

Biotechnologie

Il DNA ricombinante

Dagli enzimi di restrizione
alla selezione dei cloni ricombinanti

BioTecnologieSanitarie.it

II DNA ricombinante

Vettori e cloni

Disegno in copertina

tRNA By Vossman - Own work, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=405262>

Introduzione

Ottenere il gene di interesse: gli enzimi di restrizione

Inserimento del gene in un vettore di espressione (DNA ricombinante)

Scelta della cellula ospite

Tecniche di trasferimento del vettore all'interno della cellula ospite

Selezione dei cloni ricombinanti

Photo credits

Introduzione

BioTechnologieSanitarie.it

Introduzione

Cosa vuol dire DNA ricombinante?

In pratica isolare dei geni che ci interessano all'interno di un genoma (**gene di interesse o esogeno**), trasferirlo tramite un **vettore di espressione** in cellule o microrganismi diversi, farlo incorporare nel genoma della cellula ospite e **clonarlo** cioè amplificarlo in vivo.

Introduzione

La fase successiva può essere l'estrazione e la purificazione per una molteplice serie di applicazioni a livello di ricerca.

Oppure la produzione industriale (produzione di insulina o somatostatina umana da cellule batteriche, produzione di farmaci, di anticorpi monoclonali ...) usando la stessa cellula ospite che viene forzata a moltiplicarsi attivamente.

Introduzione

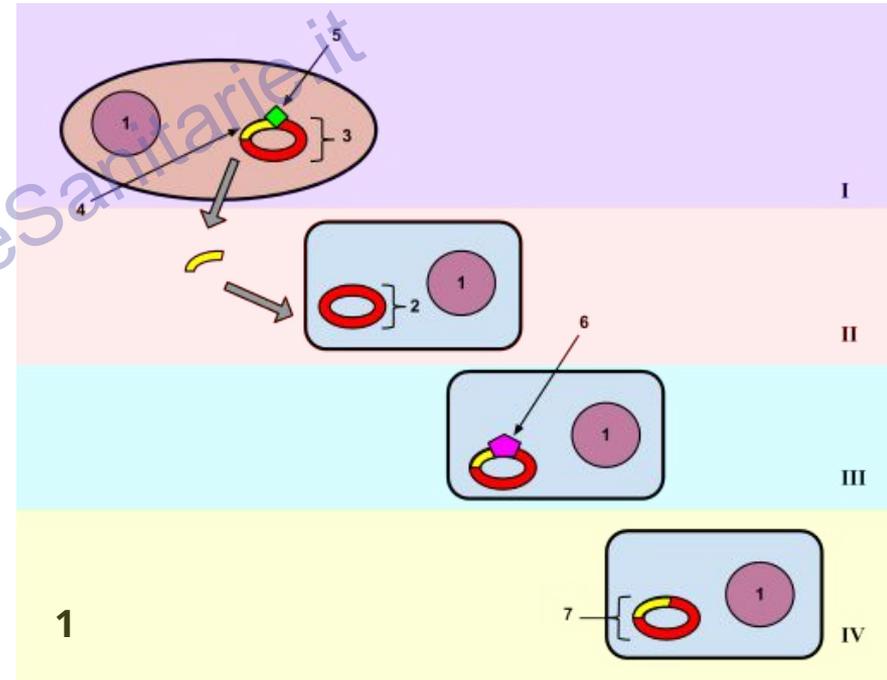
Bisogna sempre tenere conto del fatto che spesso si utilizzano cellule diverse da quella di origine per cui non sempre la cellula ospite ha le strutture enzimatiche necessarie per la completa espressione del gene di interesse.

Introduzione

Nel caso della produzione di un ormone umano in una cellula batterica per esempio bisogna aggiungere anche il **promotore di trascrizione** nel vettore di espressione perché il gene dell'ormone si possa esprimere in un sistema che non è suo.

Introduzione

Nello schema accanto viene schematizzata la tecnica del DNA ricombinante con particolare riguardo al trasferimento di geni di interesse tra batteri e i loro plasmidi. La legenda nella diapositiva successiva.



Introduzione

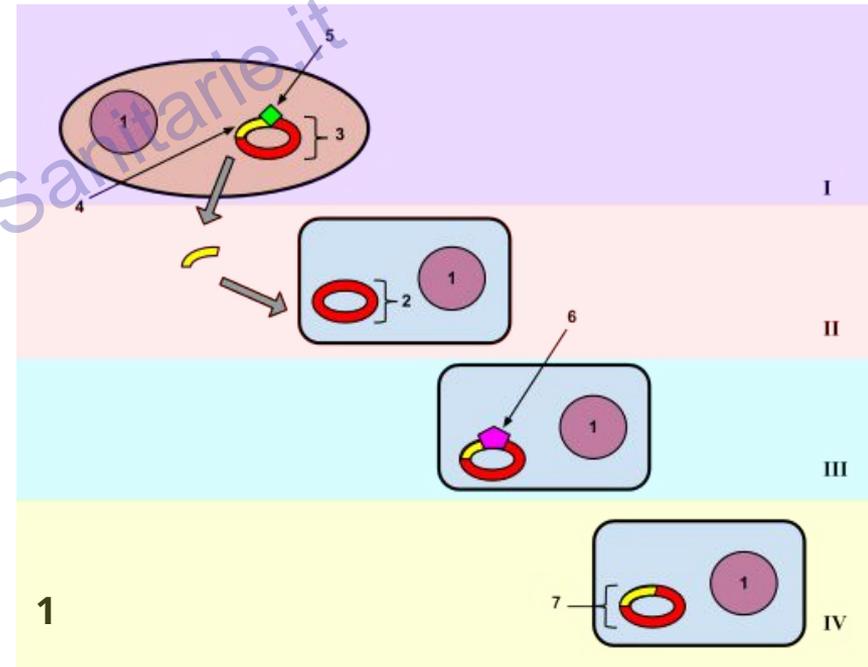
Trasformazione batterica (legenda): un gene di interesse viene trasferito da un batterio ad un altro.

I Il gene di interesse (4) viene localizzato nel primo batterio a livello del suo plasmide (3). Per tagliare il gene di interesse viene usato un enzima di restrizione (5) che si lega alla sequenza di riconoscimento ed esegue l'operazione.

II Il frammento di DNA viene rilasciato nel terreno di coltura e così può essere trasferito all'interno del secondo batterio (fenomeno più che normale tra batteri e sancito dall'evoluzione)

III Grazie all'intervento dell'enzima ligasi (6) il frammento di DNA viene inserito nel plasmide (2) del secondo batterio.

IV Il gene di interesse viene così trasferito ed integrato (7)



Introduzione

Vediamo ora più nel dettaglio le singole fasi e via via gli strumenti e i metodi utilizzati nei laboratori di tutto il mondo. Parleremo di:

- ❖ enzimi di restrizione
- ❖ vettori
- ❖ trasformazione batterica
- ❖ selezione dei cloni

1. Ottenere il gene di interesse o esogeno

BioTechnologieSanitarie.it

Ottenere il gene di interesse

Si possono attuare diverse procedure.

La prima è **ottenere direttamente dal DNA** il gene di interesse o esogeno. In questo caso si usano gli enzimi di restrizione.

Gli enzimi di restrizione sono delle vere e proprie forbici molecolari, in grado di frammentare il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche delle basi azotate.

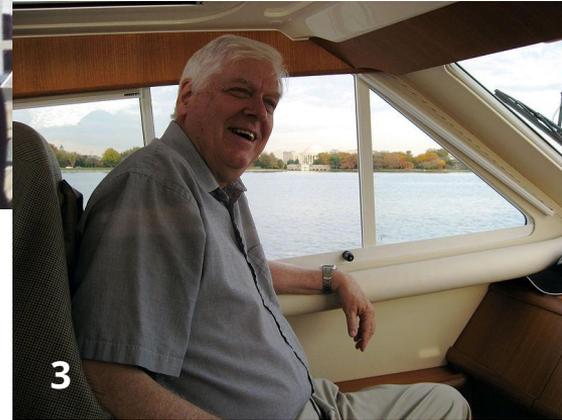
Ottenere il gene di interesse

Gli enzimi di restrizione sono stati scoperti da Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith. Tutti e tre biologi, vinsero il Nobel per la medicina nel 1978.



2

W. Arber



3

H. Smith

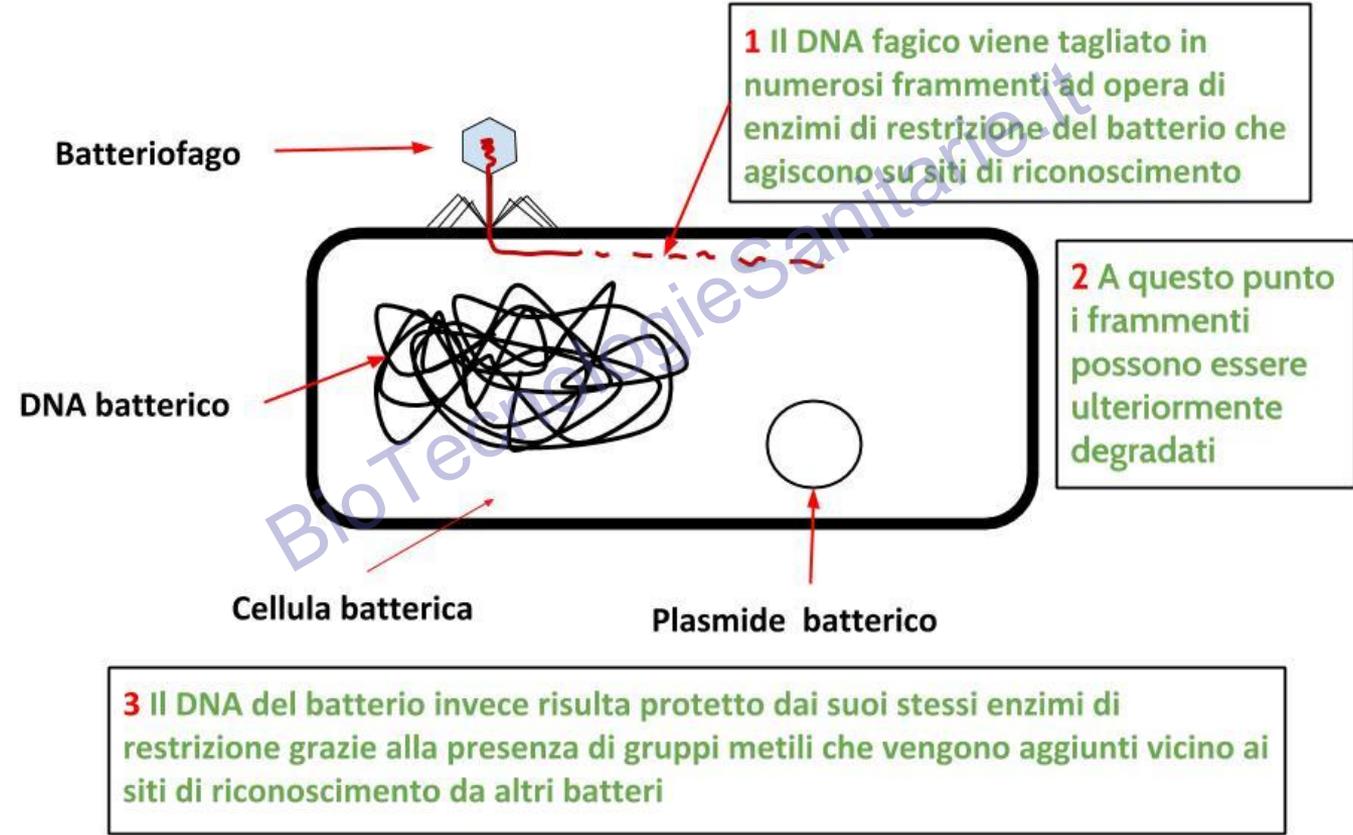
Ottenere il gene di interesse

Gli enzimi di restrizione sono stati scoperti studiando l'infezione dei fagi nelle cellule batteriche.

Infatti il taglio del DNA fagico in frammenti è il metodo con cui i batteri contrastano l'invasione di questi virus. La frammentazione impedisce la moltiplicazione dell'acido nucleico e rende il virus inoffensivo.

Come si difendono i batteri dall'attacco dei virus

Ottenere il gene
di interesse



Ottenere il gene di interesse

Come si può notare dallo schema della diapositiva precedente i batteri sono in grado di operare la metilazione del proprio DNA proteggendolo dalla frammentazione.

Dopo averli scoperti nei batteri, gli enzimi di restrizione sono stati ampiamente studiati (se ne conoscono alcune centinaia) e si è visto che agiscono praticamente su tutti i DNA.

Ottenere il gene di interesse

Gli enzimi di restrizione sono delle endonucleasi che agiscono solo su specifiche sequenze di basi azotate (**siti di restrizione**), lunghe al massimo una decina di basi.

Dopo averle riconosciute operano due tagli, uno in ciascun elemento.

La condizione essenziale è che la sequenza sia la stessa, letta nella direzione 5' → 3' e viceversa.

Ottenere il gene di interesse

Il disegno sottostante mette bene in evidenza quanto già descritto. Il **sito di restrizione** è caratterizzato, per ogni enzima di restrizione, dalla stessa sequenza in direzione

5' - 3'

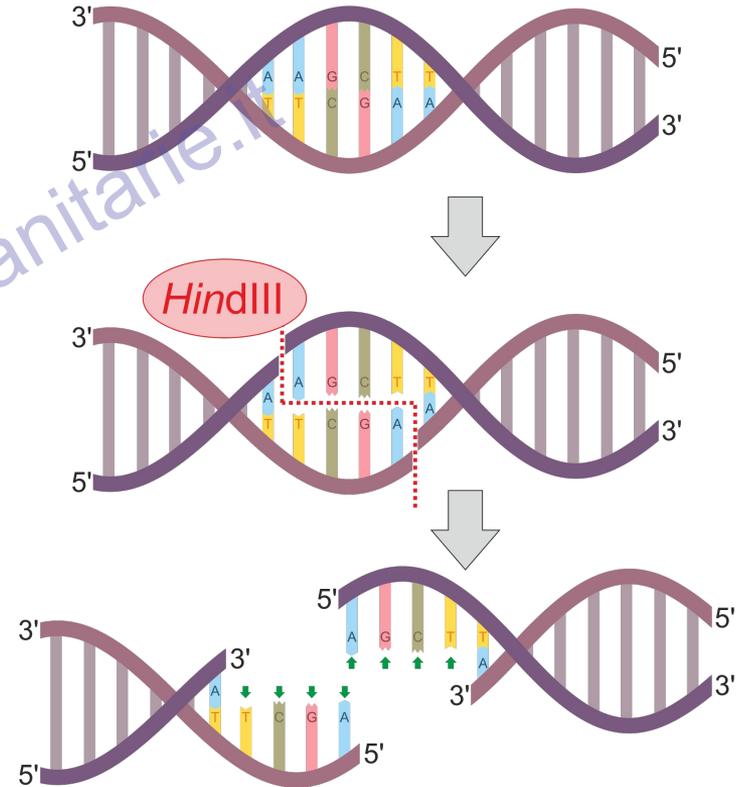


5

Ottenere il gene di interesse

Il taglio avviene in modo che si generino frammenti con estremità 3'OH e 5' P.

In ogni caso gli enzimi di restrizione operano sempre nello stesso modo qualunque sia il DNA su cui agiscono. In altre parole agiscono sulla stessa sequenza. La sigla HindIII verrà svelata nella prossima diapositiva.



Ottenere il gene di interesse

Dato l'alto numero di enzimi di restrizione è diventata necessaria una nomenclatura per poterli riconoscere.

- ❖ Le prime tre lettere scritte in corsivo indicano il batterio da cui sono stati isolati
- ❖ A volte si aggiunge una quarta lettera che specifica il ceppo
- ❖ C'è poi un numero romano che indica la successione temporale della scoperta

Ottenere il gene di interesse

Enzima	Organismo di origine	Sequenza di basi	Taglio
EcoRI	Escherichia coli	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ---G AATTC ---3' 3' ---CTTAA G ---5'
EcoRV	Escherichia coli	5' GATATC 3' CTATAG	5' ---GAT ATC ---3' 3' ---CTA TAG ---5'
HindIII	Haemophilus influenzae	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ---A AGCTT ---3' 3' ---TTCGA A ---5'
TaqI	Thermus aquaticus	5' TCGA 3' AGCT	5' ---T CGA ---3' 3' ---AGC T ---5'
Sau3AI	Staphylococcus aureus	5' GATC 3' CTAG	5' --- GATC ---3' 3' ---CTAG ---5'

Ottenere il gene di interesse

Il taglio operato dagli enzimi di restrizione può essere molto diverso.

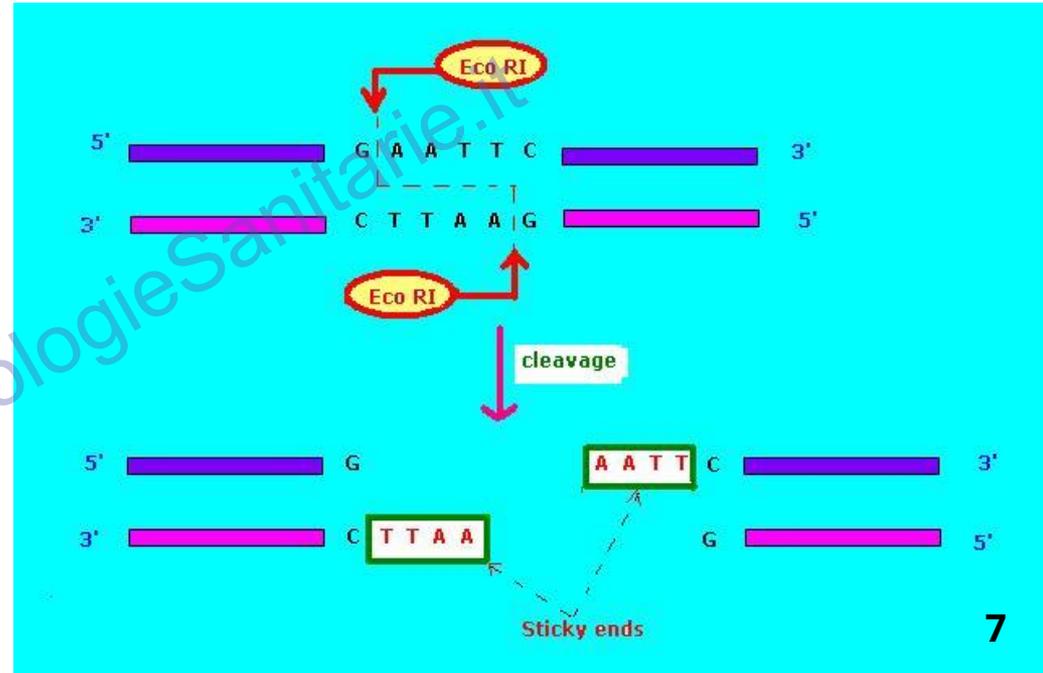
Può essere simmetrico generando sequenze complementari della stessa lunghezza (**blunt end -estremità piatte**)



Ottenere il gene di interesse

Oppure può essere asimmetrico perché il taglio è sfalsato o obliquo

(sticky ends -
estremità
appiccicose).



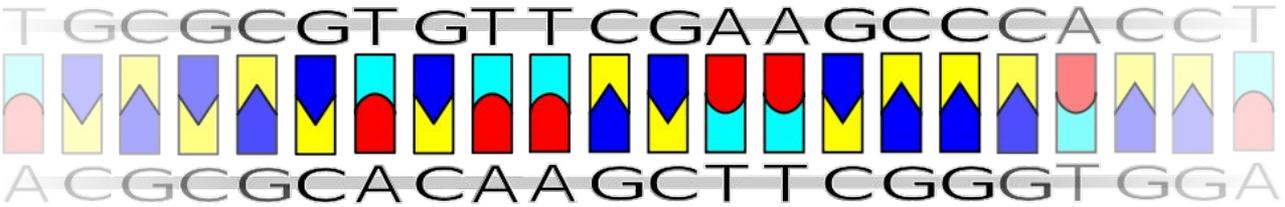
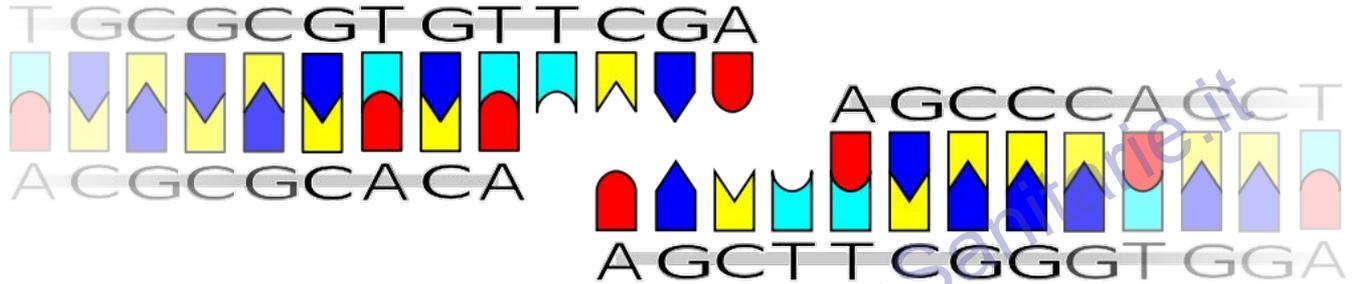
Ottenere il gene di interesse

Se lo stesso enzima di restrizione digerisce un altro DNA le estremità dei due acidi nucleici potranno appaiarsi in modo complementare. La ricostruzione del doppio filamento di DNA richiede l'intervento di una **ligasi**.

Di lato l'enzima ligasi al lavoro di riparazione ordinaria di una porzione danneggiata di DNA. Uno dei suoi tanti compiti.



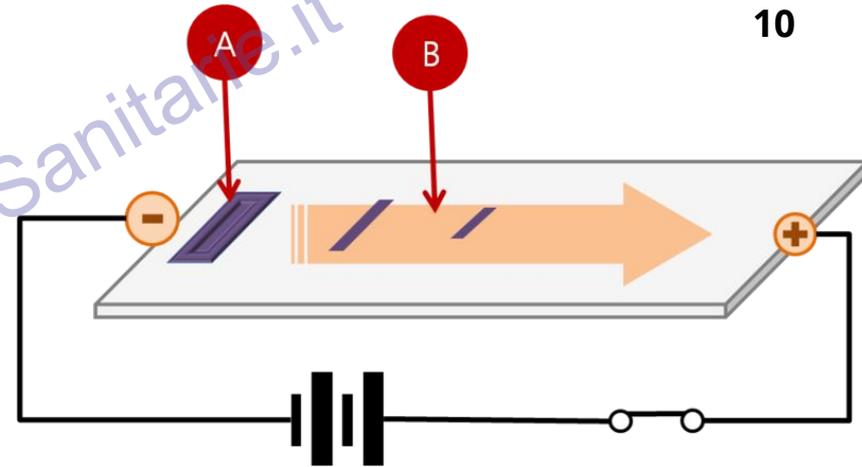
Ottenere il gene di interesse



Tanti i compiti assegnati all'enzima ligasi tra cui anche quello di riunire i frammenti di DNA di organismi diversi tagliati dagli enzimi di restrizione. Sia i blunt ends quanto gli sticky ends come in questo caso.

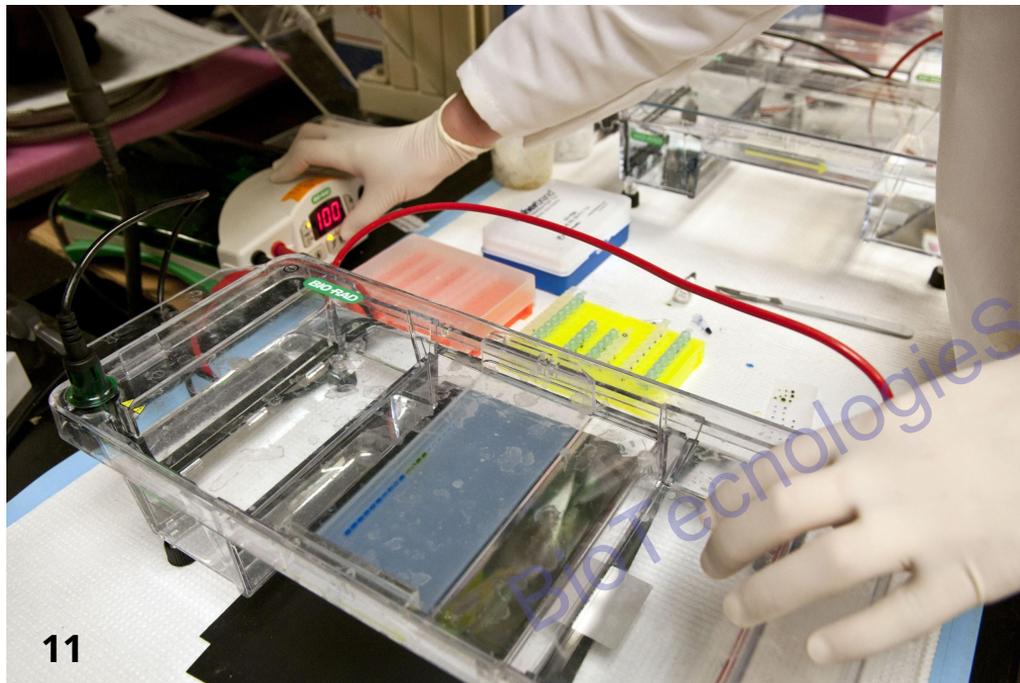
Ottenere il gene di interesse

Usando gli enzimi di restrizione su una molecola di DNA si ottiene una famiglia di frammenti con lunghezze e quindi pesi diversi. L'elettroforesi consente di separarli.

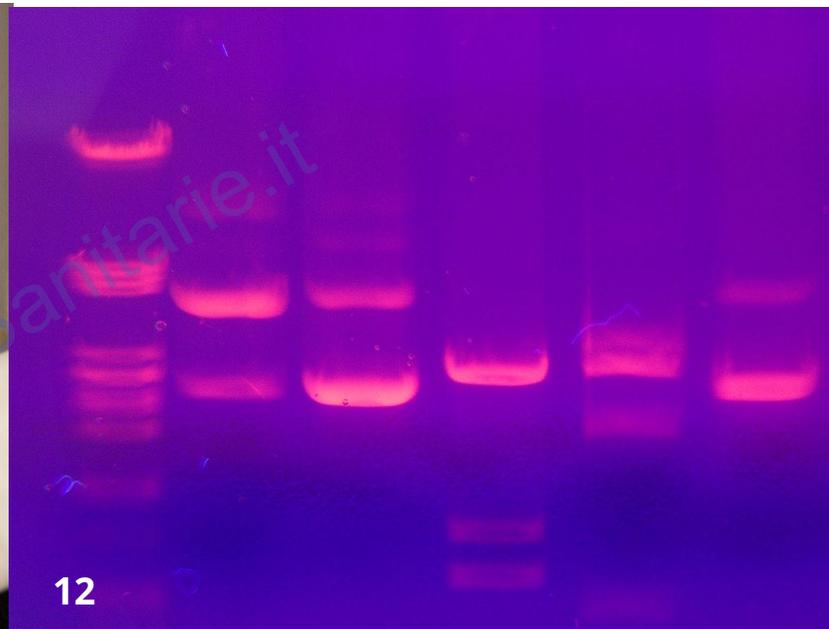


L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa basata sul movimento di particelle cariche elettricamente immerse in un fluido. Il movimento è dovuto ad un campo elettrico che si applica mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso.

Ottenere il gene di interesse



Questo è lo strumento tipico con cui si fa l'elettroforesi in gel di agarosio. I campioni vengono inseriti nei pozzetti. Si applica il campo elettrico e quindi i campioni di DNA, con carica negativa, vengono attratti dal polo positivo.



Il gel è un setaccio e consente di separare le molecole in base alla loro grandezza. I frammenti di DNA separati così in base alla velocità, vengono colorati con etidio bromuro ed esposti a luce ultravioletta per la lettura.

Ottenere il gene di interesse

Il gene di interesse si può ottenere anche con:

- ❖ la **tecnica della PCR** se si conosce almeno parte della sequenza nucleotidica
- ❖ con la **sintesi chimica**, partendo dai singoli nucleotidi
- ❖ l'uso della **trascrittasi inversa** partendo dall'mRNA e non dal DNA; in molti casi è più facile perché le cellule in piena sintesi proteica ne sono ricche. La Dna polimerasi RNA-dipendente sintetizza un singolo filamento e poi l'intervento della DNA polimerasi completa il doppio filamento (DNA complementare o cDNA)

2. Inserimento del gene di interesse in un vettore di espressione (DNA ricombinante)

Inserimento del gene nel vettore

Una volta ottenuto il gene di interesse bisogna trasferirlo in una cellula ospite.

Tale processo si chiama **trasformazione** se la cellula ospite è un batterio o un lievito.

Si chiama invece **trasfezione** se è una cellula eucariote.

Per questo scopo si usano dei vettori che devono rispettare determinate caratteristiche.

Inserimento del gene nel vettore

I **vettori** devono:

- ❖ essere delle strutture genetiche extracromosomiali perché si devono poter moltiplicare indipendentemente dai cromosomi
- ❖ poter contenere un frammento di DNA esogeno (inserto)
- ❖ mantenere questo frammento stabile nella cellula ospite

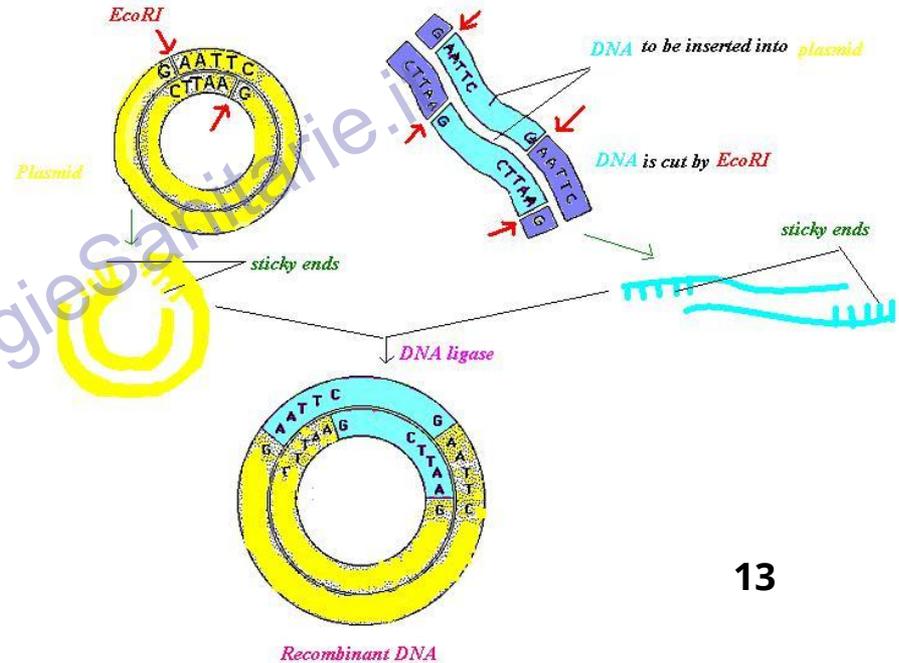
Inserimento del gene nel vettore

La scelta ideale è un **plasmide** o un **virus** (che possono anche essere manipolati) che:

- ❖ si può moltiplicare nella cellula ospite
- ❖ dipende da enzimi e metaboliti indispensabili della cellula ospite per la replicazione e la sintesi proteica

Inserimento del gene nel vettore

Ovviamente la scelta deve essere fatta con attenzione e deve prendere in considerazione la compatibilità specifica



13

Trasferimento di gene esogeno in un plasmide

Inserimento del gene nel vettore

Fatte tutte queste considerazioni vediamo quali sono i **requisiti del vettore**.

- ❖ Deve penetrare facilmente nella cellula ospite
- ❖ Essere stabile e compatibile con la cellula ospite
- ❖ Deve potersi replicare in modo autonomo rispetto al genoma della cellula ospite
- ❖ Deve essere tagliato dagli enzimi di restrizione in un unico punto
- ❖ Deve possedere dei geni marcatori selezionabili (solitamente geni che conferiscono resistenza agli antibiotici)

Inserimento del gene nel vettore

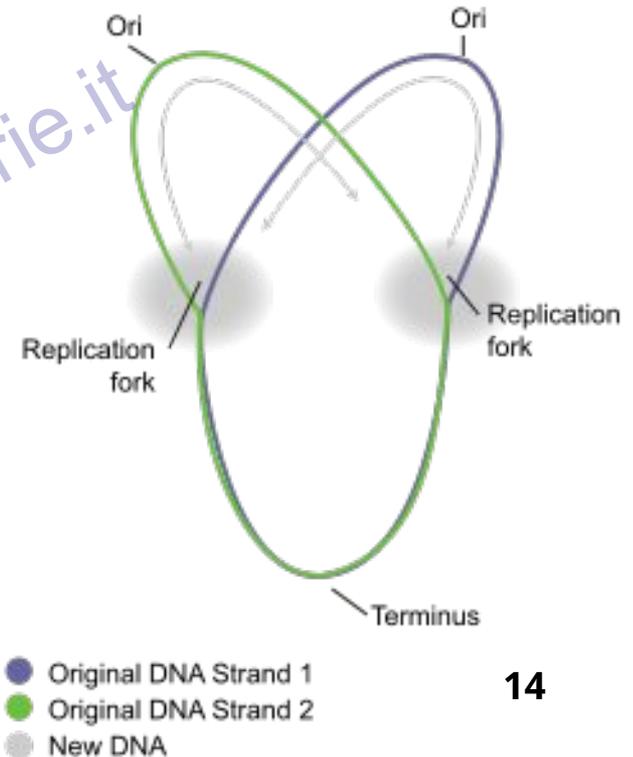
Tra i vettori più usati ci sono i **plasmidi** perché rispettano le caratteristiche appena elencate.

Sono presenti nei batteri e in alcune cellule di lievito.

Non sono essenziali per la sopravvivenza dei batteri ma la loro presenza fa acquisire al batterio stesso delle caratteristiche specifiche tipo la capacità di produrre enterotossine, la resistenza a determinati antibiotici e la fermentazione dei glucidi.

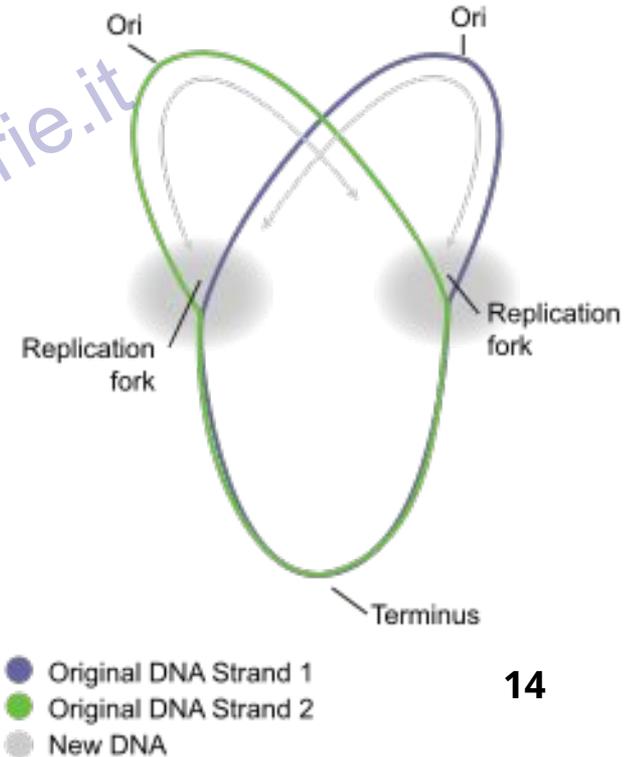
Inserimento del gene nel vettore

La capacità di replicarsi in modo autonomo rispetto alla cellula ospite dipende dal fatto che possiedono un'origine di replicazione cioè una sequenza di basi azotate del loro DNA dalla quale inizia la replicazione. L'origine di replicazione è comunque importante nel DNA perché avvia il processo di replicazione.



Inserimento del gene nel vettore

Questa sequenza è ricca di coppie A-T.
L'origine di replicazione si lega con il complesso di pre-replicazione (una proteina) che lo riconosce, lo apre e inizia a copiare il DNA. Nei batteri si chiama **ori**, nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* **ARS**.



Inserimento del gene nel vettore

Grazie a questa capacità di autoduplicazione indipendente i plasmidi possono **amplificare in vivo il DNA inserito**. In alcuni casi sono stati costruiti plasmidi presenti in 500 - 1000 copie all'interno della stessa cellula ospite.

Altro fattore importante è la **specificità per l'ospite**. Ci sono plasmidi che hanno compatibilità solo per i batterici enterici.

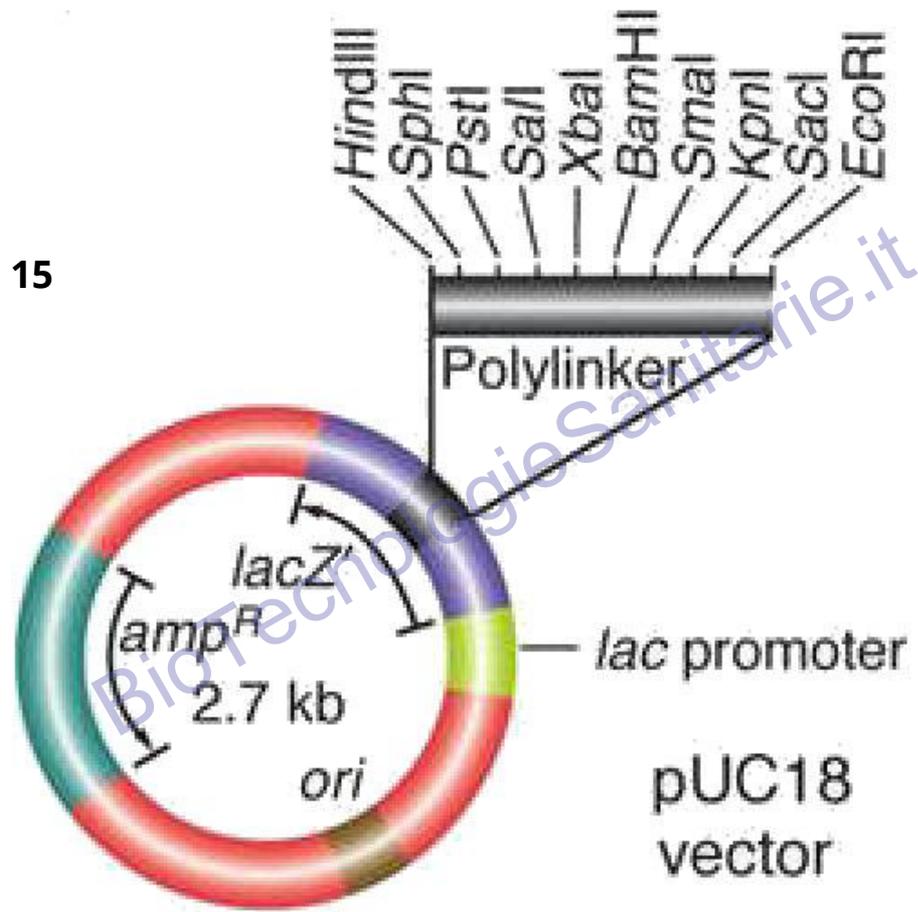
Un limite è rappresentato dalla **dimensione del DNA inserito**: da 1,5 a 10 kb

Inserimento del gene nel vettore

Il plasmide deve essere tagliato con gli enzimi di restrizione per poter inserire il gene di interesse. Il taglio però non deve pregiudicare il suo corretto funzionamento.

La maggior parte di questi vettori presenta una regione dove sono raggruppate le sequenze di riconoscimento (**sito multiplo di clonaggio** o **polylinker**). Nella diapositiva successiva si può vedere un plasmide con il suo polylinker.

Inserimento del gene nel vettore



Plasmide pUC18 in cui è evidenziato il polylinker o sito multiplo di clonaggio dove sono raggruppate tutte le sequenze di riconoscimento in cui possono agire i vari enzimi di restrizione.

Inserimento del gene nel vettore

Nello stesso plasmide sono evidenziati anche i **geni marcatori**.

A che cosa servono? Non è detto che tutta l'operazione vada a buon fine. Come facciamo a sapere che il plasmide sia effettivamente ricombinato e che le estremità tagliate dagli enzimi di restrizione non si siano di nuovo chiuse su se stesse? come possiamo sapere che le cellule ospiti abbiano accettato il plasmide?

Inserimento del gene nel vettore

L'operazione avrà avuto successo solo se avremo ottenuto delle cellule ospiti con il plasmide ricombinato.

Stiamo parlando di batteri e quindi la tecnica più semplice è metterli in coltura.

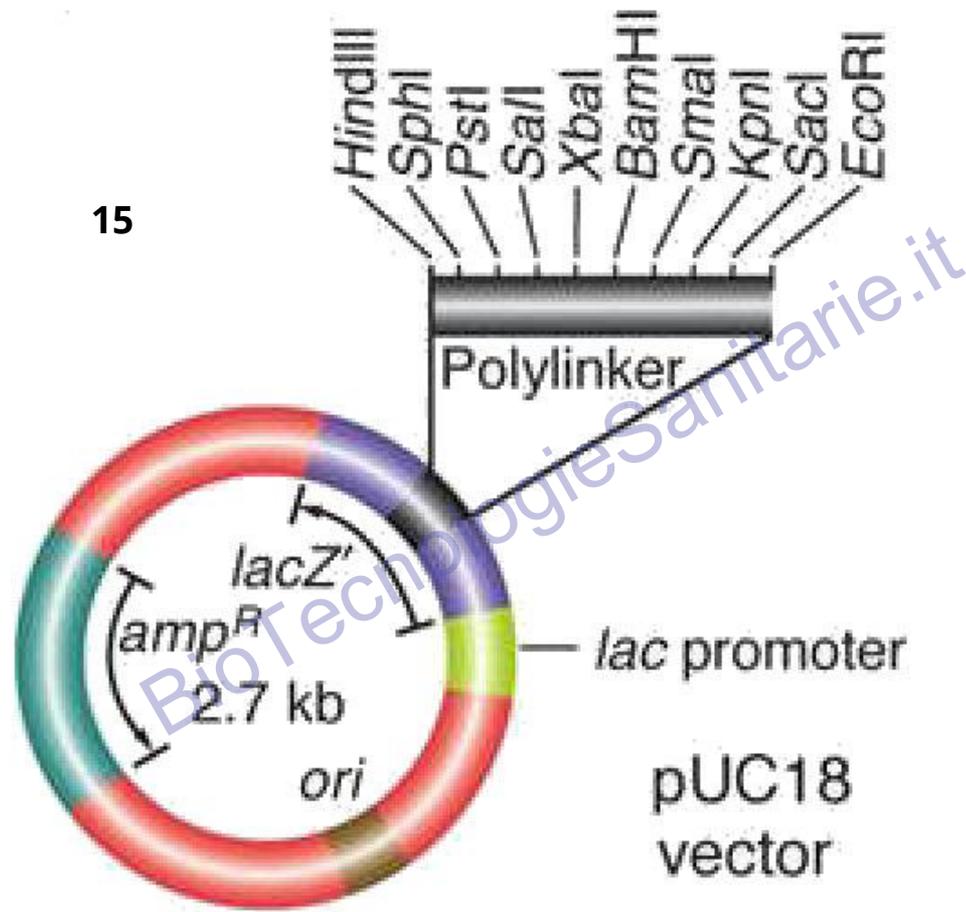
Se nel plasmide vettore ci sono dei marcatori particolari come i geni che rendono il batterio resistente ad alcuni antibiotici (per esempio l'ampicillina) abbiamo solo una cosa da fare.

Inserimento del gene nel vettore

Selezionare le cellule che ci servono tentando di farle crescere in un terreno con la presenza dell'antibiotico in questione. Quelle che riusciranno a moltiplicarsi sono le nostre cellule.

Quelle che non si moltiplicheranno non sono cellule trasformate. Ovviamente.

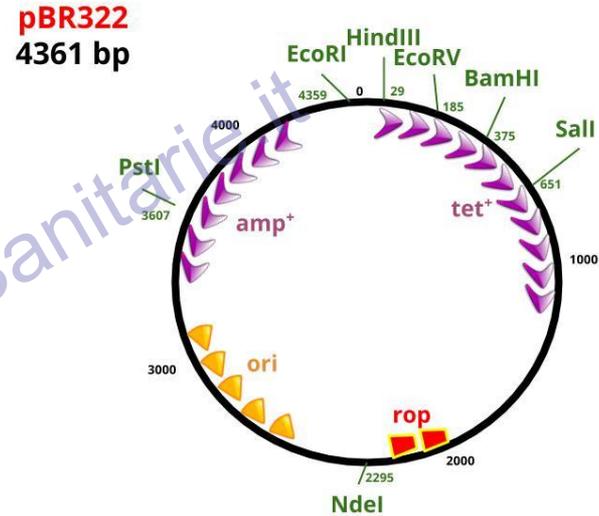
Inserimento del gene nel vettore



Riprendiamo il nostro plasmide pUC18 in cui abbiamo già evidenziato il polylinker
Adesso capiamo anche il significato del segmento amp, è il sito in cui sono inseriti i geni che rendono il batterio che lo ospiterà resistente all'antibiotico ampicillina.
Questo è un esempio di gene marcatore.

Inserimento del gene nel vettore

Nella pratica di laboratorio si usano dei plasmidi artificiali come il **pBR322** che presenta in totale 4361 coppie di basi (o 4,36 kb).



16

Plasmide pBR322 (legenda)

In verde scuro sono segnati gli enzimi di restrizione e la posizione delle sequenze di riconoscimento dove agiscono.

In viola sono indicati i geni marcatori per la resistenza all'ampicillina e alla tetraciclina.

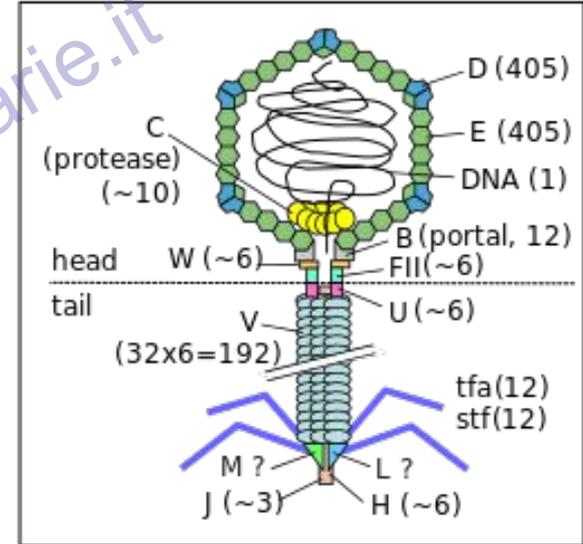
In giallo il sito ori (origine di replicazione).

In rosso il sito rop per la replicazione di 20 copie di plasmide per cellula.

Inserimento del gene nel vettore

Altri vettori possono essere i **fagi**. I virus batterici possono essere utilizzati per trasferire frammenti di DNA più lunghi (fino a 20-22 kb)

Di questi il più utilizzato è il fago lambda di cui si conosce l'intera sequenza nucleotidica e che potete vedere nel disegno accanto.

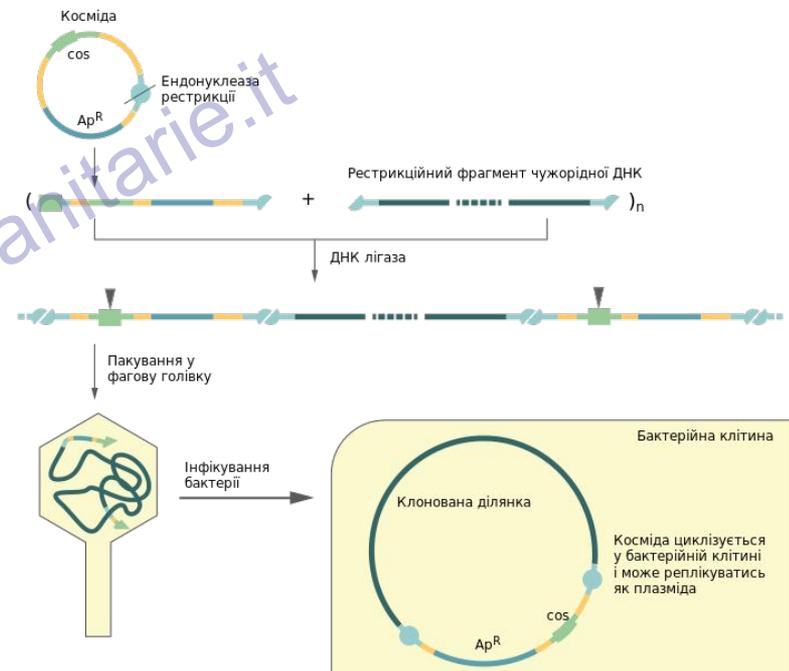


17

Inserimento del gene nel vettore

Un altro esempio di vettori sono i **cosmidi**.

Sono ibridi tra i fagi e i plasmidi che riescono a trasferire DNA esogeno di lunghezza ancora maggiore rispetto ai precedenti vettori (fino a 46 kb)



Inserimento del gene nel vettore

Da ricordare anche gli **shuttle vectors** (vettori traghetto) in grado di replicarsi in cellule diverse perché hanno due origini di replicazioni, una per ogni cellula. Per esempio una per le cellule batteriche (*ori*) e una per i lieviti (ad esempio *ARS*).

Inserimento del gene nel vettore

Infine bisogna ricordare i **cromosomi artificiali di lievito o YAC (Yeast Artificial Chromosomes)** particolarmente interessanti per la notevole lunghezza del gene di interesse che possono trasferire (100 - 1000 kb). Per questo motivo possono essere utilizzati per sequenziare interi genomi. Sono stati usati per il Progetto Genoma Umano. Sono nati dall'integrazione tra il DNA di *Saccharomyces cerevisiae* e un plasmide ma sono stati abbandonati per i BAC.

Inserimento del gene nel vettore

I **BAC (Bacterial Artificial Chromosome)** sono definiti vettori di clonaggio ad alta capacità perché sono in grado di trasferire una quantità di DNA mediamente pari a 100 kb, quindi decisamente superiore a quella trasferita dai normali plasmidi. Si tratta di vettori artificiali di DNA basati sul plasmide F (legato al fenomeno della coniugazione batterica) isolato da *Escherichia coli*.

3. Scelta della cellula ospite

BioTechnologiesSanitarie.it

Scelta della cellula ospite

La cellula che deve ospitare il vettore ricombinato deve essere scelta con attenzione perché deve rispondere a specifici requisiti:

- ❖ crescita in in vitro ed economicità di coltura
- ❖ stabilità in coltura con frequenza molto bassa di mutazioni spontanee
- ❖ assenza di patogenicità per l'uomo

Scelta della cellula ospite

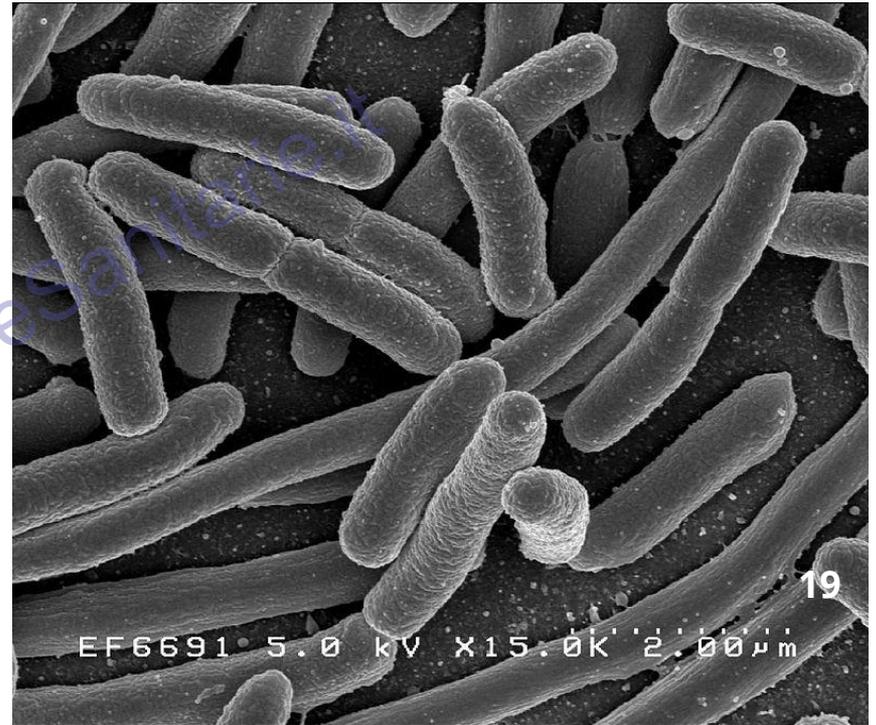
Inoltre deve:

- ❖ essere facilmente trasformabile
- ❖ facilitare la replicazione autonoma del vettore e non produrre enzimi di restrizione
- ❖ consentire facilmente la selezione dei ricombinanti e quindi deve possedere mutazioni compatibili con i geni marcatori

Scelta della cellula ospite

Tra i **procarioti** la cellula più scelta è sicuramente **Escherichia coli**.

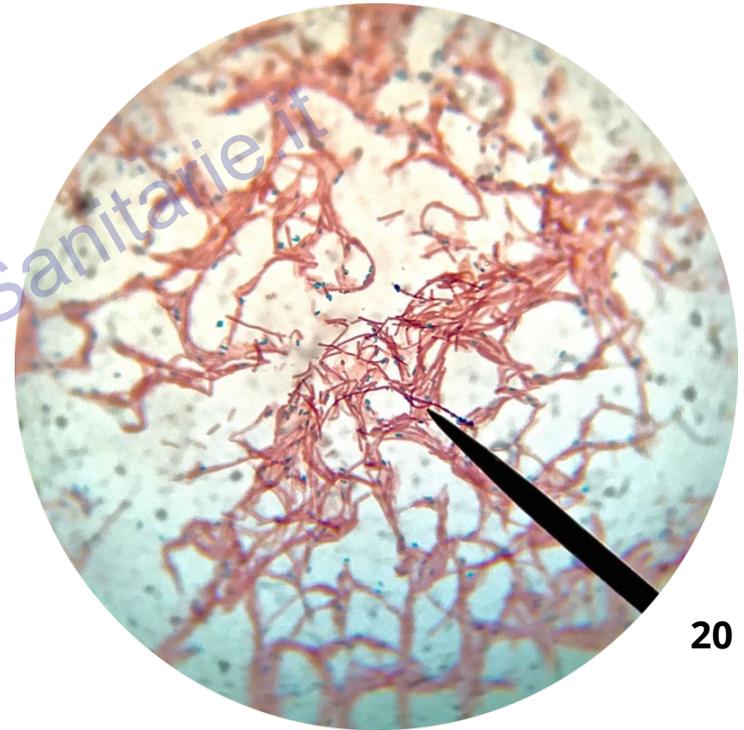
Su di essa e le sue caratteristiche sono stati costruiti molti vettori artificiali.



Fotografia al microscopio elettronico a scansione di E. coli

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis, bacillo del fieno o dei pascoli, comunemente presente nel suolo, è un gram-positivo molto utilizzato nella tecnologia ricombinante.



20

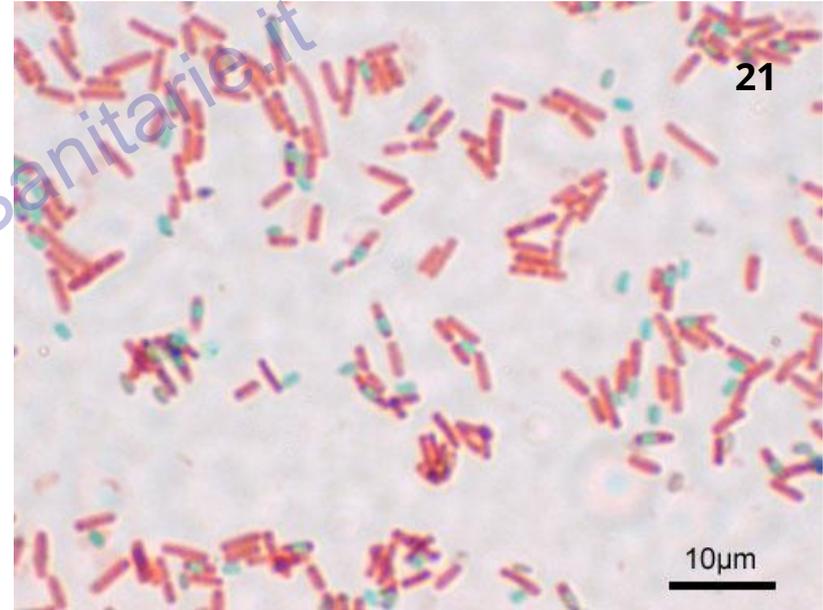
Fotografia al microscopio ottico di *B. subtilis* con le sue endospore

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis

Viene sfruttato per la produzione di amilasi e acido ialuronico.

Enzimi prodotti da questo bacillo (direttamente nei terreni di coltura) vengono usati nei detergenti che prevedono l'ammollo per la loro azione pulente.



Un'altra fotografia al microscopio ottico di *B. subtilis* con le sue endospore

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis

Ha un ruolo per la sua attività proteolitica ed enzimatica anche in numerosi cibi fermentati. Per esempio i cibi fermentati a base di cereali, mais e fagioli nelle Americhe



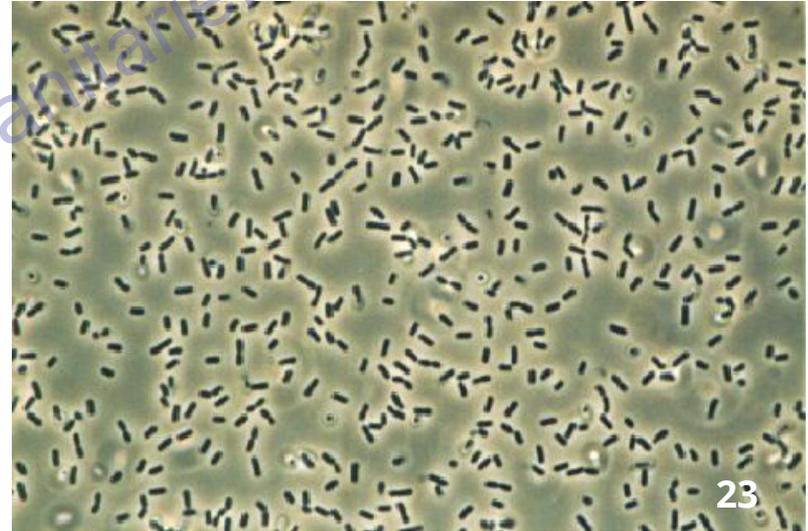
Foto di pozol, una pasta fermentata di mais con cui si ottiene anche una bevanda.
A sinistra: bevanda pronta per essere servita.
A destra: pasta fermentata con cacao.
Sembra avere origine nel Messico precolombiano

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis

Viene ampiamente utilizzato in certe aree geografiche nella medicina alternativa.

È stato sfruttato moltissimo come vaccino subtilico, prima dell'avvento degli antibiotici, come immunostimolante nella terapia di malattie del tratto gastroenterico.

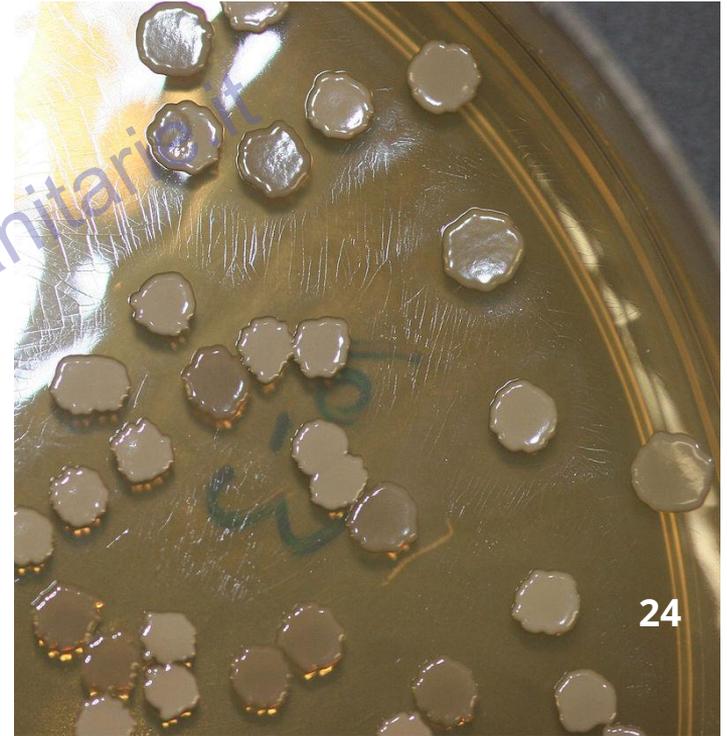


Un'altra fotografia al microscopio ottico di B. subtilis

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis

Può convertire alcuni esplosivi in composti innocui a base di azoto, anidride carbonica e acqua.

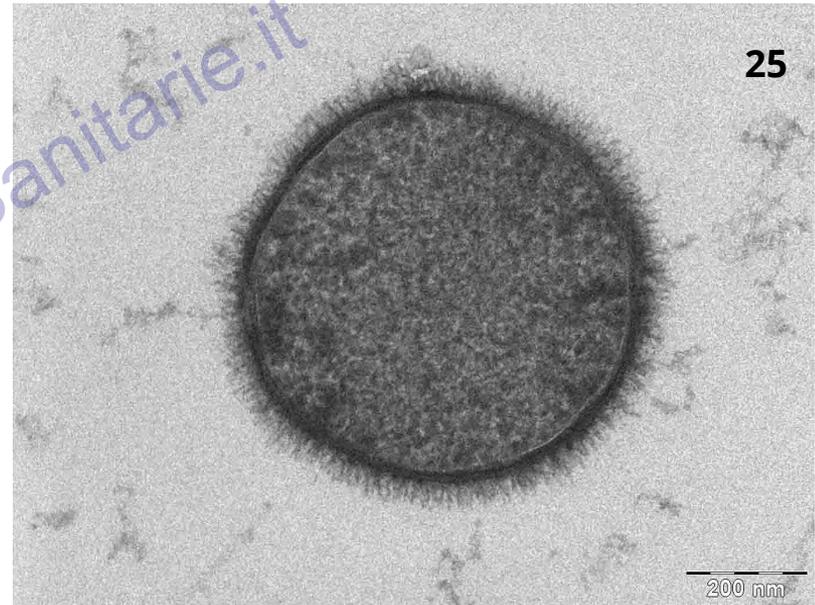


Coltura di *B. subtilis* in piastra Petri

Scelta della cellula ospite

Bacillus subtilis

Si sta studiando un suo possibile ruolo nel trattamento di rifiuti contenenti radionuclidi (torio e plutonio) migliorando la possibilità di cattura e contenimento.



Sezione trasversale di *B. subtilis* al microscopio elettronico

Scelta della cellula ospite

Indubbiamente le cellule procariote offrono molte importanti opportunità perché:

- ❖ **si coltivano facilmente, velocemente e con costi bassi**
- ❖ **le sequenze della tecnologia risultano meno complesse**
- ❖ **si possono sfruttare i plasmidi che sono loro componenti naturali**

Scelta della cellula ospite

Ma c'è anche da considerare che i plasmidi hanno il limite di non poter trasferire frammenti di genoma più lunghi al massimo di 10 kb.

Inoltre le cellule procariote non hanno neanche la possibilità di sopprimere gli introni nell'mRNA da geni degli eucarioti.

Scelta della cellula ospite

Le **cellule eucariote** sono preferite quando sulle proteine sintetizzate sono necessarie attività chimiche come tagli proteolitici, glicosilazioni, fosforilazioni, carbossilazioni ... perché le cellule procariote non hanno i sistemi biochimici necessari.

Scelta della cellula ospite

La più sfruttata è sicuramente **Saccharomyces cerevisiae** che ospita i cromosomi artificiali YAC.



Foto al microscopio elettronico a scansione di *S. cerevisiae*

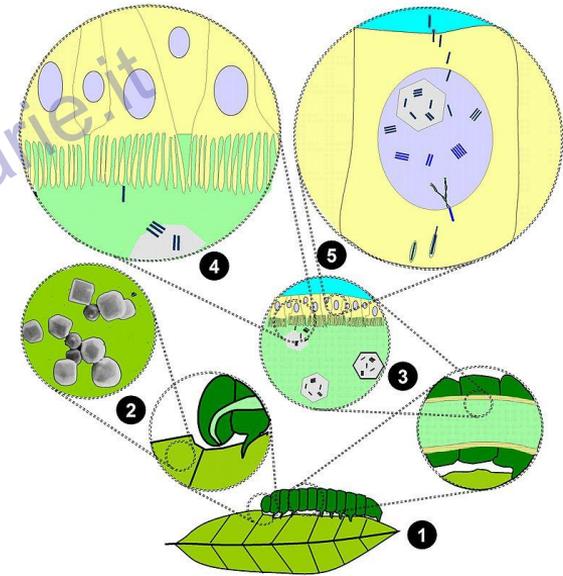
Scelta della cellula ospite

Le **cellule di insetto** sono facilmente coltivabili in vitro e producono molti vaccini e farmaci grazie al **Baculovirus**, particella virale bastoncellare.

L'uso dei Baculovirus nelle cellule di insetto è sfruttato anche per produrre proteine ed enzimi a scopo di ricerca e per produrre biopesticidi. Il Baculovirus ha un ciclo vitale piuttosto complesso.

Scelta della cellula ospite

Di lato è schematizzato il ciclo vitale del **Baculovirus**. Il virus in genere infetta gli stadi larvali degli insetti ospiti (circa 600 ospiti) che si cibano di matrici proteiche in cui è presente il virus. Fase 1 dell'infezione primaria.

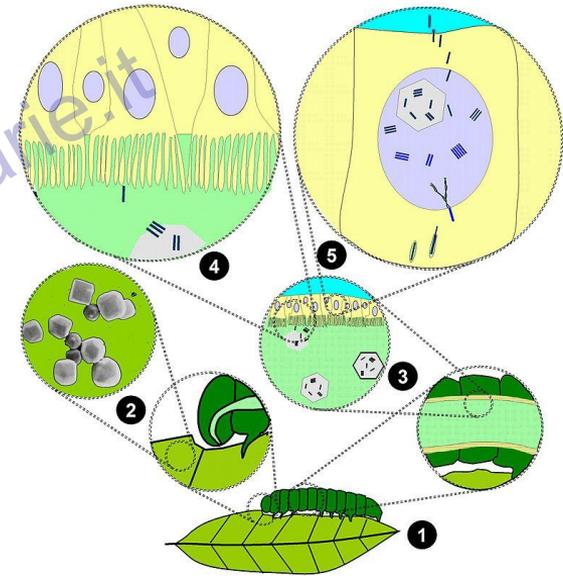


- | | |
|---|----------------|
| 1 Insect feeding on virus-contaminated foliage | Virus |
| 2 Close up of occlusion bodies (OBs) | Occlusion body |
| 3 Lumen of digestive tract (alkaline conditions) | Nucleus |
| 4 Virus particles being released from OBs and attaching to brush border of gut cells | Cytoplasm |
| 5 Replication of virus in insect cell | Hemocoel |
| | Gut lumen |
| | Plant |

Scelta della cellula ospite

La matrice proteica si dissolve nell'ambiente alcalino dello stomaco dell'ospite rilasciando le particelle virali (ODV). Le particelle a questo punto si fondono con la membrana delle cellule colonnari dell'intestino dell'ospite.

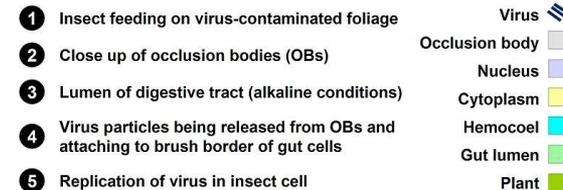
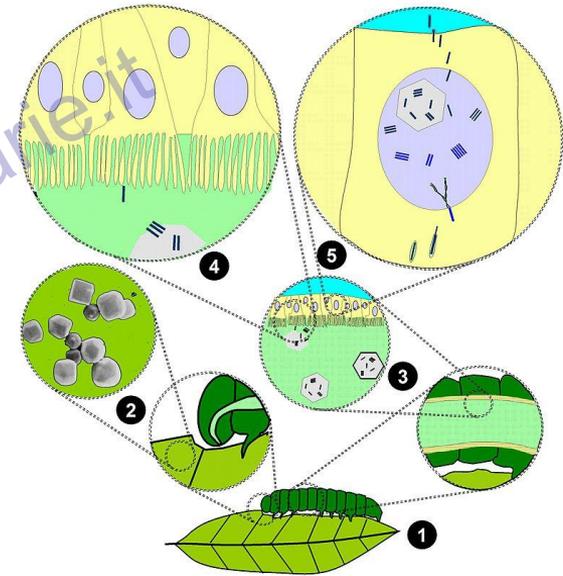
Fase 3 e 4



- | | |
|---|----------------|
| 1 Insect feeding on virus-contaminated foliage | Virus |
| 2 Close up of occlusion bodies (OBs) | Occlusion body |
| 3 Lumen of digestive tract (alkaline conditions) | Nucleus |
| 4 Virus particles being released from OBs and attaching to brush border of gut cells | Cytoplasm |
| 5 Replication of virus in insect cell | Hemocoel |
| | Gut lumen |
| | Plant |

Scelta della cellula ospite

Il virus, inglobato in un endosoma, si ritrova così all'interno delle cellule ospiti e può iniziare a replicarsi. Fase 5. Nuove particelle virali (BV) si formano all'interno del nucleo e vengono rilasciate dal lato basale della cellula ospite e l'infezione si può diffondere sistematicamente.

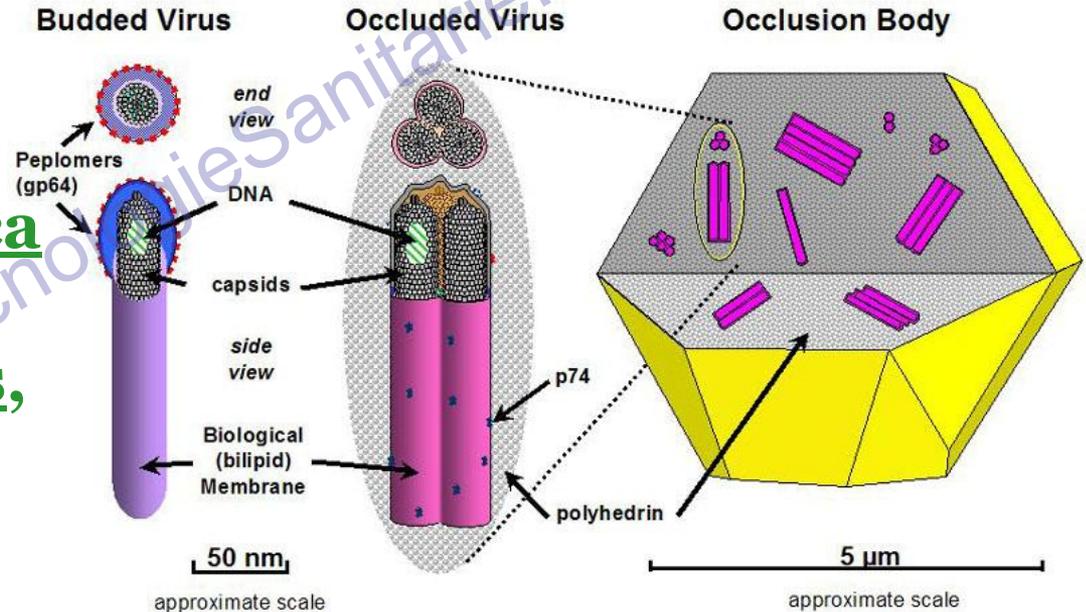


Scelta della cellula ospite

Il ciclo complesso del virus è stato studiato in particolare in Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus, il più studiato tra i baculovirus

Baculovirus
Multicapsid nucleopolyhedrovirus

28

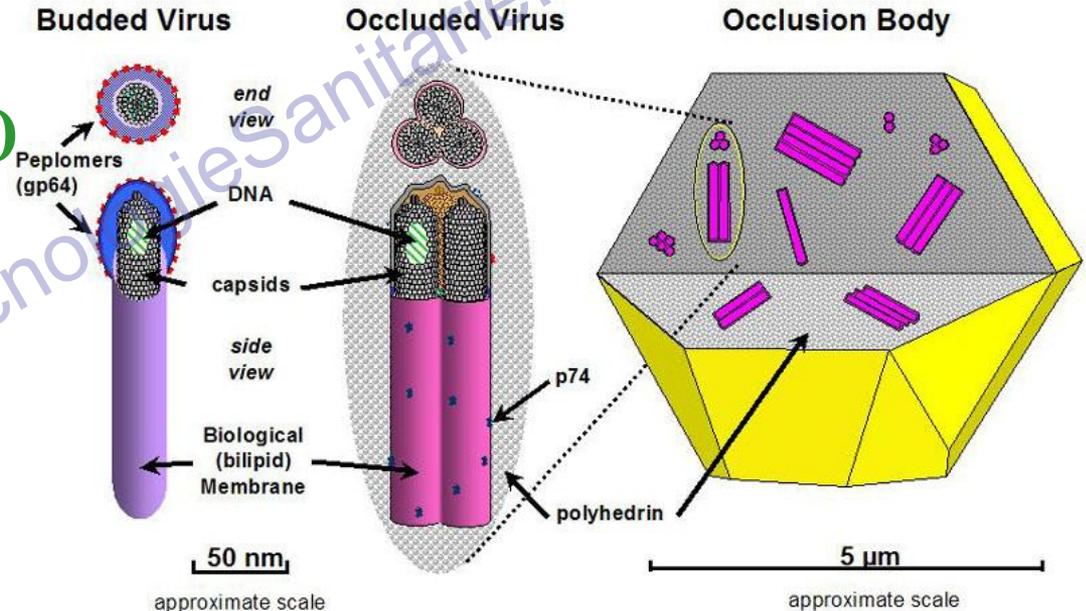


Scelta della cellula ospite

Nella figura di lato si possono notare le differenze tra le particelle BV a (sinistra) e le ODV al centro. Sulla destra la matrice proteica (poliedrina) in cui sono incluse le particelle ODV da cui inizia nuovamente il ciclo.

Baculovirus
Multicapsid nucleopolyhedrovirus

28



Scelta della cellula ospite

Cellule vegetali o di mammifero sono utilizzate soprattutto per l'espressione di geni esogeni e la produzione di animali o piante transgenici

BioTechnologySanitaria.it

4. Tecniche di trasferimento del vettore nella cellula ospite

BioTecnologieSanitarie.it

Trasferimento del vettore

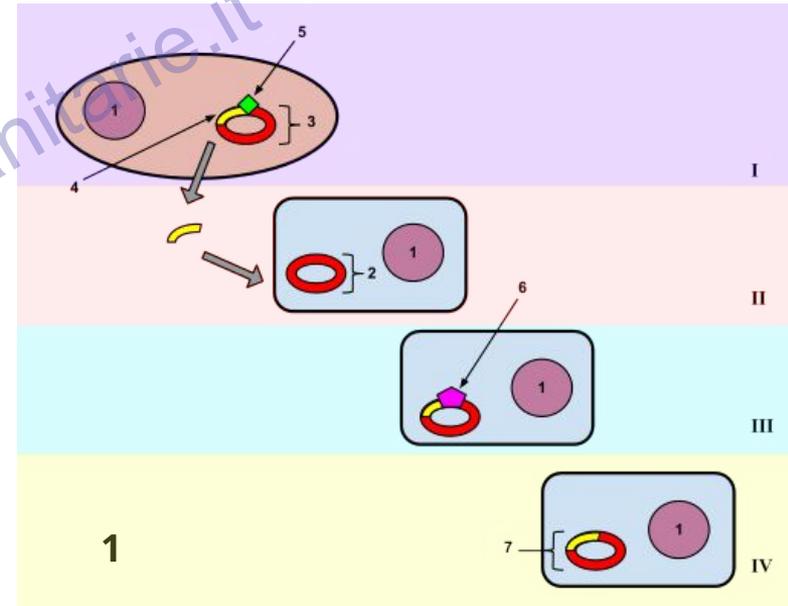
Vediamo ora come si può trasferire un vettore all'interno della cellula ospite. I meccanismi sono:

- ❖ trasformazione
- ❖ elettroporazione
- ❖ fusione di protoplasti
- ❖ introduzione a pressione di microparticelle

La **trasformazione** è tipica di batteri e lieviti ma generalmente nelle cellule eucariote animali si parla di **trasfezione**

Trasferimento del vettore

La **trasformazione** è un meccanismo di ricombinazione genica che si verifica di norma nei batteri e di cui abbiamo già parlato nelle diapositive 8 e 9. Il disegno a fianco ne illustra le fasi tra due batteri ma può avvenire anche tra batteri e plasmidi.



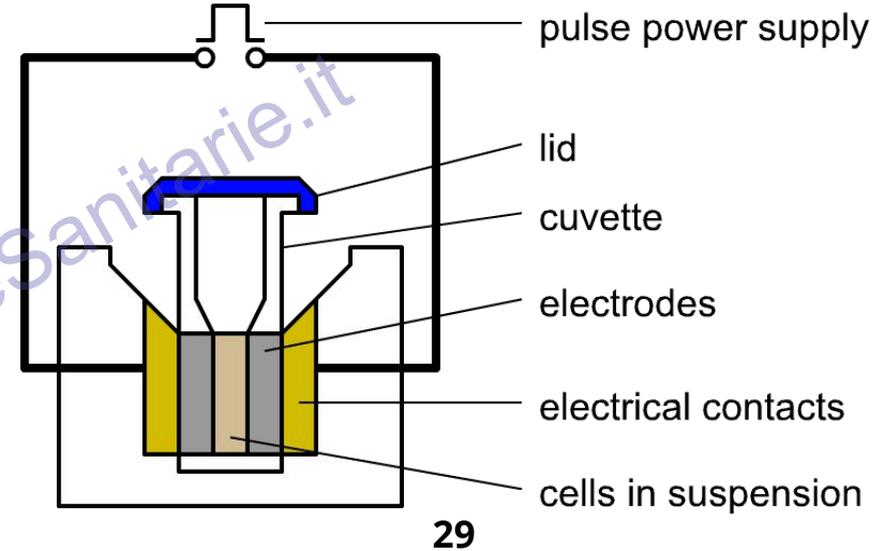
Trasferimento del vettore

I batteri vengono inseriti in un brodo di coltura insieme ai plasmidi, vettori di un gene esogeno. Quasi sicuramente alcune cellule introdurranno al loro interno i plasmidi. Ovviamente per farlo devono avere dei recettori specifici, devono essere cioè competenti.

A volte la competenza si può indurre, usando, per esempio, CaCl_2 .

Trasferimento del vettore

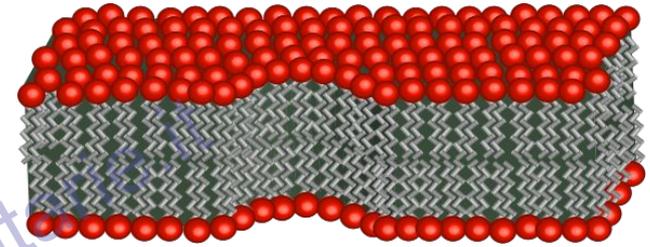
L'**elettroporazione** è un metodo piuttosto semplice per trasferire DNA all'interno di cellule batteriche, lieviti, protoplasti e cellule vegetali.



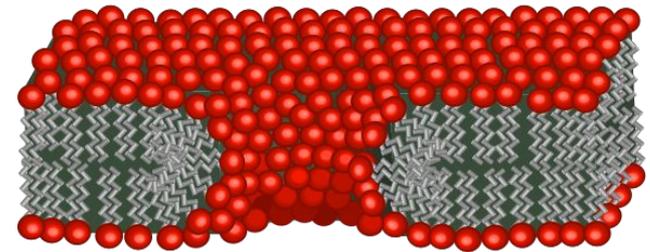
Il DNA e le cellule vengono poste all'interno di cuvette particolari in una sospensione liquida.

Trasferimento del vettore

Il passaggio di un impulso elettrico, modulato a seconda del sistema, consente di aprire dei pori nella membrana cellulare simultaneamente.



30



Modalità diverse di formazione di pori all'interno della membrana cellulare. In alto: poro idrofobico in cui i fosfolipidi non si sono riarrangiati. In basso: poro idrofilo in cui le teste dei fosfolipidi hanno subito un riarrangiamento.

Trasferimento del vettore

E questo permette al DNA di penetrare all'interno delle cellule. Oltre che per le tecniche ricombinanti viene sperimentata su cellule di metastasi e tessuto cardiaco.



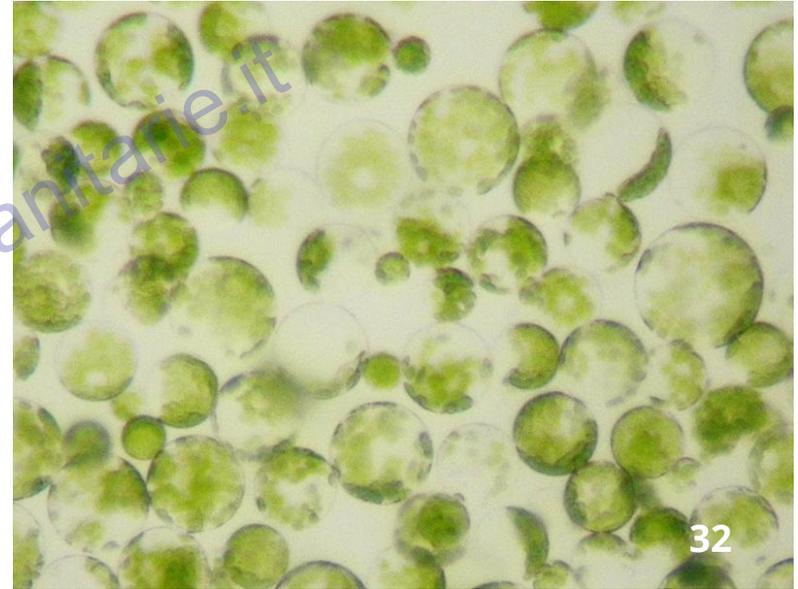
31

Cuvette di plastica con tappo blu ed elettrodi di alluminio. Capacità massima di 400 μ l.

Trasferimento del vettore

Fusione di protoplasti.

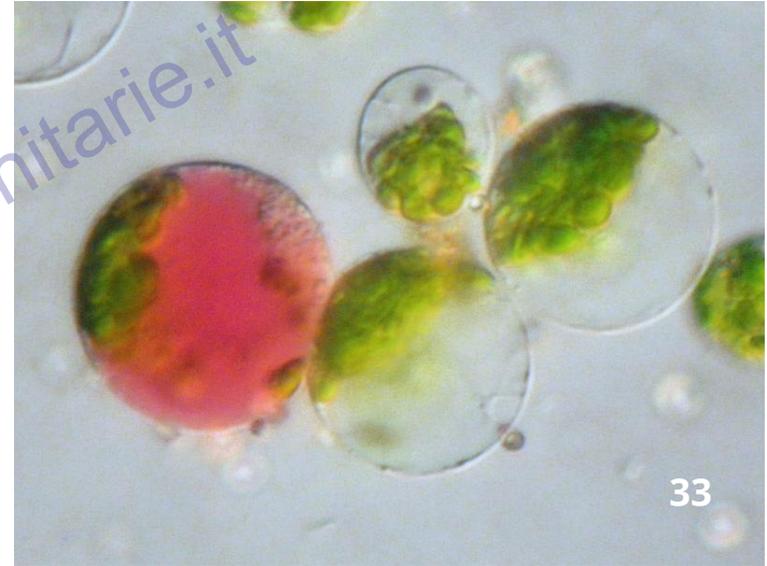
Il metodo si applica alle cellule dotate di parete e quindi alle cellule vegetali e batteriche. La parete cellulare è un ostacolo (per esempio alla elettroporazione) e quindi deve essere rimossa. Questo può avvenire per via enzimatica.



Protoplasti ottenuti da foglie di petunie

Trasferimento del vettore

Gli enzimi devono degradare i polisaccaridi della parete. Una volta ottenuti i protoplasti si può agire usando tecniche diverse. Dal momento che non è raro vedere la fusione di protoplasti si può ricorrere anche a questo metodo per incorporare i DNA di due cellule diverse.



A sinistra si vede un protoplasto ottenuto dalla fusione di un cloroplasto (da foglia) con un vacuolo colorato (da petalo)

Trasferimento del vettore

Introduzione di microparticelle

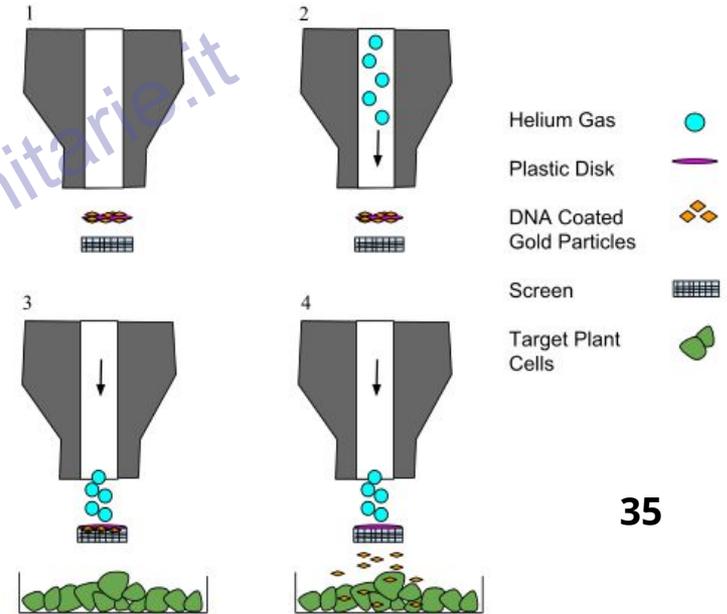
Sempre con le cellule vegetali si ricorre all'introduzione a pressione di microparticelle di tungsteno o di altro materiale ricoperte dal DNA esogeno che vengono sparate con una sorta di pistola (cannone genico).



Strumento per il trasferimento di microparticelle

Trasferimento del vettore

Di fianco si può vedere il meccanismo di uno di questi cannoni che funziona a gas elio e con il DNA esogeno che riveste particelle d'oro. L'elio è usato come gas propellente.



35

5. Selezione dei cloni ricombinanti

BioTechnologiesSanitarie.it

Selezione dei cloni ricombinanti

Questo argomento è stato già trattato precedentemente ma in modo superficiale, a proposito dei vari tipi di vettori quando è stato spiegato il motivo per cui è necessario introdurre i geni marcatori.

Selezione dei cloni ricombinanti

Ora vediamo nei dettagli le pratiche laboratoriali più diffuse per selezionare i cloni cellulari in cui il passaggio di DNA esogeno attraverso i vettori è avvenuto con successo.

Parliamo di:

- ❖ inattivazione inserzionale
- ❖ α -complementazione

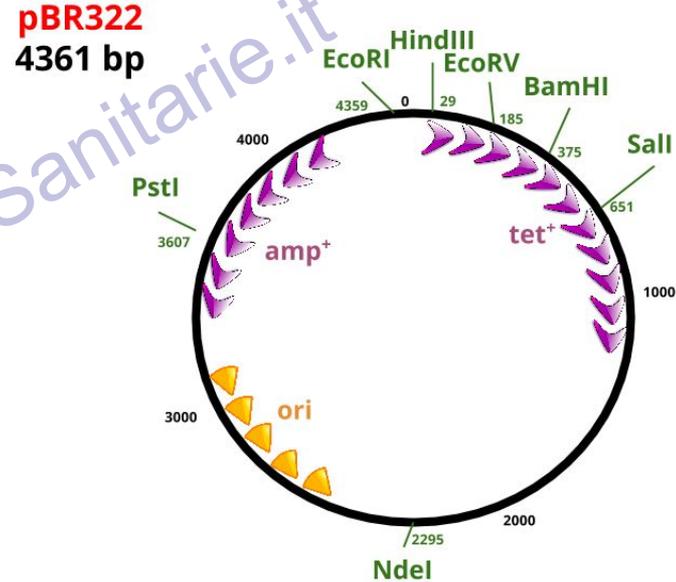
Selezione dei cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

Per capire in che cosa consiste questa metodologia cominciamo con il ricordare il vettore a cui si può applicare cioè il plasmide pBR322 che è caratterizzato dai suoi geni marcatori cioè quelli che codificano per la resistenza agli antibiotici (ampicillina e tetraciclina in questo caso).

Selezione dei cloni ricombinanti

Come si può notare, quando operano, gli enzimi di restrizione possono tagliare all'interno dei geni legati alla resistenza agli antibiotici.



Selezione dei cloni ricombinanti

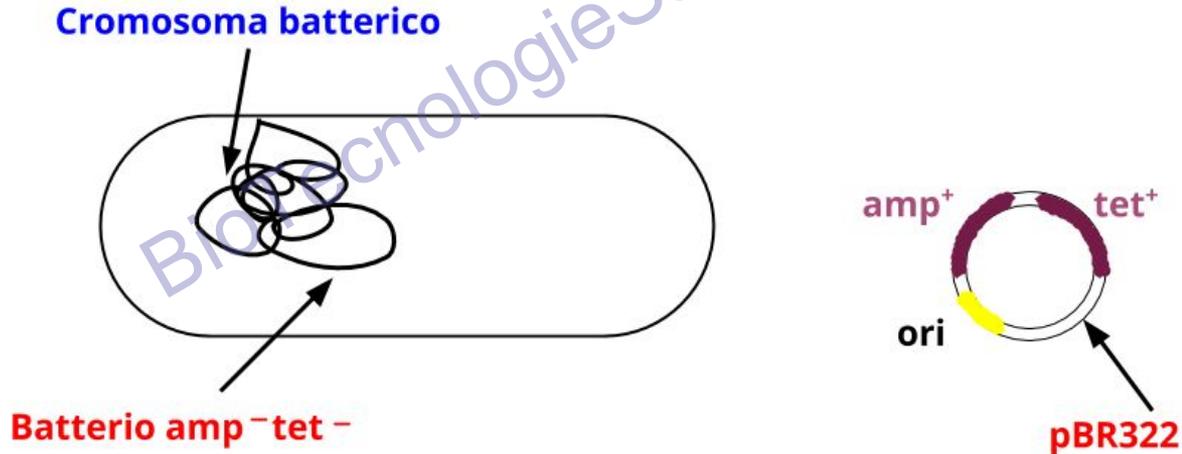
Gli studi sui batteri ci hanno insegnato che quando un batterio senza alcuna forma di resistenza all'ampicillina o alla tetraciclina inserisce un plasmide con i geni di resistenza ai due antibiotici svilupperà questa resistenza specifica. Immagine nella slide successiva.

Selezione dei cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

Premessa

Plasmide pBR322 per il trasferimento di resistenza ad ampicillina e tetraciclina in un batterio non resistente.



37

Selezione dei cloni ricombinanti

Ma se l'enzima di restrizione ha tagliato a livello del gene per la resistenza alla tetraciclina questo fatto può essere utilizzato per isolare il clone batterico ricombinante.

Infatti questo batterio svilupperà resistenza solo alla ampicillina. Immagine nella slide successiva.

Selezione dei cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

Plasmide pBR322 per il trasferimento in una cellula batterica di un gene di interesse (esogeno) insieme alla resistenza verso l'antibiotico ampicillina.

Fase 1: enzimi di restrizione al lavoro



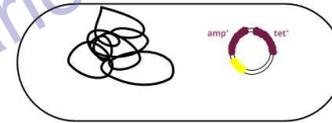
38

Selezione dei cloni ricombinanti

Una volta avvenuto il trasferimento del vettore all'interno della cellula ospite si possono verificare tre situazioni diverse, evidenziate nella figura di fianco.

Inattivazione inserzionale

Fase 2: dopo la trasformazione ecco i risultati possibili



Batterio amp^+ tet^+ con plasmide originario ma non ricombinato



Batterio amp^- tet^- senza plasmide



Batterio amp^+ tet^- con plasmide con inserto che ha creato resistenza solo all'ampicillina

39

Selezione dei cloni ricombinanti

La figura della slide precedente si può riassumere in due casi di trasformazione fallita e in un caso (l'ultimo) in cui è avvenuto con successo non solo l'inserimento del gene esogeno nel plasmide ma anche la trasformazione batterica cioè il trasferimento del plasmide con inserto all'interno della cellula batterica (clone ricombinante).

Selezione dei cloni ricombinanti

Il problema a questo punto è come selezionare solo il clone ricombinante cioè le cellule batteriche con plasmide ingegnerizzato che hanno sviluppato resistenza alla sola ampicillina.

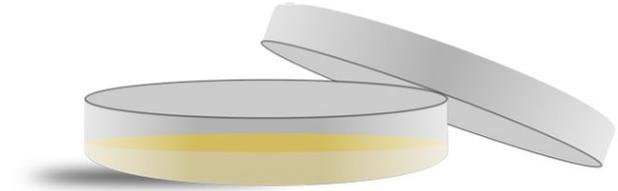
Si procede con una serie di semine su terreni diversi, si aspettano i tempi necessari di incubazione e poi si leggono i risultati.

Selezione dei cloni ricombinanti

La prima semina avviene in terreno con ampicillina sul quale crescono solo le cellule batteriche che hanno sviluppato resistenza all'ampicillina.

Inattivazione inserzionale

Fase 3: semina in terreno con ampicillina



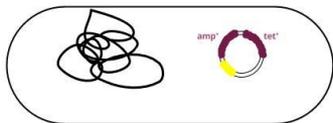
La prima semina in terreno con ampicillina

40

Selezione dei cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

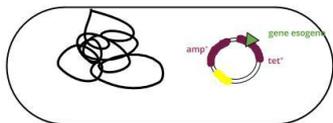
Fase 2: dopo la trasformazione ecco i risultati possibili



Batterio amp⁺ tet⁺ con plasmide originario ma non ricombinato



Batterio amp⁻ tet⁻ senza plasmide



Batterio amp⁺ tet⁻ con plasmide con inserto che ha creato resistenza solo all'ampicillina

39

Inattivazione inserzionale

Fase 3: semina in terreno con ampicillina



La prima semina in terreno con ampicillina

40

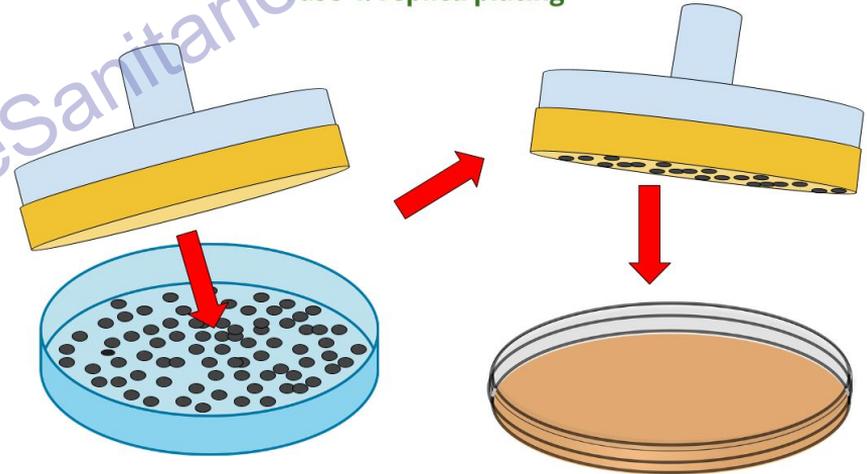
Questa semina però serve solo ad escludere dalla selezione le cellule batteriche che non hanno incorporato alcun plasmide (Batterio amp⁻ tet⁻)

Selezione dei cloni ricombinanti

Quindi è necessario trasferire le colonie su un altro terreno selettivo a cui viene aggiunta anche la tetraciclina. Per questa fase si usa la tecnica detta **replica plating**

Inattivazione inserzionale

Fase 4: replica plating



Terreno con ampicillina.
Colonie di due cloni entrambe con plasmidi

Terreno con ampicillina e tetraciclina.
Trasferimento di colonie per isolare il clone ricombinato

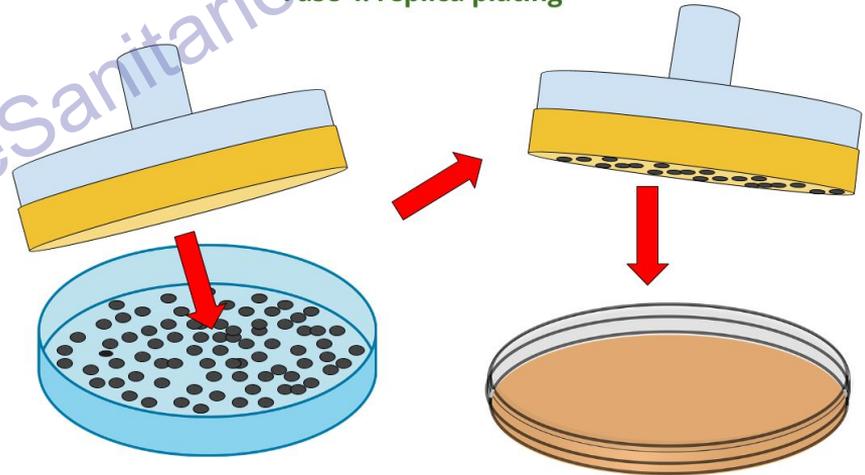
41

Selezione dei cloni ricombinanti

La tecnica del replica plating è stata sviluppata nel 1952 e consente di ottenere un certo numero di piastre Petri con la stessa disposizione spaziale di colonie.

Inattivazione inserzionale

Fase 4: replica plating



Terreno con ampicillina.
Colonie di due cloni entrambe con plasmidi

Terreno con ampicillina e tetraciclina.
Trasferimento di colonie per isolare il clone ricombinato

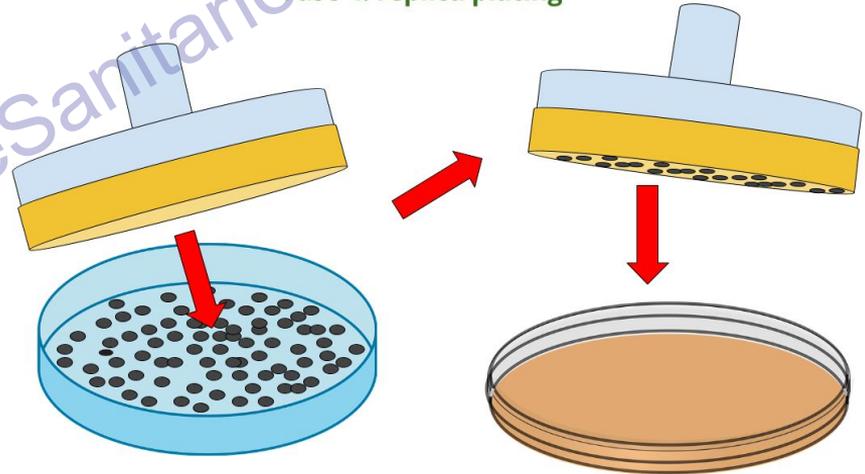
41

Selezione dei cloni ricombinanti

Si parte da una piastra primaria su cui si poggia delicatamente un velluto sterile che poi viene trasferito su altre piastre (piastre secondarie).

Inattivazione inserzionale

Fase 4: replica plating



Terreno con ampicillina.
Colonie di due cloni entrambe con plasmidi

Terreno con ampicillina e tetraciclina.
Trasferimento di colonie per isolare il clone ricombinato

41

Selezione dei cloni ricombinanti

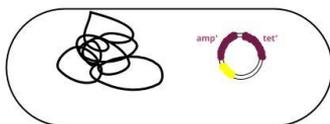
Dopo il necessario periodo di incubazione si potranno riconoscere facilmente i cloni ricombinanti.

Infatti questi, avendo avuto l'interruzione del gene per la resistenza alla tetraciclina, non ne hanno acquisito la resistenza e non possono crescere sull'ultimo terreno saggiato.

Selezione dei cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

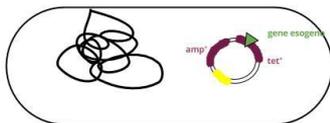
Fase 2: dopo la trasformazione ecco i risultati possibili



Batterio amp⁺ tet⁺ con plasmide originario ma non ricombinato



Batterio amp⁻ tet⁻ senza plasmide

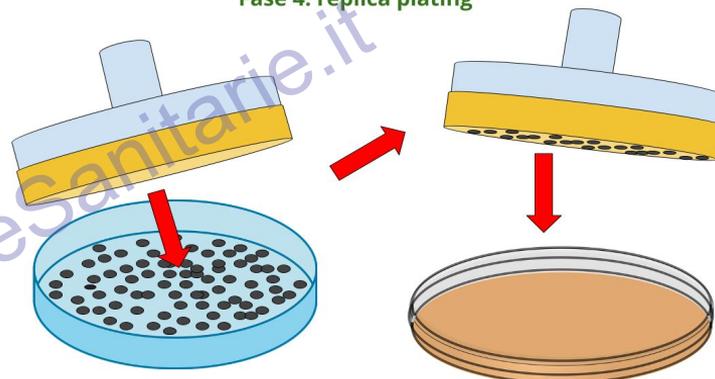


39

Batterio amp⁺ tet⁻ con plasmide con inserto che ha creato resistenza solo all'ampicillina

Inattivazione inserzionale

Fase 4: replica plating



Terreno con ampicillina.
Colonie di due cloni entrambe con plasmidi

Terreno con ampicillina e tetraciclina.
Trasferimento di colonie per isolare il clone ricombinato

41

**Sulla seconda piastra possono crescere solo i batteri amp⁺ tet⁺
Per confronto si riconoscono nella prima i cloni ricombinanti.**

Selezione dei cloni ricombinanti

Passiamo al secondo metodo che vede come protagonista ad esempio il plasmide pUC19.

Si tratta dell' **α -complementazione** che sfrutta anch'essa una via metabolica.

In gioco questa volta c'è un enzima, la β -galattosidasi.

Selezione dei cloni ricombinanti

La **β -galattosidasi** è l'enzima che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio e ha due domini: α e Ω .

Entrambi devono essere funzionali.

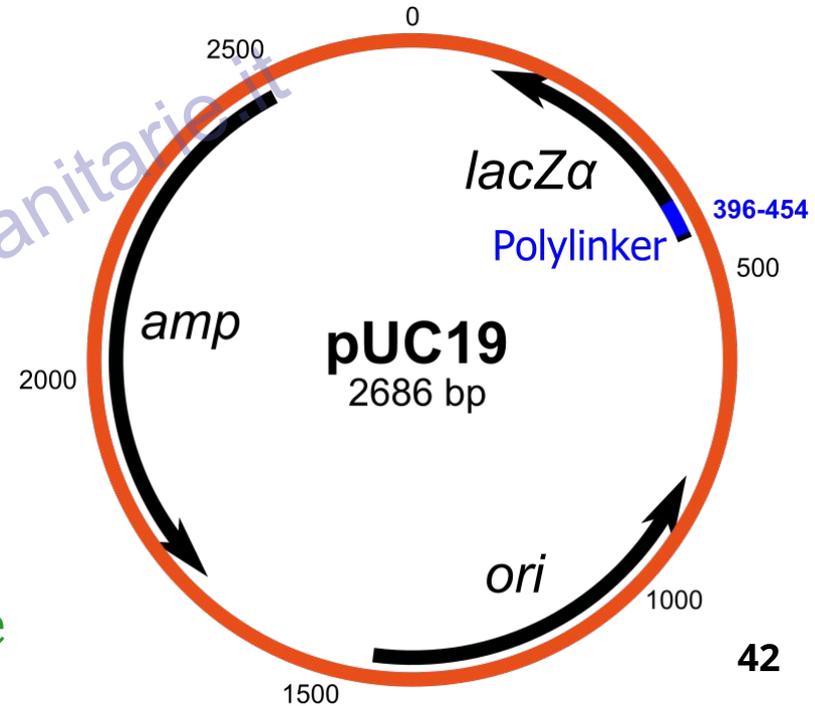
L'enzima agisce anche su altri substrati analoghi come lo X-Gal che viene idrolizzato producendo un cromogeno blu.

L' α -complementazione sfrutta tutto ciò.

Selezione dei cloni ricombinanti

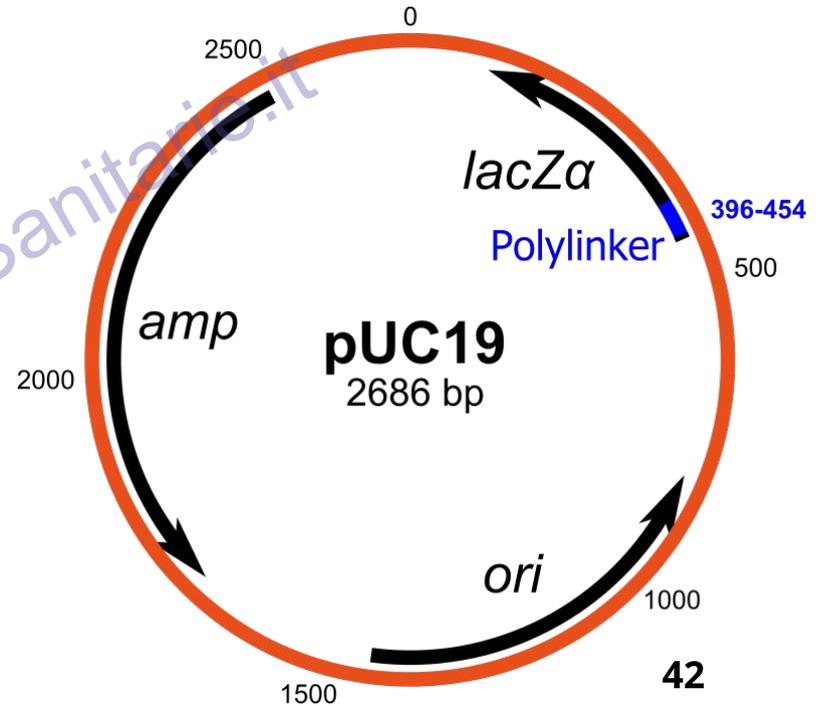
Cominciamo ad esaminare il plasmide pUC19:

- è più piccolo del pBR322
- ha solo 2686 paia di basi azotate
- anche in questo si nota l'origine della replicazione (**ori**)



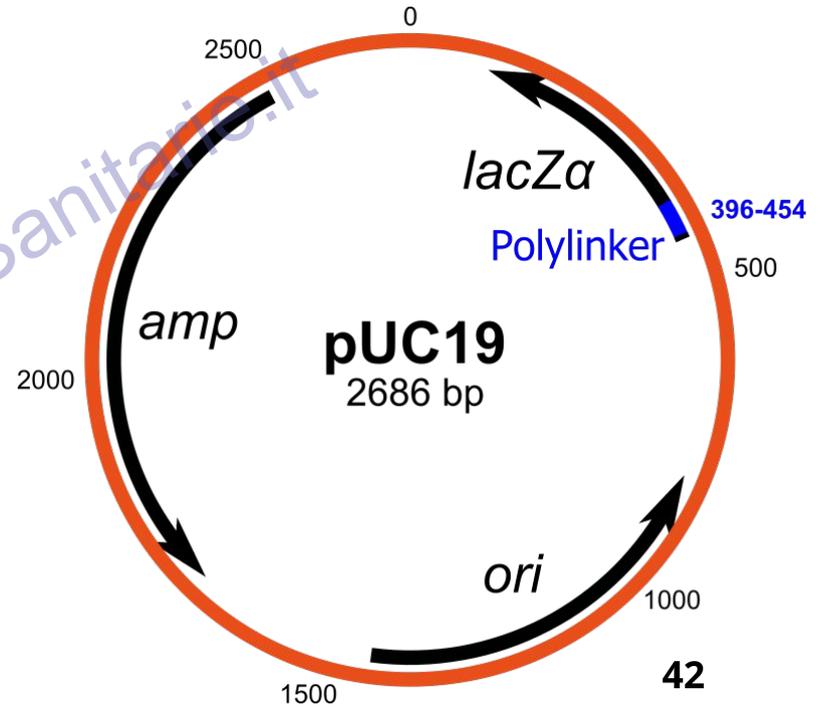
Selezione dei cloni ricombinanti

- c'è il gene per la resistenza all'ampicillina (utile per la selezione dei cloni ricombinanti)
- il polylinker
- un'ulteriore zona chiamata **lacZ α**



Selezione dei cloni ricombinanti

lacZα è il gene per la *frazione alfa della beta galattosidasi*. Si può notare che anche in questo caso gli enzimi di restrizione vanno a lavorare proprio sul gene *lacZα*.



Selezione dei cloni ricombinanti

Quindi, quando si inserisce il gene esogeno questo va ad interrompere l'espressione del gene $lacZ\alpha$ esattamente come nell'inattivazione inserzionale dove si interrompe l'espressione del gene per la resistenza alla tetraciclina.

Isolare il clone ricombinante è facile sfruttando il cromogeno blu che si ottiene dall'idrolisi di X-Gal

Selezione dei cloni ricombinanti

Che materiale prevede questa tecnica?

- ❖ ceppi mutati di *Escherichia coli* che mancano del gene lacZ α (frazione α)
- ❖ i plasmidi pUC19 descritti
- ❖ terreno di coltura particolare contenente X-gal, ampicillina e un induttore IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside)

Selezione dei cloni ricombinanti

Per prima cosa bisogna seminare il terreno appena descritto. Dopo l'incubazione i risultati possono essere tre:

- ❖ i batteri che non hanno incorporato i plasmidi non crescono sul terreno con ampicillina
- ❖ i batteri che hanno incorporato il plasmide senza DNA esogeno idrolizzeranno X-Gal con produzione di colonie blu
- ❖ i batteri con trasformazione di successo (plasmide ricombinante incorporato) formeranno colonie bianche

Screening bianco-blu

Dopo la trasformazione ecco i risultati possibili



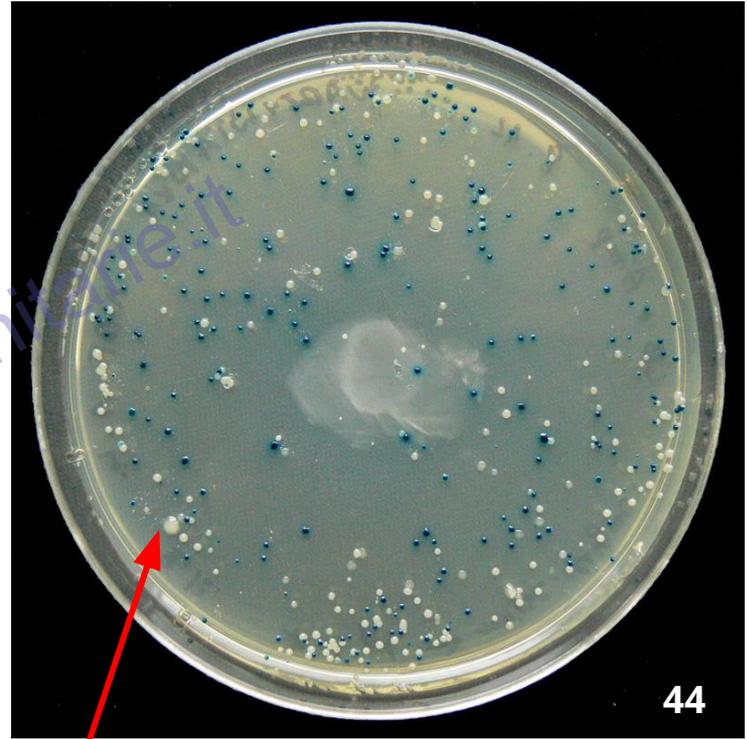
Batterio amp⁻: non ha incorporato il plasmide, risulta ancora sensibile alla ampicillina e quindi non cresce sul terreno



Batterio amp⁺ lacZ^a: ha incorporato il plasmide ma non quello ricombinante e idrolizzerà X-Gal formando colonie blu in quanto ha acquisito i geni mancanti per la sintesi della β-galattosidasi



Batterio amp⁺: ha incorporato il plasmide ricombinante, quindi ha acquisito resistenza all'ampicillina e cresce sul terreno ma il gene esogene ha interrotto la sequenza genica necessaria alla sintesi della β-galattosidasi e quindi svilupperà colonie bianche



44

Le colonie bianche sono quelle sviluppate dai batteri che hanno incorporato correttamente il plasmide ricombinante

Selezione dei cloni ricombinanti

Il metodo non è macchinoso ma ha dei limiti.

Essendo manuale, non può essere utilizzato se la conta delle colonie è superiore a 10^6 .

Inoltre la presenza di colonie bianche è solo indicativa di gene esogeno ma non ci dice se sia effettivamente il frammento di interesse. Per saperlo bisogna ricorrere alla ibridazione su colonia.

Photo credits

- 1** By Sprovenzano15 (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons
- 2** Di Antonio G Colombo - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5232065>
- 3** By Steve Jurvetson - Hamming it Up, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2561577>
- 4** Immagine di proprietà de R&D Studio associato
- 5** By Ramin Herati (Created with Inkscape) [Public domain], via Wikimedia Commons
- 6** By Helixitta (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], via Wikimedia Commons
- 7** By Tinastella (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons
- 8** By Tom Ellenberger, Washington University School of Medicine in St. Louis. - Biomedical Beat, Cool Image Gallery, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1604274>
- 9** By Madprime - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2161789>

Photo credits

- 10** By Jjw (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Commons
- 11** By School of Natural Resources from Ann Arbor (DNA lab) [CC BY 2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)], via Wikimedia Commons
- 12** Di Mnolf - Photo taken in Innsbruck, Austria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1131449>
- 13** By Tinastella (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons
- 14** By Original: David TribeDerivative (SVG): Hazmat2 - Original: <http://en.citizendium.org/wiki/Image:Bidirectionalrep2.jpg>, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17667700>
- 15** Public Domain, <https://en.wikibooks.org/w/index.php?curid=214439>
- 16** Disegno di proprietà dello studio associato R&D
- 17** By Peteruetz - Originally for Rajagopala et al. 2011, BMC Microbiology 11: 213Previously published: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/213>, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=23695740>

Photo credits

18 Автор: Zlir'a - Власна работа, CCo,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19153728>

19 Di Credit: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH - NIAID: These high-resolution (300 dpi) images may be downloaded directly from this site. All the images, except specified ones from the World Health Organization (WHO), are in the public domain. For the public domain images, there is no copyright, no permission required, and no charge for their use., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=104228>

20 By WMrapids - Own work, CCo,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=43944203>

21 By Y tambe (original uploader) - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49530>

22a By AlejandroLinaresGarcia - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15362754>

22b By Alfonsobouchot - Own work, GFDL,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14667329>

23 Di Kookaburra di Wikipedia in tedesco - Trasferito da de.wikipedia su Commons., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7022865>

Photo credits

24 By Debivort at the English language Wikipedia, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7175271>

25 By Allonweiner at English Wikipedia - Transferred from en.wikipedia to Commons by alnokta., Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4487608>

26 By Mogana Das Murtey and Patchamuthu Ramasamy - [1], CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=52254246>

27 By Ikehiker at the English language Wikipedia, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19529081>

28 Public Domain, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=4274784>

29 Di Zephyris da en.wikipedia.org, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2785763>

30 By MDougM - Own work, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5946526>

31 Di Zephyris da en.wikipedia.org, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2785749>

32 Di Mnolf - Opera propria, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6103785>

Photo credits

33 By Mnolf - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6103776>

34 Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=353826>

35 By RachelBrooks15 - Own work, CC BY-SA 4.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=40535573>

36 37 38 39 40 41 Disegni di proprietà dello studio associato R&D

42 By Yikrazuul - Own work; NEB, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12097477>

43 Disegni di proprietà dello studio associato R&D

44 By Stefan Walkowski - Own work, GFDL,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8975334>