazione, si vuole eseguire l'esperimento della purificazione della proteina, (166-0005EDU), si devono conservare le piastre contenenti i batteri fluorescenti. Il modo migliore per conservarle è di metterle in frigorifero capovolte. In questo modo si evita che il vapore condensi sulla superficie dell'agar e che le cellule diffondano. Il metabolismo dei batteri si blocca, ma rimangono vitali fino al momento dell'uso.

Le piastre andrebbero utilizzate entro 2-4 settimane ma, se opportunamente sigillate (per evitare che si disidratino), possono essere conservate anche più a lungo.

Aspetti teorici

Terreni di coltura

Il terreno di coltura liquido usato si chiama LB (dalle iniziali di Luria e Bertani) e, reso solido dall'aggiunta di agar, viene utilizzato per confezionare le piastre. L'LB è costituito da estratto di lievito e da un idrolisato enzimatico di carne che fornisce carboidrati, amminoacidi, nucleotidi, sali e vitamine per la crescita batterica. L'agar, che si ottiene da alghe marine, si scioglie quando scaldato e diventa un gel solido quando raffreddato (come la gelatina); serve per fornire un supporto solido su cui far crescere i batteri.

Selezione con antibiotici

Il plasmide pGLO che reca il gene della GFP, contiene anche il gene per l'enzima beta-lattamasi, che induce la resistenza all'antibiotico ampicillina. La beta-lattamasi è prodotta e secreta dai batteri trasformati con il pGLO. Questo enzima degrada l'ampicillina presente nel terreno delle piastre, permettendo la crescita batterica. Solo i batteri trasformati, che producono beta-lattamasi, possono sopravvivere nelle piastre contenenti ampicillina. Soltanto una minima percentuale delle cellule incorpora il plasmide e viene trasformata. Le cellule non trasformate non crescono nelle piastre contenenti ampicillina.

Soluzione di trasformazione

Si presume che i cationi Ca^{2+} della soluzione di trasformazione (50 mM $CaCl_2$, pH 6.1) neutralizzino le cariche negative repulsive dei gruppi fosfato presenti sia nelle catene laterali del DNA che nei fosfolipidi della membrana cellulare, permettendo così al DNA di entrare nella cellula.

Shock termico

Lo shock termico aumenta la permeabilità della membrana cellulare al DNA. Anche se il meccanismo non è noto, la durata dello shock termico è fondamentale ed è stata ottimizzata per il tipo di batterio usato e le condizioni di trasformazione applicate.

Crescita delle cellule

Il periodo di incubazione (10 minuti) successivo all'aggiunta di LB liquido permette alle cellule di crescere e di produrre l'enzima beta-lattamasi, che le rende resistenti all'ampicillina. Sarà possibile quindi selezionare nelle piastre contenenti ampicillina le cellule trasformate da quelle che non hanno ricevuto il pGLO.

Se si incubano a temperatura ambiente o a 37°C le cellule trasformate per tutta la notte, si avrà un aumento dell'efficienza di trasformazione di più di 10 volte.

La regolazione genica nel pGLO

In tutti gli organismi l'espressione genica è finemente regolata per permettere l'adattamento a differenti condizioni e per prevenire un'eccessiva produzione di proteine non indispensabili. I geni implicati nel catabolismo di differenti fonti alimentari, sono ottimi esempi di meccanismi di questo tipo. Per esempio, l'arabinosio, uno zucchero semplice, costituisce sia una fonte di energia che di carbonio per i batteri. I geni batterici che codificano per gli enzimi digestivi che degradano l'arabinosio, non vengono espressi quando questo zucchero non è presente nell'ambiente. Ma se l'arabinosio è disponibile, questi geni vengono attivati. Quando l'arabinosio viene esaurito, tali geni vengono spenti nuovamente.

L'arabinosio attiva la trascrizione di questi geni, promuovendone l'interazione con la RNA polimerasi. Nel plasmide pGLO, geneticamente modificato, alcuni dei geni implicati nel catabolismo dell'arabinosio sono stati sostituiti dal gene della medusa codificante per la GFP. Quando i batteri trasformati con il pGLO vengono fatti crescere in presenza di arabinosio, il gene GFP viene attivato e la relativa proteina prodotta. Se esposti a radiazione ultravioletta, i batteri emanano quindi luce verde brillante.

Questo è un eccellente esempio che illustra il "dogma centrale della genetica": DNA→RNA→PROTEINA→FENOTIPO. Quando invece nelle piastre non è presente l'arabinosio, il gene della GFP rimane inattivo e le colonie appaiono bianche. Per un'analisi ed una descrizione più approfondita del meccanismo della regolazione genica e della funzione del promotore per l'arabinosio, si rimanda all'appendice A.

Organizzazione dell'attività di laboratorio

Viene qui esposto un calendario che l'istruttore deve seguire per organizzare il lavoro inerente l'esperimento. L'organizzazione del lavoro è discussa in dettaglio nelle pagine 9–13.

| Compiti dell'istruttore | Quando | Tempo richiesto |
|--|------------------------------|-----------------|
| 1 Leggere il presente manuale Fare copie del manuale dello studente e della guida rapida per ciascun studente | subito | 1 ora |
| 2 Preparare le piastre | 3–7 giorni prima dell'inizio | 1 ora |
| 3 Preparare le piastre starter, aliquotare le soluzioni | 24–36 ore prima dell'inizio | 30 minuti |
| 4 Organizzare le postazioni degli studenti | prima dell'inizio | 10 minuti |

Lista di controllo (X) delle postazioni

Postazioni degli studenti. Sono più sotto elencati i materiali e le attrezzature di cui ogni postazione deve essere dotata prima dell'inizio dell'esperimento. I componenti presenti in questo kit sono sufficienti per 8 postazioni.

Postazione dell'istruttore (comune). Più sotto sono anche elencati i materiali e le apparecchiature, condivise da tutti gli studenti, che devono essere disposti in un luogo accessibile a tutti. L'istruttore può decidere se lasciare liberi gli studenti di utilizzare questo materiale condiviso o di essere lui ad aliquotare direttamente le soluzioni nelle microprovette.

Lezione 1 Trasformazione

| Postazioni degli studenti | Numero richiesto | (*) |
|---|------------------------|--------------------------|
| Piastra starter di <i>E. coli</i> (LB) | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Piastre con agar (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara) | 4 | <input type="checkbox"/> |
| Soluzione di trasformazione | 1 | <input type="checkbox"/> |
| LB liquido | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Anse per inoculare | 7 (1 confezione da 10) | <input type="checkbox"/> |
| Pipette | 5 | <input type="checkbox"/> |
| Portaprovette in schiuma | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Bicchieri di plastica con ghiaccio | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Pennarello | 1 | <input type="checkbox"/> |

Postazione dell'istruttore (comune)

| | | |
|--|------------|--------------------------|
| Plasmide pGLO reidratato | 1 provetta | <input type="checkbox"/> |
| Bagno termostatico a 42°C e termometro | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Incubatore a 37°C (opzionale, vedi tecniche generali di laboratorio-incubazione) | 1 | <input type="checkbox"/> |

Lezione 2 Raccolta dati e loro analisi

| Postazioni degli studenti | Numero richiesto | (*) |
|--|-------------------------|--------------------------|
| Piastre per le cellule di controllo e trasformate: | Set di 4 per studente | <input type="checkbox"/> |
| LB/amp/ara | 1 | <input type="checkbox"/> |
| LB/amp | 2 | <input type="checkbox"/> |
| LB | 1 | <input type="checkbox"/> |

Postazione dell'istruttore (comune)

| | | |
|------------|-----|--------------------------|
| Lampada UV | 1-8 | <input type="checkbox"/> |
|------------|-----|--------------------------|

Guida all'attività di laboratorio

| Obiettivi | Tempo richiesto | Quando |
|--|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 Preparazione piastre | 1 ora | 3–7 giorni prima dell'inizio |
| 2 Reidratare <i>E. coli</i> inoculare le piastre starter Reidratare il plasmide pGLO | 2 minuti 15 minuti 2 minuti | 24–36 ore prima dell'inizio |
| 3 Aliquotare le soluzioni Organizzare le postazioni degli studenti | 10 minuti 10 minuti | prima dell'inizio |

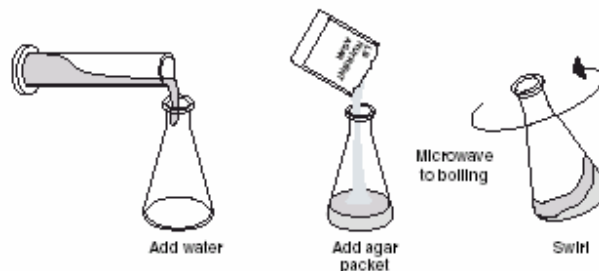
Attività di laboratorio 1: 3-7 giorni prima dell'inizio

1. Preparare il terreno di coltura agarizzato (non autoclavare)

Le piastre devono essere preparate almeno 3 giorni prima dell'inizio dell'esperimento. Devono essere lasciate a temperatura ambiente per 2 giorni quindi conservate in frigorifero fino al momento dell'uso. In questo modo il terreno di coltura si asciuga quel tanto che basta per assorbire rapidamente la soluzione di trasformazione che gli studenti vi depositano.

Per preparare le piastre, aggiungere 500 ml di acqua distillata in una beuta da 1 litro. Vuotare in essa tutto il contenuto del sacchetto contenente il brodo nutriente+agar. Agitare la beuta per dissolvere l'agar e portare ad ebollizione nel forno a microonde. Riscaldare ed agitare nuovamente finché tutto l'agar non si è solubilizzato e il contenuto della beuta appare trasparente. Lasciare raffreddare la beuta dopo ogni agitazione per evitare che il contenuto, bollendo, esca all'esterno.

Quando tutto l'agar si è disciolto, aspettare che la temperatura della soluzione scenda a circa 50°C (non scotta più). Nel frattempo marcare le piastre e preparare l'arabinosio e l'ampicillina come indicato in seguito. Attenzione a non lasciar raffreddare troppo la soluzione, altrimenti l'agar inizia a solidificare.

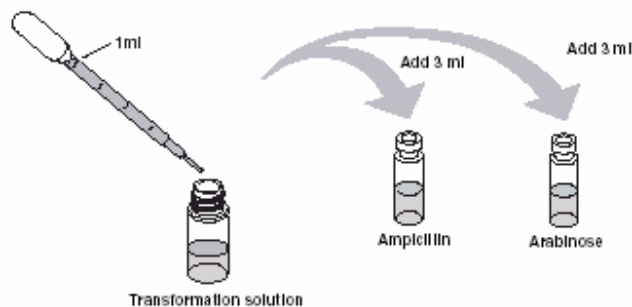


2. Preparare l'arabinosio e l'ampicillina

Nota: l'arabinosio richiede almeno 10 minuti per sciogliersi.

L'arabinosio è una polvere contenuta in una piccola fiala. Aggiungere alla fiala 3 ml di soluzione di trasformazione con una pipetta sterile per reidratare lo zucchero (si usa la soluzione di trasformazione poiché è sterile, ma si può usare anche acqua sterile). Agitare la fiala (con un vortex, se disponibile).

Anche l'ampicillina è una polvere contenuta in una piccola fiala. Aggiungere alla fiala 3 ml di soluzione di trasformazione con una pipetta sterile per reidratare l'antibiotico (si usa la soluzione di trasformazione poiché è sterile, ma si può usare anche acqua sterile).



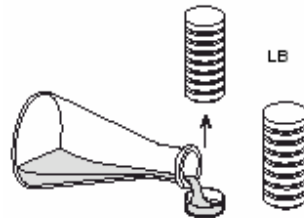
Nota: il calore (>50°C) degrada l'ampicillina e l'arabinosio ma l'agar solidifica a 27°C e, controllandone il raffreddamento, si possono preparare tutte le piastre senza interrompersi. Se si formano bolle, queste possono essere eliminate al termine dell'operazione, passando brevemente la superficie delle piastre con la fiamma di un Bunsen. Finchè l'agar non si è solidificato, non spostare le piastre. Il terreno rimasto va versato nel bidone e non nel lavandino. Togliere le eventuali gocce di terreno solidificatosi sull'esterno delle piastre.

3. Marcare le piastre

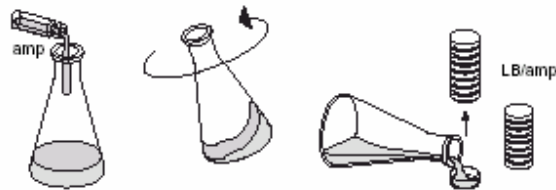
Le 40 piastre devono essere marcate con un pennarello permanente sul fondo, vicino al bordo. Marcare 16 piastre con **LB**, 16 piastre con **LB/amp** and 8 piastre con **LB/amp/ara**

4. Versare il terreno nutritivo agarizzato (LB, LB/amp, LB/amp/ara)

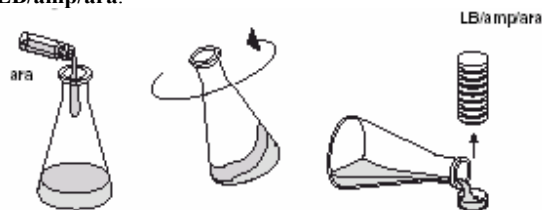
Primo, versare il terreno LB nelle 16 piastre marcate con LB. Fare con le piastre vuote pile da 4 ed iniziare a riempirle partendo dalla sottostante. Una mano regge la pila, l'altra la beuta. Si lascia la base della piastra da riempire sul piano e si solleva appena il resto della pila, coperchio della piastra da riempire compreso. Riempire la piastra per un terzo-metà (~12ml) poi richiuderla col coperchio e procedere allo stesso modo con le rimanenti 3 piastre. Le 16 piastre vanno lasciate raffreddare impilate.



Secondo, aggiungere l'ampicillina idratata al terreno LB rimasto. Mescolare brevemente e, operando come sopra, preparare le 16 piastre marcate con **LB/amp**



Terzo, aggiungere l'arabiosio idratato al terreno LB rimasto contenente l'ampicillina. Mescolare brevemente e, operando come sopra, preparare le 8 piastre marcate con **LB/amp/ara**.



5. Conservazione delle piastre

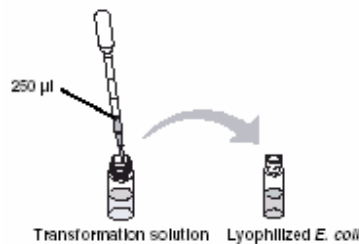
Dopo un periodo di 2 giorni a temperatura ambiente, le piastre possono essere usate direttamente o conservate nello stesso sacchetto che le conteneva precedentemente, che deve essere sigillato. Le piastre si conservano capovolte in frigorifero fino al loro uso.

Attività di laboratorio 2: 24-36 ore prima dell'inizio

1. Reidratare i batteri

Usando una pipetta sterile, reidratare *E. coli* HB101 liofilizzato, aggiungendo direttamente 250 µl di soluzione di trasformazione nella fiala (si usa la soluzione di trasformazione poiché è sterile, ma si può usare anche acqua sterile). Richiudere la fiala e lasciare la

sospensione cellulare a temperatura ambiente per 5 minuti. Quindi agitare bene prima di inoculare le piastre starter. Conservare la fiala contenente i batteri reidratati nel frigorifero fino all'uso (si possono riutilizzare entro 1–3 giorni)

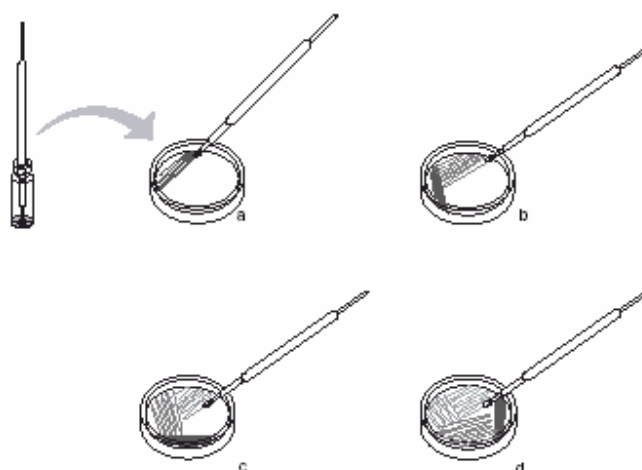


2. Inoculare le piastre starter per produrre singole colonie batteriche

Ogni gruppo di studenti necessita di una piastra starter (coltura ricevente) da cui prelevare le cellule da trasformare. Questo kit contiene sufficiente materiale per allestire 8 postazioni di lavoro complete. Le piastre starter devono essere inoculate in modo da ottenere singole colonie e incubate a 37°C per 24–36 ore prima dell'inizio dell'esperimento.

Usando *E. Coli* reidratato preparato al punto precedente e 8 piastre di **LB** (preparate come sopra), inoculare una piastra starter per ogni gruppo di studenti. Si inoculano le piastre per ottenere colonie singole a partire da una concentrata. Una minima quantità di quest'ultima è più che sufficiente. In condizioni ottimali dopo 24 ore si ottiene, a partire da una cellula, una progenie costituita da miliardi di individui geneticamente identici. Una singola colonia è composta da milioni di batteri.

- Inserire un'ansa per inoculare sterile direttamente nella fiala (senza inclinarla) contenente la sospensione batterica. Estrarre l'ansa e inoculare le piastre come illustrato più avanti. L'inoculo si esegue sequenzialmente, dividendo la piastra in 4 quadranti e va effettuato strisciando l'ansa avanti e indietro per una dozzina di volte sull'area di ciascun quadrante. La prima strisciata serve per spargere un poco le cellule. Ripetendo l'operazione nei quadranti successivi, i batteri vengono via via sempre più diluiti, aumentando la probabilità di ottenere singole colonie.
- Per le seguenti strisciate si deve usare il massimo della superficie dei quadranti. Ruotare la piastra di ~45° (così da poter muovere comodamente l'ansa) e procedere con la seconda strisciata. Passare sulla strisciata precedente un paio di volte e poi altre 10 sulla superficie del secondo quadrante, come da figura.
- Ripetere il punto b. sul terzo quadrante.
- Ripetere il punto b. sul quarto quadrante.
Ripetere con altre piastre di **LB** i punti a–d per ottenere tante piastre starter quante sono le postazioni di lavoro. Si usa la stessa ansa per tutte le piastre. Ogni piastra deve essere ricoperta immediatamente dopo l'inoculazione per evitare contaminazioni.

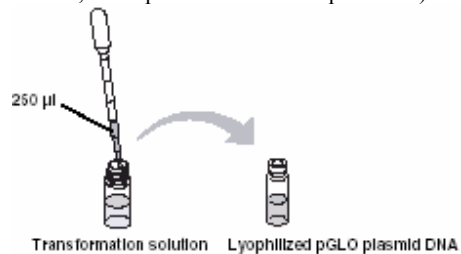


- Mettere le piastre capovolte nell'incubatore a 37°C per tutta la notte o a temperatura ambiente per 2–3 giorni, qualora l'incubatore non fosse disponibile. Usare per la trasformazione entro 24–36 ore. **NON METTERE IN FRIGORIFERO PRIMA DELLA TRASFORMAZIONE**

- f. *E. coli* produce colonie bianche, regolarmente circolari e con il bordo arrotondato. Evitare l'uso di piastre contaminate da colonie di aspetto diverso.

3. Preparare il plasmide pGLO

Usando una pipetta sterile, aggiungere 250 μ l di soluzione di trasformazione nella fiala del plasmide pGLO liofilizzato. Notare che la quantità di DNA è così piccola che la fiala appare vuota. Se possibile, conservare il plasmide reidratato nel frigorifero (si usa la soluzione di trasformazione poiché è sterile e priva di nucleasi, ma si può usare anche acqua sterile).



Attività di laboratorio 3: prima dell'esperimento di trasformazione

1. Aliquotare le soluzioni

Per ogni gruppo di studenti, aliquotare 1ml di soluzione di trasformazione (CaCl₂) e 1 ml di terreno LB liquido in due distinte microprovette colorate da 2 ml fornite col kit. Se il terreno di coltura si aliquota un giorno prima dell'uso, è meglio conservarlo in frigorifero. Marcare i tubi.

2. Preparare le postazioni di lavoro.

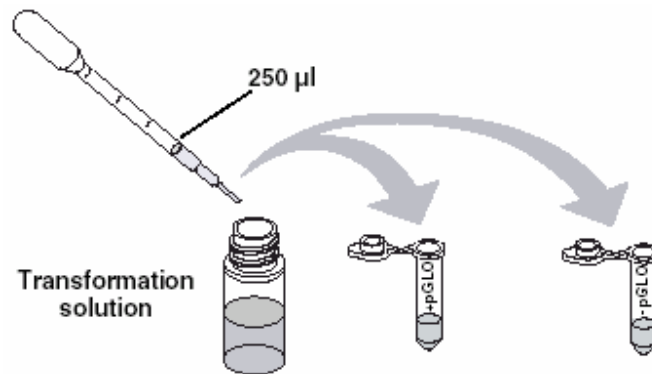
Vedere a pag. 7 per la lista del materiale occorrente.

Guida rapida per immagini

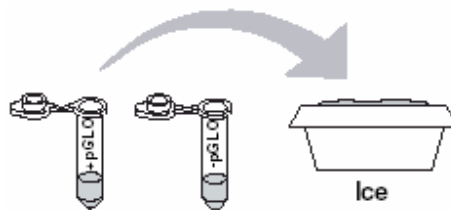
1. Marcare una microprovetta chiusa +pGLO ed un'altra -pGLO. Marcare entrambe le microprovette con il nome del vostro gruppo. Inserirli nel portaprovette in schiuma.



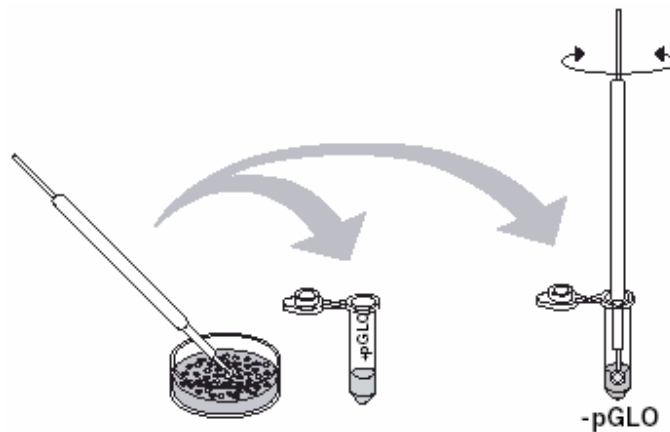
2. Aprire le microprovette ed utilizzando una pipetta sterile, trasferire 250 µl di soluzione di trasformazione (CaCl₂).



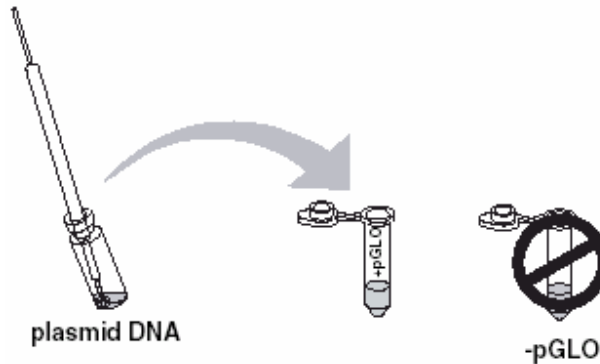
3. Mettere le microprovette in ghiaccio.



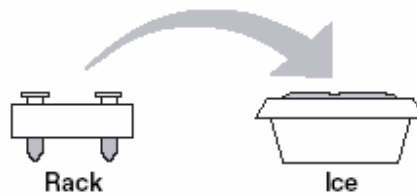
4. Prelevare con un'ansa sterile una singola colonia batterica dalla piastra starter. Prendere la microprovetta +pGLO ed immergere l'ansa nella soluzione di trasformazione. Far ruotare fra pollice ed indice l'ansa per risospingere nel liquido le cellule. Chiudere la microprovetta e rimetterla nel portaprovette in ghiaccio. Utilizzando una nuova ansa sterile, ripetere l'operazione precedente con la provetta -pGLO.



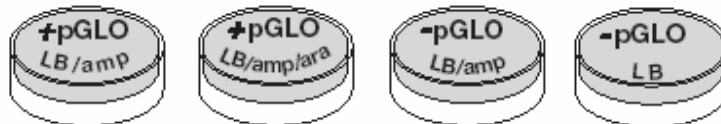
5. Esaminare la microprovetta contenente il plasmide pGLO con la lampada UV. Annotare l'osservazione. Immergere una nuova ansa sterile nella microprovetta e, dopo averla estratta, assicurarsi che si sia formato un velo di liquido nell'anello, come succede quando si fanno le bolle col sapone. Immergere l'ansa sterile nella microprovetta +pGLO e mescolare la sospensione cellulare. Chiudere la microprovetta e rimetterla nel portaprovette in ghiaccio. Chiudere anche la microprovetta -pGLO. Non aggiungere plasmide nella microprovetta -pGLO. Perché?



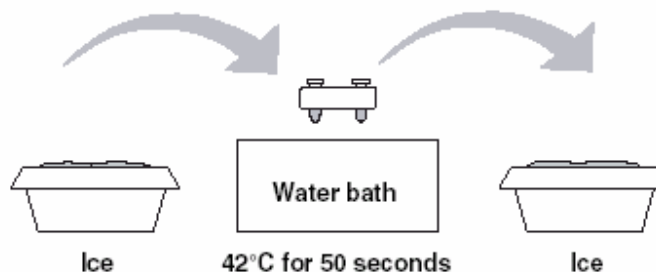
6. Incubare le microprovette in ghiaccio per 10 minuti. Assicurarsi di inserirle fino in fondo nel portaprovette cosicch  le loro estremit  entrino in contatto col ghiaccio.



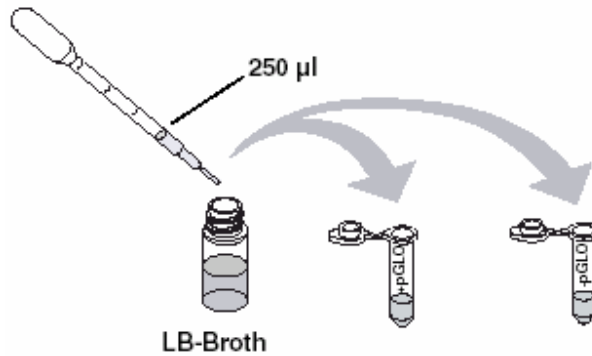
7. Mentre I tubi sono in ghiaccio marcare le 4 piastre sul fondo (non sul coperchio) come segue: una piastra LB/amp con +pGLO; la piastra LB/amp/ara con +pGLO; l'altra piastra LB/amp con -pGLO; la piastra LB con -pGLO.



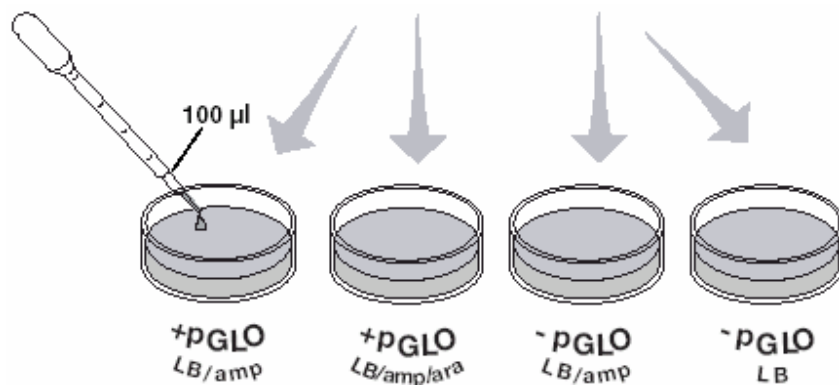
8. Shock termico. Trasferire il portaprovette con tutte le provette inserite nel bagno termostatico a 42  C e lasciarle per 50 secondi esatti. Assicurarsi che le microprovette siano inserite fino in fondo nel portaprovette cosicch  le loro estremit  entrino in contatto con l'acqua calda. Trascorsi i 50 secondi, riportare le microprovette in ghiaccio e lasciarle per 2 minuti. Per un'ottimale trasformazione, i passaggi ghiaccio-acqua calda e viceversa devono essere rapidi.



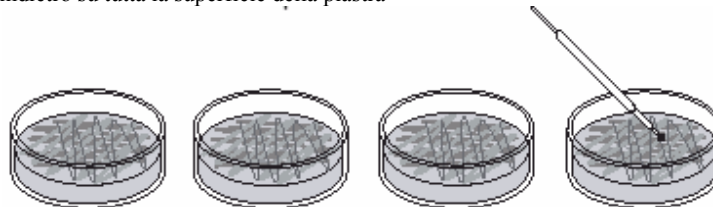
9. Rimuovere il portaprovette con le microprovette dal ghiaccio ed appoggiarlo sul bancone. Aprire le microprovette ed aggiungere 250µl di LB liquido in ciascuna di esse, utilizzando ogni volta una nuova pipetta sterile. Chiudere le microprovette ed incubarle per 10 minuti a temperatura ambiente.



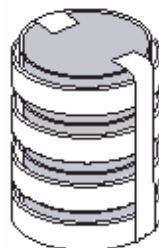
10. Tenendo le microprovette per le estremità, agitarle per risospendere le cellule. Trasferire 100 µl da ciascuna microprovetta nelle rispettive piastre, utilizzando per ogni microprovetta una nuova pipetta sterile.



11. Usando una nuova ansa sterile per ogni piastra, spargere il liquido trasferito su tutta la superficie dell'agar. Ciò si ottiene strisciando delicatamente l'ansa avanti e indietro su tutta la superficie della piastra



12. Impilare le 4 piastre e unirle con lo scotch. Mettere il nome del proprio gruppo e la data dell'esperimento sul fondo della pila e porla capovolta nell'incubatore a 37°C fino al giorno successivo.



Appendice: guida dell'istruttore alle risposte

Lezione 1 domande di ripasso

1. Per trasformare geneticamente un organismo, si deve inserire il(i) nuovo(i) gene(i) in tutte le cellule che lo compongono. Quale organismo è più indicato per una trasformazione genetica totale? Un organismo pluricellulare o uno composto da una sola cellula?
Un organismo unicellulare è il più indicato per una trasformazione genetica in quanto è sufficiente inserire il gene nell'unica cellula che lo compone.
2. Gli scienziati spesso vogliono sapere se gli organismi geneticamente trasformati possono trasmettere i loro nuovi caratteri alla successive generazioni. Per sapere ciò, quale potrebbe essere il miglior candidato per la vostra ricerca: un organismo che si sviluppa e si riproduce velocemente o uno più lento?
Un organismo che si riproduce velocemente. Un rapido passaggio alle generazioni successive consente di verificare se il nuovo carattere sia stato trasmesso o meno.
3. La sicurezza nell'operare è un altro importante parametro da considerare nella scelta dell'organismo. Che caratteri (o caratteristiche) deve (o non deve) possedere per essere sicuri che non sia pericoloso per gli altri viventi o per l'ambiente?
L'organismo non deve produrre tossine o sostanze che provochino malattie; deve crescere rapidamente in laboratorio ma non poter sopravvivere all'esterno di esso; non deve poter infettare piante ed animali.
4. Considerando quanto detto, quale potrebbe essere l'organismo più indicato per una trasformazione genetica? Un batterio, un lombrico, un pesce o un topo? Spiega le ragioni della tua scelta.
Un batterio sarebbe l'organismo più indicato. I batteri sono organismi piccoli, unicellulari e si riproducono facilmente e velocemente.

Nota: Il batterio *Escherichia coli* (*E. coli*), ceppo HB101 K-12, è l'organismo che meglio riveste i requisiti sopra elencati: è unicellulare, si riproduce ogni 20 minuti, non è patogeno e non può sopravvivere all'esterno del laboratorio.

Lezione 1 domande di puntualizzazione

Ricordare che il fine della trasformazione genetica è quello di cambiare uno o più caratteri (fenotipo) di un organismo. Prima che qualsiasi cambio nel fenotipo di un organismo sia rilevato, occorre fare un'approfondita analisi del suo fenotipo normale, prima della trasformazione. Osservare le colonie di *E. coli* nelle piastre starter ed elencare tutti i caratteri o le caratteristiche osservabili, che possono essere descritti.

Colore delle colonie, loro numero e loro distribuzione sulle piastre.

Descrivere come si potrebbero usare due piastre di LB, *E. coli* e l'ampicillina per determinare quanto il batterio sia sensibile a questo antibiotico.

Si potrebbero inoculare con uguali quantità di cellule di *E. coli* due piastre, una contenente solo LB, l'altra con LB+amp e comparare poi la crescita sulle due piastre. Se l'ampicillina limita la crescita di *E. coli*, si osserverà un minore numero di colonie sulle piastre LB+amp; in caso contrario la crescita sarà grosso modo simile su entrambe le piastre.

Risultati: che risultati sperimentali ti aspetteresti per avere un'indicazione circa l'effetto dell'ampicillina su *E. coli*?

Gli antibiotici normalmente uccidono i batteri (sostanze battericide) o ne inibiscono la crescita (sostanze batteriostatiche) per cui sulle piastre LB+amp non ci devono essere o quasi colonie. La presenza di qualunque colonia nella piastra LB+amp suggerirebbe che quei batteri siano resistenti all'antibiotico ampicillina.

Lezione 2 domande di riepilogo

1. Su quale delle piastre ci si aspetta di trovare colonie batteriche più simili a quelle precedentemente osservate, prodotte da *E. coli* non trasformato? Spiega le tue previsioni.

I batteri assomiglianti ad *E. coli* non trasformato si rinvengono nella piastra LB -pGLO. Questi batteri, provenienti dalla piastra starter, non hanno acquisito alcun plasmide e sono stati trasferiti su una piastra con LB. Pertanto essi sono identici alle cellule originarie di *E. coli*.

2. Se ci sono cellule batteriche geneticamente trasformate, su quale(i) piastra(e) si troveranno? Spiega le tue previsioni.

Le cellule trasformate si trovano sulle piastre LB/amp ed LB/amp/ara. Le cellule geneticamente trasformate avendo acquisito il plasmide pGLO, che esprime la resistenza all'ampicillina, possono sopravvivere nelle piastre contenenti l'antibiotico.

3. Quali piastre devono essere confrontate per determinare se ha avuto luogo una trasformazione genetica? Perché?

Devono essere direttamente comparate le piastre LB/amp -pGLO e LB/amp +pGLO. Le cellule che non sono state trattate con il plasmide (-pGLO) non esprimono il gene per la resistenza all'ampicillina e non crescono sulle piastre LB/amp. Le cellule trasformate con il plasmide (+pGLO), esprimono invece il gene per la resistenza all'ampicillina e crescono sulle piastre LB/amp.

4. Cosa si intende per piastra di controllo? A cosa serve il controllo?

Una piastra di controllo è un riferimento che aiuta ad interpretare i risultati sperimentali. In questo esperimento, entrambe le piastre -pGLO sono piastre di controllo. La piastra di controllo LB/amp -pGLO può essere comparata con la piastra LB/amp +pGLO. Il confronto mostra che la trasformazione genetica produce colonie batteriche che possono crescere in presenza di ampicillina (possedendo il gene per la resistenza all'ampicillina, producono la relativa proteina). La piastra di controllo LB -pGLO può essere comparata con qualsiasi delle piastre LB/amp per verificare che l'acquisizione del pGLO è indispensabile per la crescita in presenza di ampicillina. La piastra LB/amp -pGLO mostra che la coltura starter non cresce in presenza di ampicillina. Senza questo controllo, non si potrebbe asserire che le cellule cresciute sulla piastra LB/amp +pGLO siano realmente trasformate.

Lezione 3 raccolta dei dati e loro analisi

1. Osservare e disegnare cosa si vede su ciascuna delle quattro piastre. Incollare i disegni nella colonna di destra della tabella dei dati. La raccolta dei dati permette di comparare le osservazioni eseguite sulle cellule "+pGLO" con quelle effettuate sulle cellule di *E. coli* non trasformate. Riportare le seguenti osservazioni per ciascuna piastra.

2. Quanta crescita batterica si osserva su ciascuna piastra, in termini relativi?

Ci devono essere colonie multiple sia sulle piastre LB/amp che su quelle LB/amp/ara, poiché hanno acquisito il plasmide pGLO (normalmente 50-100 colonie). Non ci devono essere batteri sulla piastra LB/amp -pGLO mentre ci deve essere crescita abbondante sulla piastra LB -pGLO.

3. Di che colore sono i batteri?

I batteri sulle piastre LB/amp +pGLO e LB/amp/ara -pGLO devono apparire bianchi. I batteri sulla piastra LB/amp/ara +pGLO devono apparire bianchi se esposti alla normale luce ambiente ma emettere una fluorescenza verde quando esposti alla luce della lampada UV portatile.

4. Contare quante colonie batteriche ci sono su ciascuna piastra (i punti visibili).

Sulle due piastre +pGLO ci devono essere 50-100 colonie. L'abbondanza di batteri riscontrabile sulla piastra LB risulta dovuta ad un numero enorme di colonie, che non si possono contare.

| Piastre | Osservazione |
|---------------|--|
| LB/amp, +pGLO | Molte colonie (50-100) di batteri trasformati. Il colore appare bianco. |

LB/amp/ara, +pGLO **Molte colonie (50-100) di batteri trasformati.**
Il Colore appare bianco se esposte alla luce ambiente
ma emettono una fluorescenza verde se esposte a radiazione UV

LB/amp, -pGLO **Non c'è crescita batterica.**

LB, -pGLO **Crescita batterica abbondante.**
Cellule di color bianco.

Lezione 3 analisi dei risultati

1. Quale dei caratteri di *E. coli* precedentemente osservati non appaiono cambiati? Nello spazio sottostante elencare i caratteri non trasformati e motivare le ragioni della loro scelta.

Caratteri originali **osservazione compiuta**

Colore **il colore dei batteri è bianco**

Grandezza delle colonie **le dimensioni sono simili prima e dopo la trasformazione**

2. Dei caratteri di *E. coli* originariamente osservati, quale appare cambiato dopo aver eseguito l'esperimento di trasformazione? Elencare i caratteri e descrivere i cambiamenti osservati.

Nuovi caratteri **osservazione compiuta**

Colore **Le colonie sulla piastra LB/amp/ara emettono fluorescenza verde**
se esposte a radiazione UV.

Ampicillina **Le colonie trasformate possono crescere in presenza dell'antibiotico.**

3. Se le cellule geneticamente trasformate hanno acquisito la capacità di vivere in presenza dell'antibiotico ampicillina, cosa si può dire circa gli altri geni contenuti nel plasmide ed implicati nella trasformazione?

Il plasmide deve esprimere il gene per la resistenza all'ampicillina (l'enzima beta-lattamasi – la proteina prodotta dal gene *bla* – distrugge l'ampicillina).

4. Dai risultati ottenuti, come si può provare che i cambiamenti osservati siano realmente dovuti alla trasformazione?

Il modo migliore è quello di comparare il controllo con le altre piastre. Nella piastra LB/amp -pGLO, le cellule non crescono in presenza di ampicillina. Le cellule che hanno acquisito il plasmide possono crescere nelle piastre LB/amp +pGLO e LB/amp/ara +pGLO. Da ciò si deduce che il plasmide conferisce resistenza all'ampicillina

Lezione 3 domande di riepilogo

Cos'è che brilla?

1. Ricordare e descrivere cosa si è osservato esponendo a radiazione UV la soluzione contenente il plasmide pGLO.

La soluzione plasmidica non emette fluorescenza.

2. Quali possibili fonti di fluorescenza possono quindi essere scartate?

Il plasmide pGLO e il batterio originale non sono responsabili della fluorescenza.

3. Dopo la precedente osservazione, si può dedurre quale sia la fonte della fluorescenza?

La fluorescenza è probabilmente dovuta a qualche proteina codificata dal plasmide.

4. Descrivere la prova che testimonia se la trasformazione genetica ha avuto successo o meno.

La prova della riuscita consiste nell'ottenimento di colonie sulle piastre LB/amp +pGLO e LB/amp/ara +pGLO e l'assenza di esse sulla piastra LB/amp -pGLO. Inoltre le colonie sulla piastra LB/amp/ara +pGLO devono emettere fluorescenza verde.

L'insuccesso si traduce invece nell'assenza di colonie nelle piastre LB/amp +pGLO e LB/amp/ara +pGLO. Questo perché nel tubo +pGLO non sono stati aggiunti o il plasmide o le cellule da trasformare.

Lezione 3 domande di riepilogo

Interazione fra geni ed ambiente

Osservare nuovamente le quattro piastre. C'è crescita di cellule di *E. coli* sulle piastre che non contengono amp/ara?

Si. I batteri non trasformati possono crescere su queste piastre.

1. Dai risultati ottenuti si può dire se i batteri sono resistenti all'ampicillina, osservandoli nella piastra?

No. Non si può dedurre solo dall'osservazione se i batteri sono resistenti all'ampicillina. Sia i batteri resistenti che quelli sensibili hanno lo stesso aspetto nelle piastre. Considerare l'aspetto delle colonie nella piastra starter e nella piastra LB/amp +pGLO

2. Come si potrebbe modificare l'ambiente di crescita per poter affermare che i batteri sono resistenti all'ampicillina?

La prova migliore consiste nel trasferire su una piastra LB/amp batteri che sono cresciuti su una piastra di LB. Se i batteri sopravvivono, allora sono resistenti all'ampicillina. In caso contrario sono sensibili all'antibiotico.

3. Molto spesso un carattere di un organismo è dovuto ad una interazione fra i suoi geni e l'ambiente nel quale vive. Ragionare sulle cause responsabili del color verde assunto dai batteri geneticamente trasformati:

- a. Quali due fattori devono essere presenti nell'ambiente di crescita perché i batteri emettano fluorescenza verde? (suggerimento: un fattore è contenuto nella piastra e l'altro dipende dal modo in cui batteri vengono osservati).

Lo zucchero arabinosio nella piastra LB/amp/ara è indispensabile per attivare l'espressione del gene della GFP. La radiazione UV è necessaria perché la proteina GFP prodotta dal batterio emetta fluorescenza verde.

- b. Qual è il ruolo svolto dai due fattori ambientali elencati sopra, nel determinare la fluorescenza dei batteri geneticamente trasformati?

Lo zucchero arabinosio attiva l'espressione del gene della GFP interagendo con una proteina regolatrice, *araC*, che si lega al promotore *PBAD*. L'arabinosio (quando è presente) si lega ad *araC*, la quale cambia così di conformazione facilitando la trascrizione del gene da parte della RNA polimerasi (maggiori dettagli nell'appendice D). La radiazione UV eccita la molecola della GFP che libera poi energia sotto forma di luce verde.

- c. Quale vantaggio potrebbe conferire ad un organismo un meccanismo di attivazione/inibizione di certi geni in risposta a particolari stimoli?

La regolazione genica permette all'organismo di adattarsi a differenti condizioni e di evitare una dannosa produzione di proteine non necessarie. Buoni esempi di geni altamente regolati sono quelli codificanti per gli enzimi implicati nel catabolismo dei carboidrati. Se l'arabinosio è presente nel terreno di crescita, risulta vantaggioso per il batterio produrre gli enzimi necessari per degradare lo zucchero. Per contro, se l'arabinosio non è presente nell'ambiente, sarebbe un dispendio di risorse produrre enzimi che non verrebbero utilizzati.

Lezione 4 ulteriore attività

1. **Determinare il numero totale delle cellule fluorescenti verdi.**

Avvicinare la lampada UV alla piastra LB/amp/ara. Si può assumere che ciascuna colonia presente sulla piastra derivi da una singola cellula. Via via che le singole cellule si moltiplicano, la loro progenie si accumula a formare una colonia. Il modo migliore per determinare il **numero totale delle cellule fluorescenti** è di contare le colonie presenti sulla piastra.

Riportare qui il numero.

Numero totale delle cellule = **190**

2. **Determinare la quantità del plasmide pGLO nelle cellule batteriche della piastra LB/amp/ara.**

Sono necessari due dati per determinare la quantità di pGLO nelle cellule batteriche presenti sulla piastra LB/amp/ara. **(a)** la quantità totale di plasmide all'inizio dell'esperimento e **(b)** la frazione di plasmide (contenuto nei batteri) presente nella piastra LB/amp/ara.

Dopo aver calcolato questo dato, occorre moltiplicare la **quantità totale di pGLO usato** nell'esperimento per la **frazione di plasmide** presente nella piastra LB/amp/ara. Il risultato corrisponde alla quantità di plasmide acquisito dalle cellule presenti sulla piastra LB/amp/ara

a. Determinare la quantità totale del plasmide pGLO

La quantità totale di pGLO con cui si è iniziato risulta dal prodotto della sua concentrazione per il volume totale usato.

$$\text{pGLO } (\mu\text{g}) = \text{concentrazione del plasmide } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volume del plasmide } (\mu\text{l})$$

Nell'esperimento la concentrazione del pGLO è di 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ogni μl contiene 0.08 μg di pGLO) ed il volume usato è di 10 μl . Calcolare la **quantità totale di pGLO usata nell'esperimento**.

Riportare qui il numero. Quantità totale di pGLO (μg) utilizzata = **0.8**

- Come si usa questo dato?

Questo numero va moltiplicato per la frazione di pGLO usato, determinando così la quantità totale di plasmide presente nella piastra.

b. Determinare la frazione del plasmide pGLO (contenuto nei batteri) presente nella piastra LB/amp/ara.

Poiché non tutto il plasmide pGLO usato per trasformare le cellule viene da queste acquisito, occorre trovare che frazione di plasmide è stata realmente trasferita nella piastra LB/amp/ara. Per fare ciò, si divide il volume di plasmide trasferito alla piastra LB/amp/ara per il volume totale di liquido contenuto nella microprovetta +pGLO. La formula per questo calcolo è:

$$\text{Frazione del plasmide pGLO usato} = \frac{\text{volume trasferito sulla piastra LB/amp/ara}}{\text{volume totale nella microprovetta +pGLO}}$$

Sono stati trasferiti 100 μl di cellule contenenti il plasmide dalla microprovetta +pGLO contenente 510 μl di liquido. Perché ci sono 510 μl totali di soluzione? Trovare nel protocollo sperimentale tutti i punti dove sono stati aggiunti liquidi alla microprovetta +pGLO e calcolare il volume finale in essa contenuto.

Usando la formula sopra riportata, calcolare la frazione di plasmide trasferita nella piastra LB/amp/ara.

Riportare qui il numero Frazione di DNA = **0.2**

- Come si usa questo dato?

Questo numero va moltiplicato per la quantità di plasmide usato per calcolare la quantità di pGLO trasferito su di una piastra.

Perciò, quanti microgrammi di plasmide sono stati trasferiti nelle piastre LB/amp/ara?

Per rispondere a questa domanda, bisogna moltiplicare la quantità totale di pGLO usata nell'esperimento per la frazione di plasmide trasferita nella piastra LB/amp/ara.

$$\text{Plasmide pGLO trasferito } (\mu\text{g}) = \text{quantità totale di plasmide usato } (\mu\text{g}) \times \text{frazione del plasmide}$$

Riportare qui il numero plasmide pGLO trasferito = **0,16**

- Che cosa ci dice questo numero?

Questo numero ci indica quanto plasmide pGLO è stato trasferito nella piastra.

Osservare tutti i calcoli svolti. Decidere quale dei numeri calcolati si ritrova nella tabella sottostante. Compilare la seguente tabella:

| | |
|---|------|
| numero di colonie sulla piastra LB/amp/ara | 190 |
| μg di plasmide pGLO trasferiti nelle piastre | 0,16 |

Usare i dati della tabella per calcolare l'efficienza di trasformazione del pGLO.

$$\text{Efficienza di trasformazione} = \frac{\text{numero totale di cellule cresciute sulla piastra}}{\text{quantità di DNA trasferita nella piastra}}$$

Riportare qui il numero

Efficienza di trasformazione = **1187 trasformati/μg**

Analisi

I calcoli dell'efficienza di trasformazione danno grandi numeri. Gli scienziati usano spesso un'abbreviazione matematica per indicare il risultato. P.es., se dal calcolo dell'efficienza di trasformazione si ottiene un valore di 1000 batteri/μg di plasmide, questo numero viene espresso come:

10³ trasformati/μg (10³ è un altro modo di dire 10 x 10 x 10 ovvero 1000)

- Come riportano gli scienziati il valore di 10000 trasformati/μg?

10⁴

- Nel caso di un'efficienza di **5000 batteri/μg**, come verrebbe espresso questo numero? Tale valore risulterebbe:

5,0 x 10³ trasformati/μg (5 volte 1000)

- Come riportano gli scienziati il valore di 40000 trasformati/μg?

4 x 10⁴

- Come viene riportato il valore di 2600 trasformati/μg?

2,6 x 10³ trasformati/μg (2,6 volte 1000)

In modo simile:

5600 = 5,6 x 10³

271000 = 2,7 x 10⁵

2420000 = 2,42 x 10⁶

- Come riportano gli scienziati il valore di 960000 trasformati/μg?

9,6 x 10⁵

- Riportare il valore dell'efficienza di trasformazione precedentemente calcolato.

1,2 x 10³ trasformati/μg

- Spiegare cosa significa "efficienza di trasformazione".

L'efficienza di trasformazione è un valore quantitativo che esprime con che efficacia sia stato introdotto il plasmide nei batteri. Questo dato rappresenta il numero di cellule trasformate per microgrammo di DNA plasmidico usato.

Gli scienziati sono d'accordo sul fatto che il protocollo usato in questo esperimento normalmente ha un'efficienza di trasformazione compresa fra 8,0 x 10² e 7,0 x 10³ per microgrammo di DNA.

- Concorda l'efficienza di trasformazione calcolata con quella indicata dagli scienziati?

L'efficienza calcolata (1,2 x 10³) è in accordo con i limiti previsti dagli scienziati

- Nella tabella seguente, trascrivere i valori dell'efficienza di trasformazione calcolata dai vari gruppi della classe.

| <u>Gruppo</u> | <u>Efficienza</u> |
|---|-------------------|
| Si possono avere diversi risultati | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

- Concorde l'efficienza di trasformazione calcolata dal vostro gruppo con quella ottenuta dagli altri?

Si possono avere diversi risultati.

- Calcolare l'efficienza di trasformazione del seguente esperimento usando le informazioni e i dati riportati di seguito.

| | |
|---|-------------------|
| Concentrazione del DNA plasmidico | 0,08 µg/µl |
| Soluzione di trasformazione CaCl₂ | 250 µl |
| Soluzione contenente il plasmide | 10 µl |
| LB liquido | 250 µl |
| Cellule trasferite nelle piastre | 100 µl |
| Numero di colonie trasformate | 227 |

Compila la seguente tabella e mostra i calcoli all'istruttore

| | |
|--|-------------------|
| Numero di colonie sulla piastra LB/amp/ara | 227 |
| Microgrammi di DNA plasmidico trasferiti sulle piastre | 0,16 |
| Efficienza di trasformazione | $1,4 \times 10^3$ |

- Calcolo ulteriore

Se di un esperimento si è calcolata un'efficienza di trasformazione di 3×10^3 batteri/µg di DNA plasmidico, quante colonie trasformate ci si aspetta che crescano sulla piastra LB/amp/ara? Assumere che la concentrazione del plasmide e la frazione di cellule trasferite sulla piastra siano le stesse dell'esperimento condotto con il pGLO.

Efficienza di trasformazione = n° di colonie/DNA plasmidico trasferito sulla piastra (µg)

$$3,0 \times 10^3 = X/0,16$$

$$(3,0 \times 10^3) (0,16) = X$$

$$480 = X$$

480 colonie trasformate

Manuale dello studente

trasformazione con pGLO

Lezione 1 Introduzione alla trasformazione

Questo esperimento consiste nell'esecuzione di una procedura nota col nome di trasformazione batterica. Ricordare che un gene è un frammento di DNA che porta le istruzioni (cioè codifica) per la produzione di una proteina. Questa proteina conferisce all'organismo un particolare carattere. La trasformazione batterica consiste di fatto in un cambiamento apportato da un (dei) nuovo(i) gene(i) inserito(i) ex novo nell'organismo al fine di modificarne un (dei) carattere(i). La trasformazione genetica in molti settori biotecnologici. In agricoltura, geni codificanti per caratteri quali la resistenza alle basse temperature, ai parassiti, ai fitofarmaci possono essere trasferiti alle piante. Per il recupero ambientale, p. es. di tratti di costa colpiti da "maree nere", certi batteri possono essere trasformati con geni che li rendano capaci di degradare gli idrocarburi. In medicina, con la terapia genica, l'uomo sta iniziando a trovare la cura per sconfiggere certe malattie ereditarie; nell'individuo malato vengono trasformate le cellule che posseggono il gene anomalo, con copie funzionanti del gene stesso.

Verrà applicata una tecnica per trasformare i batteri con il gene codificante per la Green Fluorescent Protein (GFP, ovvero proteina fluorescente verde). Il gene, in natura, appartiene al genoma di *Aequorea victoria*, una medusa bioluminescente. La GFP è responsabile della bioluminescenza e fa sì che la medusa brilli nel buio. A seguito della trasformazione i batteri esprimeranno il gene della medusa e produrranno la GFP, emettendo luce verde quando colpiti da radiazione UV.

Questa esperienza tratta del processo di trasferimento di geni da un organismo ad un altro, mediato da plasmidi. I batteri, in aggiunta ad un lungo cromosoma, possono contenere, uno o più strutture di DNA circolari, chiamate plasmidi. Il DNA plasmidico contiene normalmente geni codificanti per caratteri che possono essere utili per la sopravvivenza del batterio. In natura i batteri possono trasferire o ricevere plasmidi, rendendo possibile la condivisione di caratteristiche vantaggiose. Sfruttando questo meccanismo naturale, i batteri possono rapidamente adattarsi a cambiamenti ambientali e/o nuovi ambienti. Un esempio è dato dall'insorgere dell'antibiotico-resistenza, che rende vano il trattamento con un determinato antibiotico; ciò avviene in seguito al diffondersi nella popolazione batterica del plasmide codificante la antibiotico-resistenza.

Il plasmide pGLO della Bio-Rad codifica per il gene della GFP ed il gene della resistenza all'antibiotico ampicillina. Il pGLO contiene anche un particolare sistema di regolazione genica che può essere usato per regolare la produzione di proteina fluorescente nelle cellule trasformate. Il gene della GFP può essere "acceso" nelle cellule trasformate aggiungendo lo zucchero arabinosio al terreno di crescita. La selezione delle cellule trasformate avviene mediante crescita su terreno contenente l'antibiotico. Le cellule trasformate appaiono bianche (fenotipo selvaggio o wild-type), in piastre con sola ampicillina ma diventano fluorescenti se cresciute in presenza di arabinosio.

Verranno fornite le attrezzature ed il protocollo per eseguire l'esperimento.

Questa esperienza consiste nel:

1. Compire la trasformazione batterica
2. Determinare il grado di successo con cui si è trasformato geneticamente un organismo.

Lezione 1 Domande di ripasso

Ci sono molte considerazioni da fare nella pianificazione di un progetto di investigazione scientifica di laboratorio. Ne vengono elencate alcune di seguito, per valutarne l'importanza, prima di procedere nell'esperimento di trasformazione.

Dal momento che le indagini di laboratorio sono finalizzate all'acquisizione di dati necessari per rispondere a precise domande, il primo passo potrebbe essere quello di formulare un quesito relativo all'esperimento.

Considerazione 1: si può trasformare geneticamente un organismo? Se sì, quale?

1. Per trasformare geneticamente un organismo, si deve inserire il nuovo gene in tutte le cellule che lo compongono. Quale organismo è più indicato per una trasformazione genetica totale? Un organismo pluricellulare o uno costituito da una sola cellula?

2. Gli scienziati spesso vogliono sapere se gli organismi geneticamente trasformati possono trasmettere i loro nuovi caratteri alla successive generazioni. Per sapere ciò, quale potrebbe essere il miglior candidato per la vostra ricerca: un organismo che si sviluppa e si riproduce velocemente o uno più lento?

3. La sicurezza nell'operare è un altro importante parametro da considerare nella scelta dell'organismo. Che caratteri (o caratteristiche) deve (o non deve) possedere per essere sicuri che non sia pericoloso per gli altri viventi o per l'ambiente?

4. Considerando quanto detto, quale potrebbe essere l'organismo più indicato per una trasformazione genetica? Un batterio, un lombrico, un pesce o un topo? Spiega le ragioni della tua scelta.

Considerazione 2: come si può dire se le cellule sono state geneticamente trasformate

Ricordare che il fine della trasformazione genetica è quello di cambiare uno o più caratteri (fenotipo) di un organismo. Prima che qualsiasi cambio nel fenotipo di un organismo sia rilevato, occorre fare un'approfondita analisi del suo fenotipo normale, prima della trasformazione.

Osservare le colonie di *E. coli* nelle piastre starter ed elencare tutti i caratteri o le caratteristiche osservabili, che possono essere descritti:

Le osservazioni su *E. coli* precedenti alla trasformazione possono fornire indicazioni di base utili per rinvenire eventuali cambiamenti nelle cellule trasformate.

a) numero di colonie

b) dimensioni: 1) della colonia più grande
 2) della colonia più piccola
 3) della maggior parte delle colonie

c) colore delle colonie

d) distribuzione delle colonie sulla piastra

e) aspetto osservabile quando esposte a radiazione ultravioletta

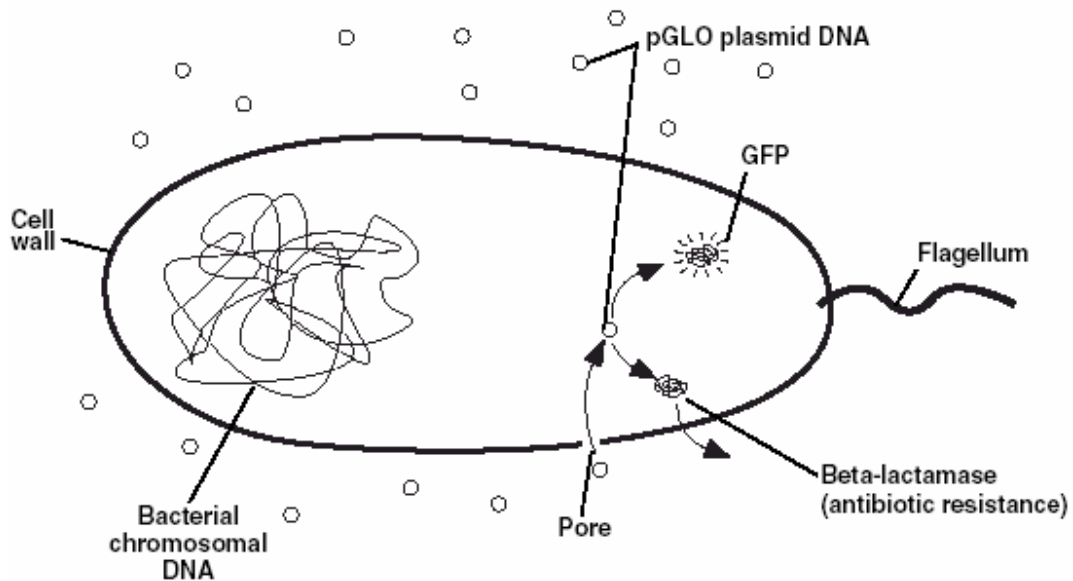
f) capacità delle cellule di vivere e riprodursi in presenza di un antibiotico, come l'ampicillina.

1. Descrivere come si potrebbero usare due piastre di LB, *E. coli* e l'ampicillina per determinare quanto il batterio sia sensibile a questo antibiotico.

2. Che risultati sperimentali ti aspetteresti per avere un'indicazione circa l'effetto dell'ampicillina su *E. coli*?

Considerazione 3: i geni

La trasformazione genetica consiste nell'inserimento di un nuovo tratto di DNA nelle cellule di *E. coli*. I batteri, in aggiunta ad un lungo cromosoma, possono contenere, uno o più strutture di DNA circolari, chiamate plasmidi. Il DNA plasmidico contiene normalmente geni codificanti per più di un carattere. Gli scienziati usano una metodologia chiamata ingegneria genetica per inserire nei plasmidi geni codificanti per nuovi caratteri. In questo caso il plasmide pGLO reca il gene GFP che codifica per la proteina GFP ed un gene (*bla*) che fa produrre al batterio una proteina che gli conferisce resistenza all'ampicillina. Il plasmide ingegnerizzato può così essere usato per trasformare batteri e conferirgli nuovi caratteri.



Considerazione 4: la procedura di trasformazione

La procedura di trasformazione si svolge principalmente in tre momenti, che hanno lo scopo di introdurre il plasmide nelle cellule di *E. coli* e di creare un ambiente nel quale i batteri possano esprimere il gene acquisito.

Per far passare il plasmide pGLO attraverso la membrana cellulare si deve:

1. Utilizzare la soluzione di trasformazione di CaCl_2 (Cloruro di Calcio)
2. Eseguire una procedura conosciuta come shock termico

Per far crescere le cellule trasformate in presenza di ampicillina, si deve:

3. Fornire ai batteri i nutrienti e lasciar trascorrere un breve periodo di incubazione per permettere la produzione della proteina per l'ampicillina-resistenza.

Lezione 2 attività di laboratorio

Lista di controllo delle postazioni (X)

Postazione degli studenti. Sono più sotto elencati i materiali e le attrezzature di cui ogni postazione deve essere dotata prima dell'inizio dell'esperimento.

| Postazioni degli studenti | Numero richiesto | (X) |
|---|------------------------|--------------------------|
| Piastra starter di <i>E. coli</i> (LB) | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Piastre con agar (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara) | 4 | <input type="checkbox"/> |
| Soluzione di trasformazione | 1 | <input type="checkbox"/> |
| LB liquido | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Anse per inoculare | 7 (1 confezione da 10) | <input type="checkbox"/> |
| Pipette | 5 | <input type="checkbox"/> |
| Portaprovette in schiuma | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Bicchieri di plastica con ghiaccio | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Pennarello | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Copia della guida rapida | 1 | <input type="checkbox"/> |

Postazione dell'istruttore (comune). Più sotto sono anche elencati i materiali e le apparecchiature, condivise da tutti gli studenti, che devono essere disposti in un luogo accessibile a tutti

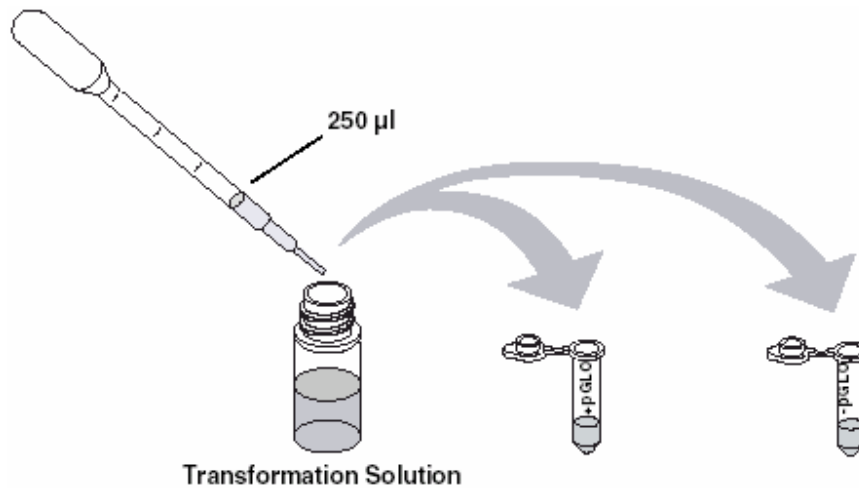
| | | |
|--|------------|--------------------------|
| Plasmide pGLO reidratato | 1 provetta | <input type="checkbox"/> |
| Bagno termostato a 42°C e termometro | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Incubatore a 37°C (opzionale, vedi Tecniche Generali di Laboratorio-Incubazione) | 1 | <input type="checkbox"/> |

Procedura di trasformazione

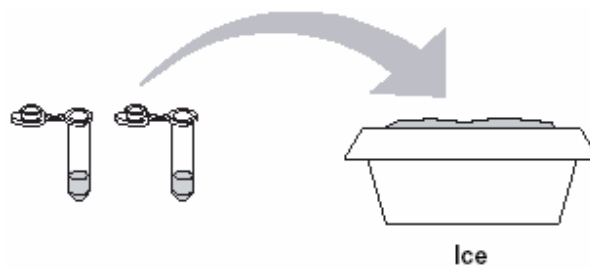
1. Marcare una microprovetta chiusa con **+pGLO** ed un'altra con **-pGLO**. Marcare entrambe le microprovette con il nome del gruppo di appartenenza. Inserirli nel portaprovette in schiuma.



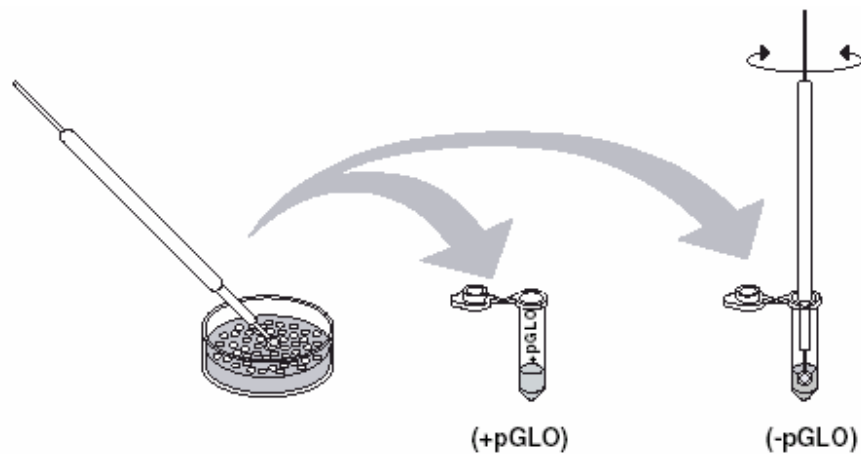
2. Aprire le microprovette ed utilizzando una pipetta sterile, trasferire 250 µl di soluzione di trasformazione (CaCl₂).



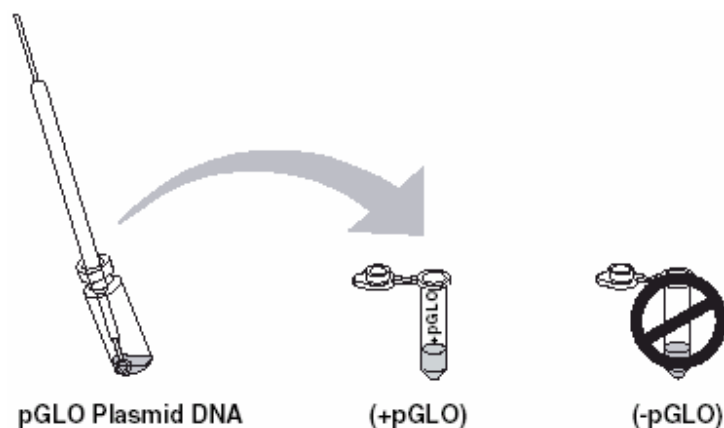
3. Mettere le microprovette in ghiaccio.



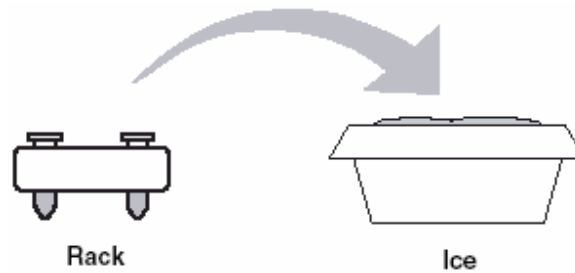
4. Prelevare con un'ansa sterile **una singola colonia batterica** dalla piastra starter. Prendere la microprovetta **+pGLO** ed immergere l'ansa nella soluzione di trasformazione. Far ruotare fra pollice ed indice l'ansa per risospendere nel liquido le cellule. Chiudere la microprovetta e rimetterla nel portaprovette in ghiaccio. Utilizzando una nuova ansa sterile, ripetere con la provetta **-pGLO**. l'operazione



5. Esaminare la microprovetta contenente il plasmide pGLO con la lampada UV. Annotare l'osservazione. Immergere **una nuova ansa sterile** nella microprovetta e, dopo averla estratta, assicurarsi che si sia formato un velo di liquido nell'anello, come succede quando si fanno le bolle col sapone. Immergere l'ansa sterile nella microprovetta **+pGLO** e mescolare la sospensione cellulare. Chiudere la microprovetta e rimetterla nel portaprovette in ghiaccio. Chiudere anche la microprovetta **-pGLO**. **Non aggiungere** plasmide nella microprovetta **-pGLO**. Perché?



6. Incubare le microprovette in ghiaccio per 10 minuti. Assicurarsi di inserirle fino in fondo nel portaprovette cosicché le loro estremità entrino in contatto col ghiaccio.



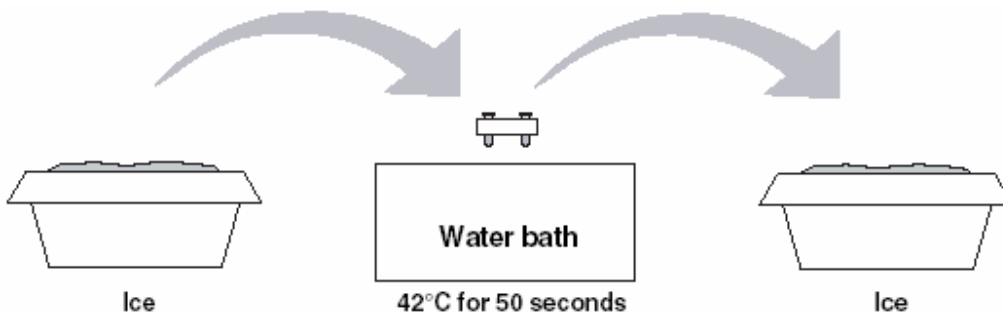
7. Mentre I tubi sono in ghiaccio marcare le 4 piastrine sul fondo (non sul coperchio) come segue:

- una piastra **LB/amp** con **+pGLO**
- la piastra **LB/amp/ara** con **+pGLO**
- l'altra piastra **LB/amp** con **-pGLO**
- la piastra **LB** con **-pGLO**

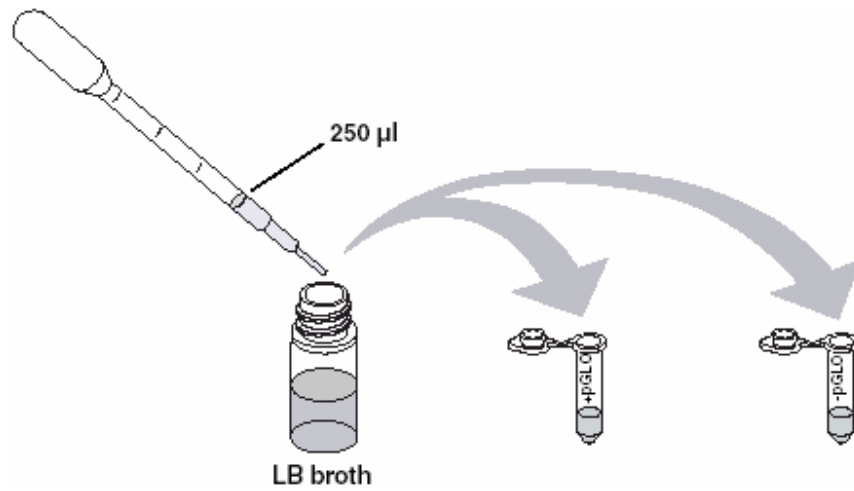


8. **Shock termico.** Trasferire il portaprovette con tutte le provette inserite nel bagno termostatico a 42 °C e lasciarle per 50 secondi esatti. Assicurarsi che le microprovette siano inserite fino in fondo nel portaprovette cosicché le loro estremità entrino in contatto con l'acqua calda.

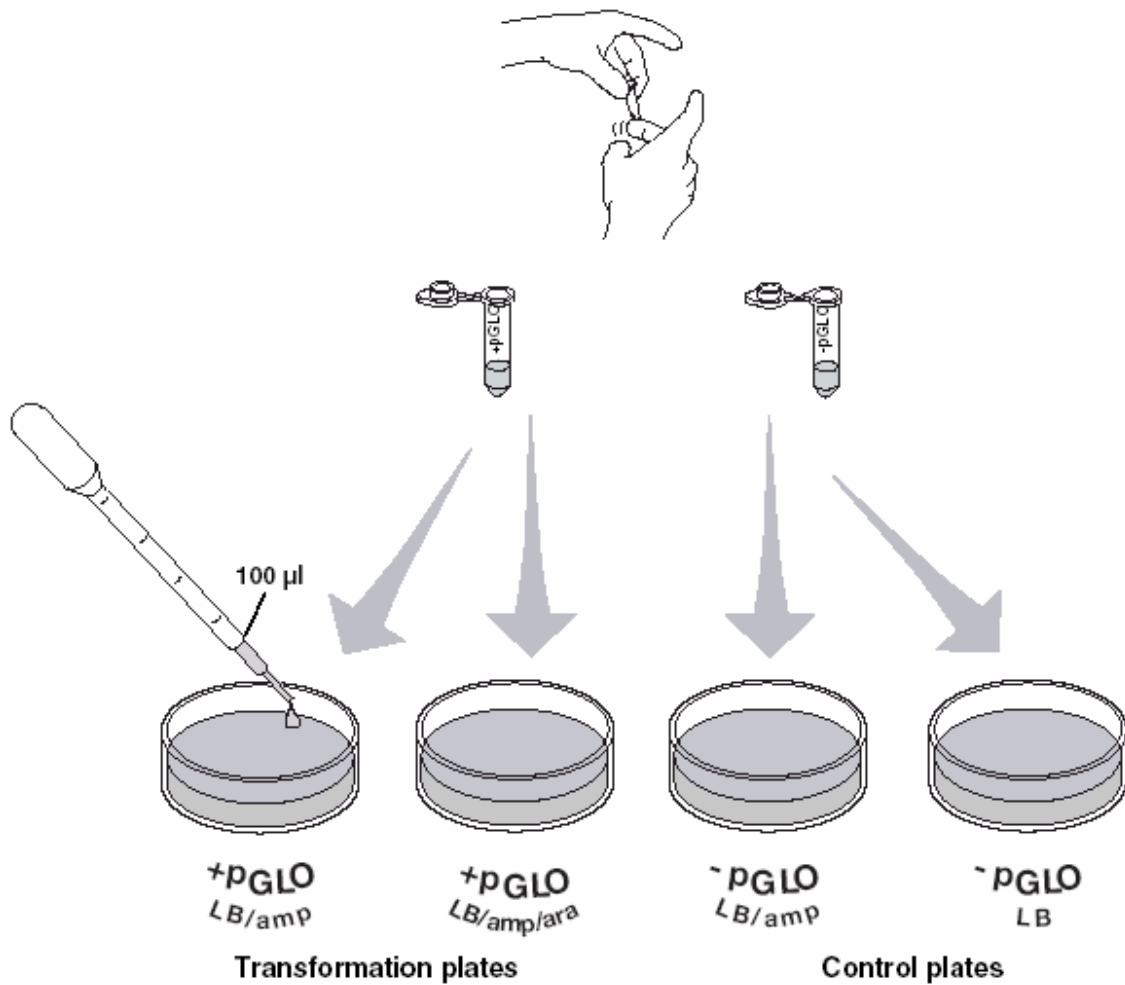
Trascorsi i 50 secondi, riportare le microprovette in ghiaccio e lasciarle per 2 minuti. Per un'ottimale trasformazione, i passaggi ghiaccio–acqua calda e viceversa devono essere rapidi.



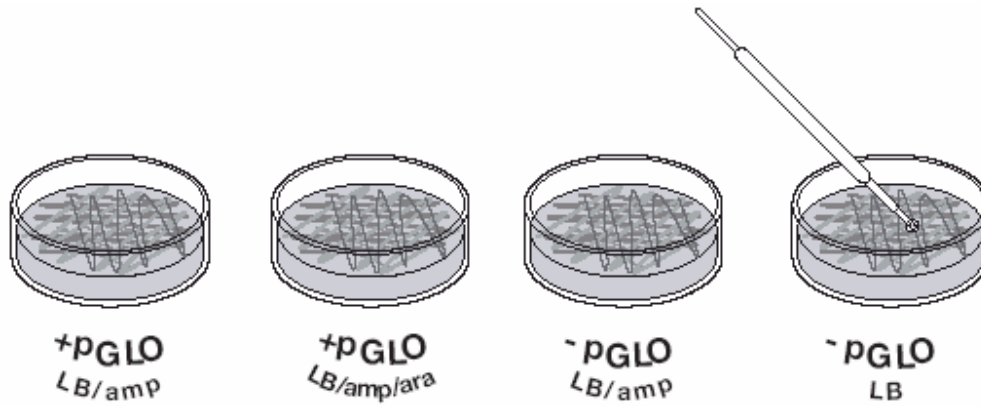
9. Rimuovere il portaprovette con le microprovette dal ghiaccio ed appoggiarlo sul bancone. Aprire le microprovette ed aggiungere 250µl di LB liquido in ciascuna di esse, utilizzando ogni volta una nuova pipetta sterile. Chiudere le microprovette ed incubarle per 10 minuti a temperatura ambiente.



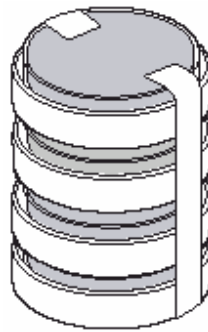
10. Tenendo le microprovette in prossimità della parte superiore, agitarle per risospendere le cellule. Trasferire 100 µl da ciascuna microprovetta nelle rispettive piastre, utilizzando per ogni microprovetta una nuova pipetta sterile.



11. Usando **una nuova ansa sterile per ogni piastra**, spargere il liquido trasferito su tutta la superficie dell'agar. Ciò si ottiene strisciando delicatamente l'ansa avanti e indietro su tutta la superficie della piastra. **NON PREMERE TROPPO SULLA SUPERFICIE DELL'AGAR.**



12. Impilare le 4 piastre e unirle con lo scotch. Mettere il nome del proprio gruppo e la data dell'esperimento sul fondo della pila e porla **capovolta** nell'incubatore a 37°C fino al giorno successivo.



Lezione 2 Domande di riepilogo

Nome _____

Prima di raccogliere i dati e analizzare i risultati, rispondere alle seguenti domande.

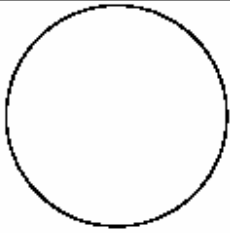
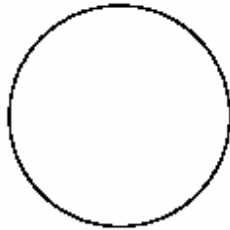
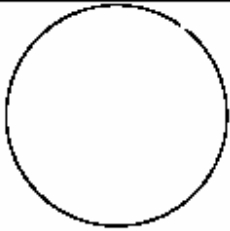
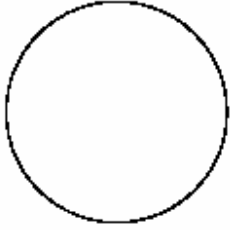
1. Su quale delle piastre ci si aspetta di trovare colonie batteriche più simili a quelle precedentemente osservate, prodotte da *E. coli* non trasformato? Spiega le tue previsioni.
2. Se ci sono cellule batteriche geneticamente trasformate, su quale(i) piastra(e) si troveranno? Spiega le tue previsioni.
3. Quali piastre devono essere confrontate per determinare se ha avuto luogo una trasformazione genetica? Perché?
4. Cosa si intende per piastra di controllo? A cosa serve il controllo?

Lezione 3 Raccolta dei dati e loro analisi

A. Raccolta dei dati

Osservare alla normale luce ambiente i risultati ottenuti nell'esperimento di trasformazione poi oscurare il locale ed esporre le piastre a radiazione UV.

1. Osservare attentamente e disegnare cosa si vede su ciascuna delle quattro piastre. Mettere i disegni nella colonna di destra della tabella dei dati. La raccolta dei dati permette di comparare le osservazioni eseguite sulle cellule "+pGLO" con quelle relative ad *E. coli* non trasformato. Riportare le seguenti osservazioni per ciascuna piastra.
2. Quanta crescita batterica si osserva su ciascuna piastra, in termini relativi?
3. Di che colore sono i batteri?
4. Quante colonie batteriche ci sono su ciascuna piastra (contare i punti visibili).

| Osservazioni | |
|----------------------|--|
| Piastre trasformate | +pGLO LB/amp  |
| | +pGLO LB/amp/ara  |
| Piastre di controllo | -pGLO LB/amp  |
| | -pGLO LB  |

B. Analisi dei risultati

Lo scopo dell'analisi dei dati per questo esperimento è di determinare se la trasformazione genetica è avvenuta.

1. Quale dei caratteri di *E. coli* precedentemente osservati non appaiono cambiati? Nello spazio sottostante elencare i caratteri non trasformati e motivare le ragioni della loro scelta.

Carattere originale

Analisi dell'osservazione

2. Dei caratteri di *E. coli* originariamente osservati, quale appare cambiato dopo aver eseguito l'esperimento di trasformazione? Elencare i caratteri e descrivere i cambiamenti osservati.

Nuovo carattere

Cambiamento osservato

3. Se le cellule geneticamente trasformate hanno acquisito la capacità di vivere in presenza dell'antibiotico ampicillina, cosa si può dire circa gli altri geni contenuti nel plasmide utilizzato per la trasformazione?

4. Dai risultati ottenuti, come si può provare che i cambiamenti osservati siano realmente dovuti alla trasformazione?

Lezione 3 Domande di riepilogo

Nome _____

Cos'è che brilla?

Se le colonie di *E. coli* emettono una fluorescenza verde, sorge allora una domanda: "Quali sono le due possibili fonti di fluorescenza nelle colonie esposte a raggi UV?"

Spiegare:

1. Ricordare e descrivere cosa si è osservato esponendo a radiazione UV la soluzione contenente il plasmide pGLO.
2. Quali possibili fonti di fluorescenza possono quindi essere scartate?
3. Dopo la precedente osservazione, si può dedurre quale sia la fonte della fluorescenza?

4. Descrivere la prova che testimonia se la trasformazione genetica ha avuto successo o meno.

Lezione 3 Domande di riepilogo

Nome _____

Interazione fra i geni e l'ambiente

Osservare nuovamente le quattro piastre. C'è crescita di cellule di *E. coli* sulle piastre che non contengono amp/ara?

1. Dai risultati ottenuti si può dire se i batteri sono resistenti all'ampicillina, osservandoli nella piastra?
2. Come si potrebbe modificare l'ambiente di crescita per poter affermare che i batteri sono resistenti all'ampicillina?
3. Molto spesso un carattere di un organismo è dovuto ad una interazione fra i suoi geni e l'ambiente nel quale vive. Ragionare sulle cause responsabili del color verde assunto dai batteri geneticamente trasformati:
 - a. Quali due fattori devono essere presenti nell'ambiente di crescita perché i batteri emettano fluorescenza verde? (suggerimento: un fattore è contenuto nella piastra e l'altro dipende dal modo in cui batteri vengono osservati).
 - b. Qual è il ruolo svolto dai due fattori ambientali elencati sopra, nel determinare la fluorescenza dei batteri geneticamente trasformati?
 - c. Quale vantaggio potrebbe conferire ad un organismo un meccanismo di attivazione/inibizione di certi geni in risposta a particolari stimoli?

Lezione 4 Ulteriore attività: calcolo dell'efficienza di trasformazione

Il prossimo passo in questo esperimento sarà quello di imparare a determinare l'efficacia con cui è stato trasformato *E. coli*. Questo valore quantitativo prende il nome di efficienza di trasformazione.

In molti esperimenti, è fondamentale trasformare più cellule possibile. P.es. , in certi tipi di terapia genica le cellule, prelevate dal paziente, vengono poi trasformate in laboratorio e quindi trasferite nuovamente nel paziente. Più cellule che producono la proteina necessaria vengono prodotte con la trasformazione, migliore sarà l'esito dell'intervento. L'efficienza di trasformazione viene calcolata per aiutare gli scienziati a capire il grado di riuscita del processo.

Lo scopo

Verrà calcolata l'efficienza di trasformazione, valore che da un'indicazione dell'efficacia con cui molecole di DNA vengono introdotte nelle cellule batteriche. L'efficienza di trasformazione è espressa da un numero che rappresenta il numero totale di cellule batteriche che esprime la proteina verde, divisa per la quantità di DNA plasmidico usato nell'esperimento (definisce la quantità totale di cellule trasformate per microgrammo di DNA). L'efficienza di trasformazione si calcola con la seguente formula:

$$\text{Efficienza di trasformazione} = \frac{\text{numero totale di cellule cresciute sulla piastra}}{\text{quantità di DNA trasferita nella piastra (in } \mu\text{g)}}$$

Perciò, prima di calcolare l'efficienza di trasformazione, sono necessari due dati:

- (1) **Il numero totale di colonie fluorescenti verdi cresciute sulla piastra LB/amp/ara.**
- (2) **La quantità totale di plasmide pGLO all'interno delle cellule batteriche piastrate nella piastra LB/amp/ara.**

1. Determinare il numero totale di cellule fluorescenti verdi

Avvicinare la lampada UV alla piastra LB/amp/ara. Si può assumere che ciascuna colonia presente sulla piastra derivi da una singola cellula. Via via che le singole cellule si moltiplicano, la loro progenie si accumula a formare una colonia. Il modo migliore per determinare il **numero totale delle cellule fluorescenti** è di contare le colonie presenti sulla piastra.

Riportare qui il numero. → Numero totale delle cellule = _____

2. Determinare la quantità di plasmide pGLO nelle cellule batteriche della piastra LB/amp/ara.

Sono necessari due dati per determinare la quantità di pGLO nelle cellule batteriche presenti sulla piastra LB/amp/ara. (a) la quantità totale di plasmide all'inizio dell'esperimento e (b) la frazione di plasmide (contenuto nei batteri) presente nella piastra LB/amp/ara.

Dopo aver calcolato questo dato, occorre moltiplicare la **quantità totale di pGLO** usato nell'esperimento per la **frazione di plasmide** presente nella piastra LB/amp/ara. Il risultato corrisponde alla quantità di plasmide acquisito dalle cellule presenti sulla piastra LB/amp/ara.

a. Determinare la quantità totale del plasmide pGLO.

La quantità totale di pGLO con cui si è iniziato risulta dal prodotto della sua concentrazione per il volume totale usato.

$$\text{pGLO } (\mu\text{g}) = \text{concentrazione del plasmide } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volume del plasmide } (\mu\text{l})$$

Nell'esperimento la concentrazione del pGLO è di 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ogni μl contiene 0.08 μg di pGLO) ed il volume usato è di 10 μl . Calcolare la **quantità totale di pGLO** usata nell'esperimento.

Riportare qui il numero. → Quantità totale di pGLO (μg) utilizzata = _____

- Come si usa questo dato?

b. Determinare la frazione del plasmide pGLO (contenuto nei batteri) presente nella piastra LB/amp/ara.

Poiché non tutto il plasmide pGLO usato per trasformare le cellule viene da queste acquisito, occorre trovare che frazione di plasmide è stata realmente trasferita nella piastra LB/amp/ara. Per fare ciò, si divide il volume di plasmide trasferito alla piastra LB/amp/ara per il volume totale di liquido contenuto nella microprovetta +pGLO. La formula per questo calcolo è:

$$\text{Frazione del plasmide pGLO usato} = \frac{\text{volume trasferito sulla piastra LB/amp/ara}}{\text{volume totale nella microprovetta +pGLO}}$$

Sono stati trasferiti 100 μl di cellule contenenti il plasmide dalla microprovetta +pGLO contenente 510 μl di liquido. Perché ci sono 510 μl totali di soluzione? Trovare nel protocollo sperimentale tutti i punti dove sono stati aggiunti liquidi alla microprovetta +pGLO e calcolare il volume finale in essa contenuto.

Usando la formula sopra riportata, calcolare la **frazione di plasmide** trasferita nella piastra LB/amp/ara.

Riportare qui il numero. \rightarrow Frazione di DNA = _____

- Come si usa questo dato?

Perciò, quanti microgrammi di plasmide sono stati trasferiti nelle piastre LB/amp/ara?

Per rispondere a questa domanda, bisogna moltiplicare la **quantità totale di pGLO usata** nell'esperimento per la **frazione di plasmide** trasferita nella piastra LB/amp/ara.

Plasmide pGLO trasferito (μg) = quantità totale di plasmide usato (μg) \times frazione del plasmide

Riportare qui il numero. \rightarrow plasmide pGLO trasferito (μg) = _____

- Che cosa ci dice questo numero?

Osservare tutti i calcoli svolti. Decidere quale dei numeri calcolati si ritrova nella tabella sottostante. Compila la seguente tabella:

numero di colonie sulla piastra LB/amp/ara = _____

μg di plasmide pGLO trasferiti nelle piastre = _____

Usare i dati della tabella per calcolare l'efficienza di trasformazione del pGLO.

$$\text{Efficienza di trasformazione} = \frac{\text{numero totale di cellule cresciute sulla piastra}}{\text{quantità di DNA trasferita nella piastra}}$$

Riportare qui il numero. \rightarrow Efficienza di trasformazione = _____ trasformati/ μg

Analisi

I calcoli dell'efficienza di trasformazione danno grandi numeri. Gli scienziati usano spesso un'abbreviazione matematica per indicare il risultato. P.es., se dal calcolo dell'efficienza di trasformazione si ottiene un valore di 1000 batteri/ μg di plasmide, questo numero viene espresso come:

10^3 trasformati/ μg (10^3 è un altro modo di dire $10 \times 10 \times 10$ ovvero 1000)

- Come riportano gli scienziati il valore di 10000 trasformati/ μg ?

Nel caso di un'efficienza di 5000 batteri/ μg , come verrebbe espresso questo numero? Tale valore risulterebbe:

$5,0 \times 10^3$ trasformati/ μg (5 volte 1000)

- Come riportano gli scienziati il valore di 40000 trasformati/ μg ?

Come viene riportato il valore di 2600 trasformati/ μg ?

$2,6 \times 10^3$ trasformati/ μg (2,6 volte 1000)

In modo simile:

$$5600 = 5,6 \times 10^3 \quad 271000 = 2,7 \times 10^5 \quad 2420000 = 2,42 \times 10^6$$

- Come riportano gli scienziati il valore di 960000 trasformati/ μg ?
- Riportare il valore dell'efficienza di trasformazione precedentemente calcolato.
- Spiegare cosa significa "efficienza di trasformazione".

Gli scienziati sono d'accordo sul fatto che il protocollo usato in questo esperimento normalmente ha un'efficienza di trasformazione compresa fra $8,0 \times 10^2$ e $7,0 \times 10^3$ per microgrammo di DNA.

- Concorda l'efficienza di trasformazione calcolata con quella indicata dagli scienziati?
- Nella tabella seguente, trascrivere i valori dell'efficienza di trasformazione calcolata dai vari gruppi della classe.

| <u>Gruppo</u> | <u>Efficienza</u> |
|---------------|-------------------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

- Concorda l'efficienza di trasformazione calcolata dal vostro gruppo con quella ottenuta dagli altri?
- Calcolare l'efficienza di trasformazione del seguente esperimento usando le informazioni e i dati riportati di seguito.

| | |
|---|-------------------|
| Concentrazione del DNA plasmidico | 0,08 µg/µl |
| Soluzione di trasformazione CaCl₂ | 250 µl |
| Soluzione contenente il plasmide | 10 µl |
| LB liquido | 250 µl |
| Cellule trasferite nelle piastre | 100 µl |
| Numero di colonie trasformate | 227 |

Compila la seguente tabella e mostra i calcoli all'istruttore

| | |
|--|---|
| Numero di colonie sulla piastra LB/amp/ara | = |
| Microgrammi di DNA plasmidico trasferiti sulle piastre | = |
| Efficienza di trasformazione | = |

- Calcolo ulteriore

Se di un esperimento si è calcolata un'efficienza di trasformazione di 3×10^3 batteri/µg di DNA plasmidico, quante colonie trasformate ci si aspetta che crescano sulla piastra LB/amp/ara? Assumere che la concentrazione del plasmide e la frazione di cellule trasferite sulla piastra siano le stesse dell'esperimento condotto con il pGLO.

Appendice A Legami storici con le biotecnologie

La trasformazione biologica ha un'interessante storia. Nel 1928 Frederick Griffith, un fisico londinese che stava lavorando in un laboratorio di patologia, fece un esperimento che non fu mai capace di interpretare pienamente: cambiò permanentemente (trasformò) un ceppo non patogeno del batterio *Pneumococcus*, facendolo diventare patogeno e letale. Griffith produsse questo interessante cambiamento nel batterio trattandone il ceppo innocuo con una coltura del ceppo letale ucciso col calore. La miscela dei due ceppi batterici, dove non c'erano più cellule virulente vive, era ancora in grado di uccidere i topi con essa inoculati. Egli ripeté più volte l'esperimento, ottenendo sempre lo stesso risultato. Ciò destò la perplessità sua e di molti suoi colleghi. Che cosa trasformò batteri innocui in killer letali? Molti anni dopo questo verrà riconosciuto come il primo caso di trasformazione biologica condotta in laboratorio anche se nessuno poté spiegarlo. Griffith non sapeva dell'esistenza del DNA, ma comprese che la trasformazione era ereditabile. Gli esperimenti di Griffith sulla trasformazione possono essere considerati come la nascita della manipolazione genetica, che ha in seguito prodotto la tecnologia del DNA ricombinante e aperto la strada alle biotecnologie e alle future prospettive della manipolazione genetica umana.

Nel 1944, 16 anni dopo l'esperimento di Griffith, un gruppo di ricerca dell'Istituto Rockefeller, guidato da Oswald T. Avery, pubblicò un articolo direttamente correlato al lavoro di Griffith. "Qual'è la sostanza responsabile?" Avery lo chiedeva ai suoi collaboratori. Lavorando con lo stesso ceppo batterico responsabile della polmonite, Avery ed il suo staff fornirono una interpretazione rigorosa a questa domanda. Essi provarono che tale sostanza era il DNA e che la trasformazione biologica avviene in cellule capaci di acquisire ed esprimere DNA estraneo. Anche se ci vollero molti anni perchè venisse accreditata l'ipotesi, ad Avery, è oggi universalmente attribuita questa fondamentale scoperta in campo biologico. Proseguendo il lavoro di Avery ed altri Douglas Hanahan, sviluppò la tecnica della trasformazione batterica utilizzata nel nostro esperimento.

Contesto storico

Trasformazione genetica

- 1865 - Gregor Johann Mendel. Mendel presenta le sue scoperte descrivendo i principi per cui i caratteri genetici vengono trasmessi dai genitori alle generazioni successive. Dai suoi esperimenti fu ricavato il concetto di gene quale unità ereditaria.
- 1900 - Carl Correns, Hugo De Vries, Erich Tschermak. Sono genetisti vegetali che conducendo studi sull'ereditarietà scoprono che i loro esperimenti altro non sono che un duplicato del lavoro eseguito quarant'anni prima sui piselli da un monaco agostiniano austriaco, Gregor Johann Mendel.
- 1928 - Frederick Griffith. Griffith trasforma un ceppo non patogeno di *Diplococcus pneumonia* in un ceppo letale, utilizzando batteri virulenti uccisi con il calore. Egli suggerisce che il fattore trasformante abbia qualcosa a che fare con la sintesi del polisaccaride della capsula. Griffith non conosceva il DNA, ma sapeva che la trasformazione era ereditabile.
Gli esperimenti di Griffith sulla trasformazione possono essere considerati come la nascita della manipolazione genetica, che ha in seguito prodotto la tecnologia del DNA ricombinante e aperto la strada alle future prospettive della manipolazione genetica umana.
- 1944 - Oswald Avery e Colin MacLeod. Avery e colleghi annunciano di aver isolato e altamente purificato il fattore trasformante, che è DNA. A partire da questo classico esperimento di genetica molecolare, la trasformazione, la coniugazione (l'accoppiamento batterico) e la traduzione (trasferimento di DNA virale) sono state usate per trasferire geni fra specie batteriche, in drosophila, nei topi, nelle piante e negli animali, nelle cellule di mammifero in coltura e per la terapia genetica umana.
- 1952 - Alfred Hershey e Martha Chase. Hershey e Chase usano zolfo e fosforo radioattivi ed il batteriofago T2 per dimostrare definitivamente che il DNA è la molecola che porta l'informazione ereditaria.
- 1972 - Paul Berg e Janet Mertz. Berg usa *EcoRI*, il primo enzima di restrizione scoperto, per tagliare il DNA del virus SV40 e del batteriofago P22, poi usa gli enzimi terminali trasferasi e DNA ligasi per riunire i frammenti separati in un unico pezzo di DNA. La creazione della prima molecola di DNA ricombinante fu l'inizio dell'era della biotecnologia. La nuova molecola non venne inserita in una cellula di mammifero per via dei dubbi nutriti dalla comunità scientifica sul trasferimento genetico.
- 1973 - Herbert Boyer, Stanley Cohen e Annie Chang. Berg, Boyer e Cohen usano *EcoRI* per isolare un gene completo per la resistenza a kanamicina. Boyer, Cohen e Chang inserirono poi il gene per la resistenza alla kanamicina in un plasmide tagliato con *EcoRI*, che già conteneva il gene per la resistenza a tetraciclina, ottenendo così una molecola plasmidica ricombinante con una doppia resistenza agli antibiotici. Con questo plasmide ingegnerizzato essi trasformarono *E. coli*.
- 1977 - Genentech, Inc. La Genentech annuncia l'ottenimento del primo prodotto dell'ingegneria genetica. Il gene per la somatostatina umana (fattore inibente il rilascio dell'ormone umano per la crescita) venne ottenuto a partire da batteri trasformati.
- 1980 - J. W. Gordon e Frank Ruddle. Gordon e Ruddle inseriscono con successo geni normali in cellule della linea germinale di topo, sfruttando la tecnica della microiniezione.

- 1982 - Richard Palmiter e Ralph Brinster. Palmiter e Brinster inseriscono con la microiniezione il gene per l'ormone della crescita del ratto in embrioni di topi. Questa è la prima "cura" genetica della linea germinale, riportata per un mammifero. Il topo ricevente fu soprannominato "piccolo", perché colpito da una forma congenita di nanismo.
- 1988 - Steven Rosenberg. Rosenberg ed i suoi colleghi ricevono il permesso di eseguire il primo esperimento di trasferimento genico su pazienti umani affetti da melanoma. Questo esperimento consisteva nell'uso di un tracciante genetico (il gene marker NeoR) e non si trattava di terapia genica.
- 1990 - W. French Anderson, Michael Blaese e Kenneth Culver. Alle 12:52 di venerdì 14 settembre 1990, al National Cancer Institute, una bambina di 4 anni, Ashanthi De Silva di Cleveland nell'Ohio è la prima persona sottoposta a terapia genica. Alla piccola paziente furono inoculate i suoi stessi globuli bianchi recanti il gene corretto della adenosina deaminasi (ADA). I dottori Anderson, Blaese e Culver non si aspettavano risultati significativi prima di un anno. Una seconda bambina, Cynthia Cutshall fu sottoposta ad una cura simile nel 1990. Immagini del giugno del 1993 mostravano le due bambine, sorridenti e piene d'energia, mentre giocavano a scuola; il sistema immunitario delle due bambine funzionava ora normalmente.
- 1994 - Altre patologie candidate per la terapia genica sono l'anemia falciforme, l'emofilia, il diabete, il cancro, e i disturbi cardiaci. La terapia genica basata sulla linea germinale viene discussa durante gli incontri del Recombinant DNA Advisory Committee. Dal 1996 un sempre crescente numero di proposte d'intervento attende il parere positivo dell' Human Gene Therapy Subcommittee of the Recombinant DNA Advisory Committee.
- 1995 - J. Craig Venter e collaboratori, all'Istituto per la Ricerca del Genoma (TIGR) in Maryland, pubblicano l'intera sequenza del cromosoma del batterio *Hemophilus influenzae*, una tappa storica nella ricerca microbiologica. Fu il primo organismo di cui si codificò l'intera informazione genetica.
- 1996 - Una collaborazione fra numerosi paesi, che coinvolge più di 100 laboratori fra Europa, USA, Canada e Giappone, porta, per la prima volta, al sequenziamento dell'intero genoma di un organismo eucariote, il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* è importante dal punto di vista commerciale, in quanto utilizzato per la panificazione e la preparazione di numerose bevande alcoliche; è inoltre usato nei laboratori di ricerca di tutto il mondo quale organismo modello per lo studio dei processi cellulari e molecolari negli eucarioti.
- 1997 - Scienziati condotti da Ian Wilmut allo Scotland's Roslin Institute clonano con successo una pecora, Dolly, a partire da una cellula adulta. Il clonaggio di Dolly accese un dibattito internazionale sugli aspetti etici e morali legati al clonaggio. Successivamente, sempre scienziati dello Scotland's Roslin Institute in collaborazione con la Scotland-based PPL Therapeutics, clonarono due pecore geneticamente modificate, Polly e Molly. Gli animali furono modificati geneticamente con un gene umano cosicché la relativa proteina (denominata fattore IX e coinvolta nella coagulazione del sangue), poteva essere estratta direttamente dal latte ed utilizzata per la cura di pazienti emofilici.
- 1998 - Viene sequenziato più del 99% del genoma del primo organismo pluricellulare, il nematode *Caenorhabditis elegans*. Sebbene *C. elegans* sia un organismo primitivo, ha molte delle sue caratteristiche genetiche e biologiche essenziali in comune con l'essere umano. Per questo torna utile agli scienziati per l'identificazione e caratterizzazione dei geni implicati in numerosi processi della biologia umana e nelle patologie ad essi correlati. Gli scienziati hanno redatto un'accurata e dettagliata mappa fisica (con relativi i loci) di più di 30000 geni umani conosciuti, una pietra miliare per il Progetto Genoma Umano.
- 2000 - Un team, guidato da Ingo Potrykus dello Swiss Federal Institute of Technology di Zurigo e Peter Beyer dell'Università di Friburgo, in Germania riportano la creazione del riso geneticamente modificato, denominato "golden rice", che può produrre grandi quantità di beta-carotene, una sostanza che l'organismo umano può trasformare in vitamina A. "Golden rice" può alleviare la cecità, dovuta a carenza di vitamina A, in milioni di abitanti di zone depresse del pianeta. Viene pubblicato il sequenziamento del genoma del moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, grazie ad una collaborazione fra una compagnia privata, Celera Genomics, e ricercatori di tutto il mondo impegnati nello studio di questo insetto. *D. melanogaster*, un organismo modello ampiamente studiato in laboratorio, è l'animale più grande il cui genoma sia stato fino ad oggi decifrato. Una "bozza preliminare" del genoma umano è stata completata da un team di 16 istituzioni internazionali appartenenti al Human Genome Sequencing Consortium. Anche ricercatori di Celera Genomics hanno annunciato il completamento di un primo "assemblaggio" del genoma umano.
- 2001 - Il 12 febbraio 2001, Celera Genomics e l'International Human Genome Sequencing Consortium annunciano insieme la pubblicazione della sequenza quasi completa del genoma umano, la "carta d'identità" genetica dell'essere umano. Questo traguardo impegnò il team internazionale per quasi 20 anni e richiese la collaborazione di centinaia di scienziati di tutto il mondo. Celera Genomics riportò di aver completato il lavoro in circa 9 mesi. I due gruppi differirono nella stima del numero di geni rinvenuti nel genoma umano ma l'intervallo, fra i 25000 e i 40000 geni previsto da entrambi, è minore del valore di 100000, risultante da stime precedenti. Questa inaspettata scoperta suggerisce che anche un'organismo tanto complesso quanto l'uomo può essere costituito da un numero relativamente basso di geni, p.es. solo la metà di quelli posseduti dal nematode *C. elegans* o dal moscerino *D. melanogaster*. La decifrazione dell'intera sequenza del genoma umano permetterà ai ricercatori di tutto il mondo di

sviluppare cure mediche per molte patologie. Il presidente George Bush ha deciso che potranno essere finanziati con fondi federali solo gli esperimenti riguardanti le 64 linee cellulari embrionali precoci tuttora esistenti. La decisione del presidente ha deluso molti scienziati che speravano di usare le cellule embrionali precoci per sviluppare cure contro molte malattie.

Una piccola compagnia del Massachusetts, la Advanced Cell Technology annuncia che sono stati clonati con successo embrioni umani, allo scopo di estrarre le loro cellule precoci. Questo metodo può essere usato per trattare pazienti con differenti patologie, rimpiazzando le cellule malate (p.es quelle nervose o muscolari), con cellule normali della stessa persona; verrebbe così evitato il rischio di un rigetto da parte del sistema immunitario.

La compagnia PPL Therapeutics, che collaborò nel progetto del clonaggio della pecora Dolly, annuncia che ha clonato cinque maialini geneticamente modificati, con un gene inattivato ("knock out" gene) in modo tale da rendere i loro organi meno "incompatibili" al trapianto nell'essere umano, diminuendo i rischi di rigetto. Il successo della PPL Therapeutics accende la speranza di migliaia di persone che stanno aspettando di ricevere organi da donatori, quali cuore, polmoni, reni e fegato.

2002 – La pecora Dolly, il primo mammifero ad essere stato clonato a partire da cellule adulte, sviluppa artrite all'età relativamente precoce di cinque anni. Non è chiaro se la malattia di Dolly sia il risultato di un difetto genetico dovuto al clonaggio o se si tratti di pura coincidenza. La notizia riaccende il dibattito sul fatto che gli animali clonati possano soffrire di invecchiamento precoce e sviluppare patologie e solleva critiche nei confronti di chi sostiene che il clonaggio possa fornire organi per i pazienti da sottoporre a trapianto.

Appendice B Glossario dei termini

| | |
|------------------------------|--|
| Agar | Costituisce una matrice solida su cui sviluppano i batteri. E' una miscela di nutrienti costituita da carboidrati, aminoacidi, nucleotidi, sali e vitamine. |
| Selezione antibiotica | Uso di un antibiotico per selezionare i batteri che contengono il DNA di interesse. Il plasmide pGLO contiene il gene per la proteina beta-lactamasi, che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina. I batteri trasformati con il pGLO iniziano a produrre e secernere la proteina. La beta.lactamasi degrada l'ampicillina, rendendo tale sostanza innocua per i batteri trasformati. Solo questi, che contengono il pGLO possono crescere e formare colonie su piastre contenenti ampicillina, mentre le cellule non trasformate, prive di pGLO, non possono crescere. |
| Arabinosio | Un carboidrato isolato da piante, normalmente usato quale fonte alimentare per i batteri. |
| Beta-lattamasi | Una proteina che induce resistenza all'antibiotico ampicillina. La beta-lactamasi è prodotta e secreta da batteri che sono stati trasformati con un plasmide contenente il gene per tale proteina. La beta-lactamasi prodotta inattiva l'ampicillina presente nell'agar nutritivo delle piastre, consentendo la crescita batterica e l'espressione dei geni acquisiti, anch'essi contenuti nel plasmide inserito (p. es. la GFP). |
| Biotechnologia | E' l'applicazione delle conoscenze biologiche al mondo reale. Consiste nella manipolazione, soprattutto a livello genetico, degli organismi viventi, al fine di ottenere prodotti potenzialmente utili. |
| Clonaggio | Un processo che, potenzialmente, produce un numero illimitato di copie (o cloni) di un organismo o di un tratto di DNA. Il clonaggio produce una popolazione geneticamente identica. |
| Colonia | Massa di cellule batteriche geneticamente identiche sviluppatasi sulla piastra a partire da un unico progenitore. Per questo motivo le cellule di una colonia singola sono dette cloni. |
| Terreni di coltura | I terreni liquidi e solidi denominati brodo LB (dagli scienziati Luria e Bertani) e agar LB sono composti da estratto di lievito e da un prodotto derivante dalla digestione enzimatica della carne, che fornisce una miscela di carboidrati, aminoacidi, nucleotidi, sali e vitamine, tutte sostanze necessarie per la crescita batterica. L'agar, estratto da alghe marine, polimerizza in forma di gel solido quando si raffredda dopo essere stato riscaldato; la sua funzione è quella di fornire un supporto solido per la crescita dei batteri. |
| Ingegneria genetica | La manipolazione del materiale genetico di un organismo (DNA) ottenuta introducendo o eliminando specifici geni. |

| | |
|--|--|
| Regolazione genica | L'espressione genica in tutti gli organismi viene attentamente regolata per adattarsi a differenti condizioni e per prevenire un'inutile produzione di proteine non necessarie o in eccesso. I geni implicati nel trasporto e nella degradazione del cibo sono un buon esempio di geni altamente regolati. Per esempio, lo zucchero semplice arabinosio può essere usato dai batteri quale fonte d'energia e carbonio. Gli enzimi batterici necessari per degradare o digerire l'arabinosio non sono prodotti in assenza dello zucchero. Al contrario, quando l'arabinosio è presente nell'ambiente, viene attivata la produzione degli enzimi degradativi. In altre parole, quando l'arabinosio è disponibile, i geni per la sua degradazione sono "accesi", ma vengono "spenti" quando esso si esaurisce. Vedere l'appendice D per una spiegazione più dettagliata del ruolo esercitato dall'arabinosio nella regolazione ed espressione del gene della GFP. |
| GFP - Proteina fluorescente verde | La GFP fu in origine isolata dalla medusa bioluminescente <i>Aequorea victoria</i> . Il gene della GFP è stato recentemente clonato. La particolare struttura tridimensionale della GFP fa sì che la sua molecola, quando colpita da radiazione ultravioletta, assorba energia e la liberi sotto forma di luce visibile verde. |
| Plasmide | È una molecola circolare di DNA, capace di autoreplicarsi. Esso trasporta, insieme ad uno o più geni codificanti proteine che inducono resistenza ad antibiotici, un gene estraneo clonato, come quello della GFP. |
| pGLO | Plasmide contenente il gene della GFP ed il gene della resistenza all'ampicillina, quest'ultimo codificante per la beta-lattamasi. |
| Tecnologia del DNA ricombinante | Processo che prevede il taglio e la ricombinazione di frammenti di DNA, allo scopo di isolare geni o di modificare la loro struttura e funzione. |
| Screening | Conduce all'isolamento dei batteri aventi la caratteristica desiderata, a partire da una "libreria" batterica |
| Tecnica sterile | Si applica per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione, durante l'esperimento, da parte di microrganismi indesiderati. Consiste nel rispettare la pulizia ed applicare attentamente le tecniche di laboratorio. |
| Inoculazione | Si ottiene strisciando, sulla superficie di una piastra, un'ansa per inoculare con la quale si sono prelevati batteri. |
| Vettore | Una molecola di DNA che si replica autonomamente, quale p.es un plasmide, nella quale frammenti estranei di DNA sono inseriti e poi propagati in una cellula ospite. |

Appendice C Concetti fondamentali e terminologia di biologia molecolare

Studiando il mondo vivente ci si rende conto che tutti gli organismi hanno una propria, unica organizzazione. Una dettagliata "carta d'identità" di questa organizzazione viene trasmessa alla discendenza.

La cellula è l'unità funzionale più piccola, capace di riproduzione autonoma. La maggior parte dei batteri sono organismi unicellulari e le molecole chimiche presenti al loro interno funzionano in modo coordinato.

Le cellule possono essere fatte crescere in coltura e poi raccolte

Le cellule possono essere prelevate dai loro tessuti di appartenenza e fatte crescere (coltivate) in laboratorio in appositi contenitori, dove le fonti alimentari e l'ambiente devono essere strettamente controllate. I batteri ed i lieviti sono molto facili da crescere in coltura. Vengono coltivate anche cellule provenienti da piante animali ed insetti, ma richiedono maggior cura e attenzione.

Quando la crescita delle cellule è completa, queste possono essere raccolte e studiate.

Clonaggio

Quando una popolazione di cellule è generata a partire da una singola cellula, ogni individuo della popolazione sarà geneticamente identico. Tale popolazione è detta clonale e il processo che conduce ad essa è detto clonaggio. Le piastre vengono inoculate con l'ansa per inoculare allo scopo di isolare singole cellule, da ognuna delle quali si genererà una colonia che costituisce una popolazione clonale.

Uno sguardo dentro alle cellule

Ogni molecola contenuta in una cellula svolge una specifica funzione. Le molecole di DNA, p.es., immagazzinano l'informazione (come il disco rigido di un computer). Le proteine svolgono il "lavoro pesante" della cellula.

Per studiare queste molecole si prepara una popolazione clonale da una cellula "tipo" di interesse, si disgregano le cellule e se ne libera il contenuto. Risulta relativamente facile separare il DNA dalle proteine così come separare una specifica proteina dall'insieme di tutte le proteine della cellula.

Ogni proteina possiede proprietà fisiche e chimiche (dimensioni, carica elettrica, idrofobicità) che la rendono unica e che vengono sfruttate per il suo isolamento.

Molecole particolari, funzioni specializzate

Osserviamo da vicino tre tipi molto speciali di molecole ritrovate all'interno delle cellule: il DNA, l'RNA e le proteine. Ognuna di queste molecole svolge una funzione differente. Le molecole di DNA sono come dei "file" nei quali è immagazzinata l'informazione. L'RNA aiuta a recuperare tale informazione ed esegue le istruzioni che sono riportate nel DNA. Le proteine si incaricano di svolgere funzioni chimiche dentro (e spesso fuori) la cellula.

DNA – La struttura universale che reca l'informazione biologica

Il codice principale di ciascun organismo è contenuto all'interno dell'acido deossiribonucleico (DNA). L'informazione nella/molecola/e del DNA di ciascuna cellula è sufficiente per iniziare ogni funzione che la cellula può svolgere.

Le molecole di DNA sono catene molto lunghe composte da unità ripetute. Ogni subunità (nucleotide) contiene una delle quattro possibili basi che sono da un suo lato:

| | |
|-------------|--------------|
| adenina (A) | citosina (C) |
| timina (T) | guanina (G) |

Poiché i nucleotidi sono uniti testa-coda, un lungo filamento di DNA consiste essenzialmente in una "impalcatura chimica" con basi che sporgono da un suo lato. L'informazione portata da questa molecola è codificata nella sequenza delle basi A, G, C e T che la compongono.

Ulteriori punti rilevanti della struttura del DNA

1. Siccome le subunità della catena del DNA sono unite testa-coda, la sequenza è direzionale, p.es. **GTCAA**. Per convenzione, si scrive la sequenza del DNA a partire dall'estremità libera 5' della catena verso l'estremità finale 3'.

Nell'esempio, 5'...**AACTG**...3'

2. Le basi che sporgono lungo la catena possono formare spontaneamente legami idrogeno con le basi disponibili sull'altro filamento del DNA, in accordo con il seguente appaiamento:

A si appaia con T

C si appaia con G

In ragione di questo, A e T sono dette basi complementari, così come pure G e C.

Perché due filamenti di DNA si possano appaiare, essi devono essere complementari, in direzione opposta.

Nell'esempio, (5'...**AGGTC**...3') si appaia con (5'...**GACCT**...3'). Questi due filamenti hanno sequenze complementari. Il prodotto a due filamenti appaiati viene indicato come:

5'... **AACTG**...3'

3'... **TTGAC**...5'

Così come la molecola dell'esempio (composta da solo cinque paia di basi), anche in natura il DNA esiste quasi sempre in forma di doppio filamento, composto da due catene di sequenza complementare.

3. Le molecole di DNA sono composte, normalmente, da migliaia fino a milioni di basi appaiate. A volte le due estremità della molecola sono unite a formare una struttura circolare di DNA.
4. Il DNA a doppio filamento, nella sua forma nativa, assume la forma di un' elica e siccome i filamenti sono due, la sua struttura è spesso detta "doppia elica".

L'architettura del DNA permette una strategia particolarmente semplice durante la duplicazione: i due filamenti di cui è composta la molecola si svolgono e si separano cosicché ogni catena da origine ad una copia complementare di se stessa; questo processo è portato a termine dall'enzima DNA polimerasi. Ciò da origine a due molecole figlie, ognuna a doppio filamento ed uguale alla molecola di partenza.

Le proteine e l'RNA svolgono i lavori pesanti nella cellula

La biochimica della vita richiede centinaia di interazioni chimiche molto specifiche ed efficienti, che si devono svolgere contemporaneamente. Gli attori più importanti in questo gioco di interazioni sono molecole a breve vita, quali RNA e proteine che possono lavorare congiuntamente o indipendentemente per svolgere una varietà di funzioni. Come il DNA, anche l'RNA e le proteine consistono di lunghe catene composte da unità ripetute.

RNA

L'RNA (acido ribonucleico), come il DNA, consiste di quattro tipi di unità ripetute a formare una catena. Le differenze con il DNA sono le seguenti:

Le quattro basi dell'RNA sono **A, G, C e U** (uracile); le regole di appaiamento sono le stesse del DNA ad eccezione che **A** si appaia con **U**. Sebbene l'RNA può appaiarsi con altro RNA complementare o con DNA, nelle cellule l'RNA è normalmente contenuto come singolo filamento. Lo zucchero contenuto nella catena dell'RNA è il ribosio e non il desossiribosio. Le molecole di RNA sono generalmente corte, se comparate con quelle di DNA; questo perché ogni molecola di RNA è la copia di un corto frammento di DNA. Il processo che porta alla produzione di RNA, a partire da DNA, è chiamato "trascrizione" ed è realizzato da una proteina chiamata RNA polimerasi.

Proteine

Le proteine (più precisamente i polipeptidi) sono sempre molecole a lunga catena, ma strutturalmente molto più complicate di quelle del DNA e dell'RNA. Ciò è dovuto al fatto che le subunità che compongono le proteine – gli aminoacidi – sono di venti diversi tipi. L'esatta sequenza degli aminoacidi lungo la catena polipeptidica determina come essa si ripiegherà nella sua struttura tridimensionale. Le caratteristiche assunte dalla struttura tridimensionale determinano poi la funzione della proteina.

Ciò che una proteina **può fare** dipende direttamente dall'esatta **sequenza** degli aminoacidi che la compongono.

Nella maggior parte dei casi, una proteina esegue un singolo compito. Le proteine possono eseguire le più diverse funzioni: alcune, chiamate enzimi, agiscono quali catalizzatori in reazioni chimiche; altre trasportano segnali da una parte all'altra della cellula o, come gli ormoni, da una cellula all'altra; certe proteine (gli anticorpi) hanno il compito di lottare contro le aggressioni esterne; certe costituiscono varie strutture fisiche all'interno della cellula; altre ancora, dette proteine regolatrici, mantengono i delicati equilibri e interazioni intra e intercellulari e coordinano numerose attività..

Codice lineare, implicazioni tridimensionali

Il DNA è la principale molecola depositaria dell'informazione, nei sistemi viventi. Come menzionato, questa informazione è lineare ed è contenuta nella sequenza di **A, G, C e T** che costituiscono la molecola del DNA. Questo codice lineare può essere trasmesso alla discendenza in quanto il DNA può essere replicato esattamente uguale.

Corti tratti di ciascuna molecola di DNA, chiamati geni, possono essere trascritti in qualsiasi momento. E' l'enzima RNA polimerasi che copia l'intero segmento, base dopo base, producendo una molecola di RNA che contiene una sequenza di **A, G, C e U** esattamente complementare alla sequenza di DNA del gene trascritto.

Oltre a costituire lo stampo per la produzione delle molecole di RNA, il DNA contiene nella sua sequenza ulteriori informazioni. P.es. segnali per l'RNA polimerasi, cioè dove iniziare la trascrizione di un gene (promotore) e dove terminare; oppure quante copie del trascritto devono essere prodotte e dove; o ancora un'informazione che, trasferita al trascritto di RNA, ne determina la durata e la produttività.

Ci sono tre classi principali di RNA, copiate a partire dal DNA stampo. L'RNA messaggero, o mRNA nella cui sequenza è contenuta l'informazione per l'assemblaggio delle proteine; l'RNA transfer o tRNA, implicato nella "catena di montaggio" delle proteine ed un RNA che riveste funzioni strutturali, come p. es. l'RNA ribosomale o rRNA. L'rRNA facilita l'assemblaggio del ribosoma, l'organello cellulare dove le proteine vengono prodotte a partire dal messaggio contenuto nell'mRNA. Nel ribosoma viene letta questa sequenza di nucleotidi, poi tradotta in sequenza di aminoacidi col processo detto di "traduzione". Come è possibile ciò? Ci sono solo quattro tipi diversi di nucleotidi, ma ben venti tipi di aminoacidi.

Durante la traduzione il ribosoma legge 3 nucleotidi alla volta (tripletta) e fa corrispondere un aminoacido ad ogni successiva tripletta. **Nota:** la tripletta è chiamata anche **codon**. Ogni aminoacido viene attaccato alla fine della catena proteica in crescita. La combinazione delle basi genera 64 possibili codon per cui l'informazione lineare contenuta nel DNA viene tradotta in una sequenza lineare di aminoacidi nella proteina. Questa sequenza determina a sua volta il modo in cui la proteina si avvolgerà nello spazio, fino ad assumere la sua corretta forma tridimensionale, che le conferisce particolari proprietà chimiche.

Principalmente, il trasferimento di informazione nella cellula segue l'ordine:

DNA→RNA→PROTEINA→CARATTERE

Sebbene l'informazione di per se sia lineare, gli oggetti da essa specificati sono tridimensionali. L'assunto fondamentale della tecnologia del DNA ricombinante è che si possano ottenere i cambi desiderati in modo permanente, nelle funzioni degli organismi viventi, modificando la sequenza lineare del loro DNA.

I geni sono dei "file" contenuti nella struttura del DNA

Un gene è un frammento, contenuto nella molecola del DNA, strutturato per essere copiato in RNA. Direttamente o indirettamente, questo RNA svolgerà una funzione. Conviene quindi pensare ad un gene come ad una unità funzionale.

Molti caratteri, quale p.es. la resistenza batterica agli antibiotici, sono governati da singoli geni. La maggior parte dei caratteri – come il colore di una rosa o la forma del naso – sono dovuti a diversi geni che agiscono di concerto.

I geni possono variare in lunghezza: alcuni sono lunghi solo poche centinaia di basi, altri decine di migliaia di basi. Una molecola di DNA può trasportare da pochi fino a migliaia di geni. Una cellula può, a sua volta, contenere una o diverse molecole di DNA (cromosomi) cosicché il numero di geni posseduti varia grandemente. Il batterio *E. coli* contiene una molecola di DNA con circa 5000 geni. Una cellula umana contiene 46 molecole di DNA (23 cromosomi) per un totale di circa 100000 geni.

I geni contenuti in una cellula **non** vengono contemporaneamente ne con la stessa intensità copiati in RNA (ovvero espressi), perciò quando si parla di funzione di un gene, ci si riferisce al suo livello di espressione. Tale intensità può essere controllata dalla cellula, la quale segue regole predeterminate codificate nello stesso DNA.

Un esempio: tutte le cellule che compongono il nostro corpo (10^{14} cellule) contengono le stesse molecole di DNA. Fra esse, le cellule del fegato, p.es., esprimono solo quei geni richiesti per le funzioni epatiche, mentre le cellule epiteliali esprimono un gruppo di geni diverso.

Il DNA può essere frammentato con gli enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono proteine prodotte dai batteri, quale mezzo di difesa contro il DNA che può invaderli dall'esterno (p.es., il DNA virale). Ogni enzima di restrizione riconosce un'unica sequenza (tipicamente di 4-6 paia di basi) e taglia qualsiasi tratto di DNA che la contenga.

Per esempio, l'enzima di restrizione *BamH I* riconosce la sequenza (5'..GGATCC..3') e taglia il filamento di DNA fra i due nucleotidi **G** di quella sequenza.

Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA a prescindere dalla sua provenienza, purchè possenga la sequenza di taglio. Non importa se si tratta di DNA di origine batterica, umana o vegetale.

Segmenti di DNA possono essere uniti dall'enzima DNA ligasi

La DNA ligasi è un enzima che salda insieme pezzi di DNA, purchè le estremità siano compatibili.

Così un frammento di DNA umano, di rana o di pomodoro tagliato con *BamH I* può essere facilmente unito ad un frammento di DNA batterico tagliato con lo stesso enzima. Questo permette la creazione di molecole di DNA ricombinanti o ibride, prodotte unendo pezzi di DNA provenienti da diversi organismi.

I geni possono essere estratti da DNA umano o di piante e inseriti dentro batteri. Per esempio, il gene umano per l'ormone insulina può essere inserito in un batterio che, nelle giuste condizioni, produrrà autentica insulina umana.

I plasmidi sono piccole molecole circolari di DNA

I plasmidi sono piccole molecole circolari di DNA che si trovano all'interno di alcune cellule batteriche. Essi replicano il proprio DNA sfruttando la DNA polimerasi della cellula. Per questo essi possono rimanere indefinitamente all'interno delle cellule senza dover compiere un grosso sforzo.

Per via delle loro piccole dimensioni, i plasmidi risultano facili da estrarre e purificare dalle cellule batteriche. Quando li si taglia con un enzima di restrizione, essi possono unirsi a DNA estraneo – proveniente da qualsiasi organismo – che sia stato tagliato con il medesimo enzima.

Il DNA ibrido risultante può essere reintrodotta nelle cellule batteriche con una procedura chiamata trasformazione. Il plasmide può quindi riprodurre se stesso nei batteri come prima, con l'eccezione che viene replicato anche il DNA estraneo in esso inserito. Come dire che il DNA estraneo "salta a bordo e si fa dare un passaggio!"

Ogni plasmide ibrido contiene ora una copia perfetta del tratto di DNA estraneo unito precedentemente ad esso. Si dice che il segmento di DNA è stato clonato; il plasmide che trasporta il DNA estraneo è detto vettore di clonaggio o vettore.

Oltre all'utilità nel clonaggio di geni estranei, talvolta i plasmidi trasportano geni propri. I batteri muoiono se esposti agli antibiotici; i geni per la resistenza agli antibiotici permettono però la crescita dei batteri in presenza di un antibiotico, quale l'ampicillina: tali geni si trovano spesso nei plasmidi. Se il DNA estraneo viene inserito in tali plasmidi, e le molecole risultanti introdotte nelle cellule batteriche per trasformazione, risulta facile selezionare i batteri che hanno ricevuto il plasmide. Tali cellule hanno infatti acquisito la capacità di crescere in presenza dell'antibiotico, mentre tutti i batteri non trasformati vengono uccisi.

Librerie di DNA

Quando il DNA è estratto da una cellula, può essere tagliato in frammenti e questi possono essere clonati in blocco in una popolazione di plasmidi. Questo processo produce una popolazione di molecole ibride (ricombinanti) di DNA. Introducendo questi plasmidi ibridi nei batteri si originano cellule trasformate, ognuna delle quali avrà ricevuto e propagherà un diverso ibrido. Ogni ibrido conterrà lo stesso vettore ma un diverso inserto di DNA.

Se ci sono 1000 differenti frammenti di DNA nella miscela originale, 1000 diversi ibridi saranno formati, 1000 diverse cellule trasformate saranno isolate, ognuna delle quali trasporterà uno dei 1000 frammenti originariamente prodotti. Tale collezione è chiamata libreria di DNA. Se il DNA di partenza è ottenuto da cellule umane, si otterrà una libreria umana.

Frammenti di DNA di interesse possono essere individuati in tali librerie eseguendo uno screening con una sonda appropriata.

Appendice D Regolazione genica

I nostri corpi contengono migliaia di proteine diverse che svolgono moltissimi compiti distinti. Gli enzimi digestivi sono proteine; alcuni degli ormoni che veicolano segnali da una regione all'altra del nostro corpo sono proteine così come pure lo sono gli anticorpi, che ci proteggono contro alcune malattie. L'informazione per l'assemblaggio di una proteina risiede nel nostro DNA. La regione di DNA che contiene il codice per produrre una proteina è chiamata gene. Ci sono fra i 30000 e i 100000 geni nel genoma umano. Ogni gene codifica per un'unica proteina: un gene, una proteina. Un gene che codifica per un enzima digestivo nella nostra bocca è differente da uno che specifica per un anticorpo o per il pigmento che colora i nostri occhi.

Gli organismi regolano l'espressione dei propri geni e di conseguenza la quantità ed i tipi di proteine presenti nelle loro cellule per una miriade di ragioni, come durante le diverse fasi dello sviluppo, la differenziazione cellulare e l'adattamento all'ambiente. La regolazione genica non solo permette l'adattamento a differenti condizioni, ma anche previene l'eccesso di produzione di proteine non necessarie, processo che arrecherebbe all'organismo uno svantaggio competitivo.

I geni implicati nel trasporto e nella degradazione (catabolismo) degli alimenti sono buoni esempi di geni altamente regolati. Per esempio, lo zucchero arabinosio è sia una fonte di energia che di carbonio. Il batterio *E. coli* produce tre enzimi (proteine) necessari per l'utilizzo dell'arabinosio quale fonte alimentare. I geni che codificano per questi enzimi sono inattivi quando l'arabinosio è assente, ma vengono espressi quando questo zucchero si trova nell'ambiente. Come avviene questo?

La regolazione dell'espressione delle proteine spesso avviene al livello della trascrizione da DNA a RNA. Questa regolazione si attua in una regione molto specifica del DNA, chiamata promotore, dove la RNA polimerasi si lega al DNA ed inizia la trascrizione del gene. Nei batteri, gruppi di geni correlati sono spesso riuniti insieme e trascritti in RNA a partire da un unico promotore. Raggruppamenti di geni così organizzati sono detti operoni.

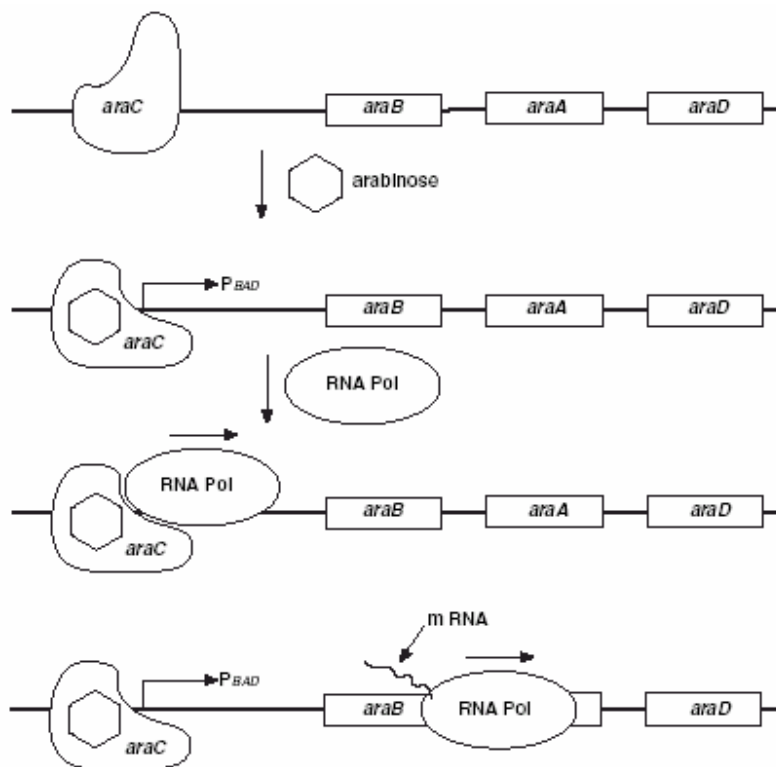
I tre geni (*araB*, *araA* and *araD*) che codificano per tre enzimi digestivi implicati nel catabolismo dell'arabinosio sono raggruppati insieme in quello che è denominato operone arabinosio 3. La produzione delle relative proteine dipende da un singolo promotore, chiamato *PBAD*. La trascrizione di questi tre geni richiede la presenza simultanea del DNA da copiare, (promotore ed operone), della RNA polimerasi, di *araC* (una proteina che si lega al DNA) e di arabinosio. In condizioni normali, *araC* si lega al DNA nel sito di interazione con la RNA polimerasi (all'inizio del operone arabinosio). Quando l'arabinosio è presente nell'ambiente, i batteri lo assumono. All'interno della cellula l'arabinosio interagisce direttamente con *araC*, che si trova legato al DNA. Tale interazione provoca un cambio conformazionale in *araC* che promuove (aiuta) il legame della RNA polimerasi, inducendo così la trascrizione dei geni *araB*, *A* e *D*. Ne risulta la produzione di tre enzimi che degradano l'arabinosio, consumandolo. Una volta terminato l'arabinosio, *araC* riprende la sua forma normale e la trascrizione viene bloccata.

La composizione del DNA che costituisce il plasmide pGLO è stata modificata (ingegnerizzata) per incorporare strutture appartenenti all'operone arabinosio. Sono stati aggiunti sia il promotore (*P_{BAD}*) che il gene *araC*, mentre i geni che codificano per il catabolismo dell'arabinosio, *araB*, *A* e *D* sono stati rimpiazzati da un singolo gene che codifica per la GFP. In presenza di arabinosio la proteina *araC* stimola l'attività della RNA polimerasi; viene quindi prodotta GFP che si accumula nelle cellule, facendo brillare le colonie di luce verde fluorescente. In assenza di arabinosio, *araC* non promuove il legame della RNA polimerasi ed il gene della GFP non viene trascritto. Se la GFP non viene prodotta, le colonie batteriche posseggono un fenotipo wild-type (naturale), di colore bianco e senza fluorescenza.

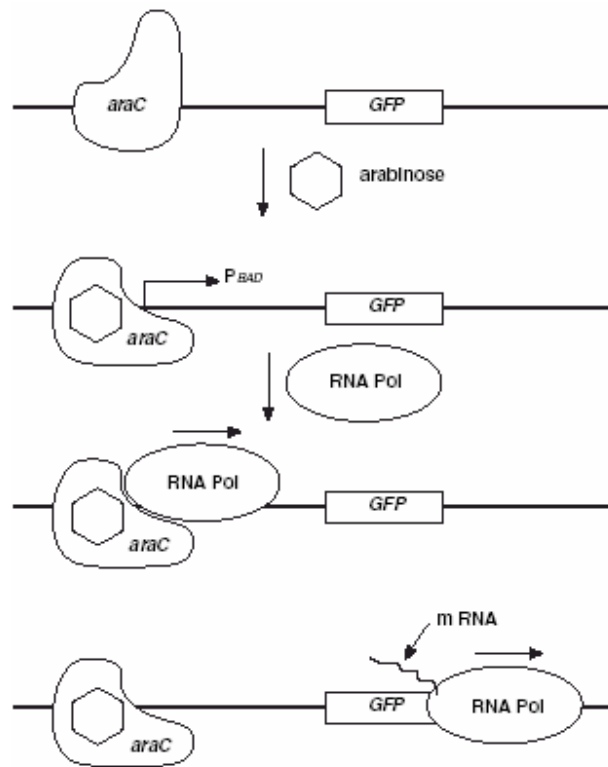
Questo è un eccellente esempio di quanto è conosciuto come “dogma centrale della genetica”:

DNA→RNA→PROTEINA→CARATTERE

L'operone arabinosio



L'espressione della proteina fluorescente verde (GFP)



Appendice E Bibliografia

1. Hanahan, Douglas, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557 (1983).
2. Hanahan, Douglas, Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning: A Practical Approach* (Ed. D. M. Glover), vol. 1. IRL Press, Oxford (1987).
3. Schleif, Robert, Two positively regulated systems, *ara* and *mal*, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt. ASM Press, Washington, D.C. (1996).

Parafilm è un marchio depositato dalla American National Can Co.

Jell-O è un marchio depositato dalla Kraft Foods, Inc.