

A scuola di.....'Taglio e cucito'

**PLS-BIOTECNOLOGIE
2016-2017**

***Dipartimento di Scienze
Università degli Studi della Basilicata***



ATTIVITA' 1: BIANCO O BLU?

Per distinguere le cellule batteriche che hanno acquisito il vettore plasmidico con inserto (vettore ricombinante) da quelle che hanno acquisito il solo vettore plasmidico (vettore non ricombinante) si allestisce un test colorimetrico (bianco o blu). Il vettore da noi utilizzato contiene il gene selvatico lacZ che codifica per la β -galattosidasi. Nel vettore il polylinker, cioè il sito di clonaggio in corrispondenza del quale avviene l'inserimento del DNA esogeno, è posizionato all'interno del gene lacZ.

Se una cellula batterica viene trasformata dal solo plasmide (cioè dal vettore di clonaggio non ricombinante), in presenza di **IPTG** (isopropil-tiogalattoside, un analogo del lattosio che induce l'espressione del gene lacZ) e di un substrato cromogeno della β -galattosidasi, come l'**X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside), la β -galattosidasi scinde l'**X-gal** in un prodotto precursore dell'indaco. Le colonie batteriche quindi assumeranno un colore **blu**. Se nel gene lacZ del plasmide è stato inserito del DNA estraneo, le cellule batteriche trasformate non producono più la β -galattosidasi. Pertanto, in presenza di IPTG e di X-gal nel terreno di coltura, l'**X-gal** non viene trasformato nel precursore dell'indaco. Di conseguenza, le colonie batteriche trasformate con il vettore ricombinante saranno **bianche**.

1) Preparazione piastra contenente LB (Lysogeny Broth) con agar e ampicillina

- ❖ Mettere circa 80 mL di acqua distillata in una bottiglia di vetro e, mentre è in agitazione, aggiungere 1 g di Triptone, 0,5 g di NaCl, 0,5 g di Estratto di lievito e 1,5 g di agar, lasciar sciogliere completamente e portare il volume a 100 mL. Autoclavare.

LB è un terreno di coltura i cui componenti, estratto di lievito e peptidi ottenuti da digestione di caseina con tripsina, forniscono carboidrati, amminoacidi, nucleotidi, sali e vitamine per la crescita batterica. NaCl serve per creare un ambiente isotonic.

- ❖ Lasciar raffreddare a circa 50 °C, quindi aggiungere l'ampicillina: 200 μ L di ampicillina dalla soluzione madre 50 mg/mL.

Versare in piastre da 90 mm: con 100 mL si ottengono circa 4 piastre. Lasciare solidificare e riporre le piastre capovolte a +4 °C fino all'utilizzo.

L'aggiunta dell'antibiotico ampicillina al terreno LB serve a selezionare la crescita dei soli batteri che presentano il carattere di resistenza a questo antibiotico.

L'agar serve a rendere solido il terreno LB: è un polisaccaride estratto da alcune alghe rosse, si scioglie nel terreno di coltura a temperatura superiore a 80 °C e gelifica sotto i 40 °C.

2) Screening Bianco/ blu

- ❖ Preparare per ogni piastra una miscela di:

- 40 μ L di IPTG 0,1 M;
- 20 μ L di X-GAL 40 mg/mL in DMF

Per fare questo conviene preparare una miscela contenente le due soluzioni nelle opportune quantità (ad esempio per 4 piastre: $(4 * 40 \mu\text{L di IPTG } 0,1 \text{ M}) = 160 \mu\text{L IPTG } 0,1 \text{ M} + (4 * 20 \mu\text{L di X-GAL } 40 \text{ mg/mL}) = 80 \mu\text{L di X-GAL } 40 \text{ mg/mL}$) e pipettare 60 μ L su ciascuna piastra. (N.B.: distribuire il liquido in modo uniforme sulla superficie della piastra, utilizzando l'apposita spatola sterile). Lasciare asciugare per circa 10 min a T ambiente.

- ❖ Piastrare 100 μ L di cellule trasformate. Distribuire le cellule in modo uniforme utilizzando l'apposita spatola sterile).
- ❖ Attendere qualche minuto prima di capovolgere le piastre (per evitare che in stufa la condensa cada sulle cellule) e incubarle in stufa a 37 °C per una notte.
- ❖ Mettere la piastra in frigo almeno per una decina di minuti e le colonie blu appariranno più visibili rispetto alle bianche

Le cellule competenti DH5ALPHA sono mutanti, cioè non producono β -galattosidasi endogena (*lacZ*) e ampicillina-sensibili (*amp^s*), cioè non in grado di formare colone in un terreno contenente l'antibiotico ampicillina. Esse acquisiscono la capacità di crescere in presenza di ampicillina solo se trasformate con il vettore che porta come marcatore di selezione il gene per la resistenza all'ampicillina. Il vettore da noi utilizzato è il pDRIVE. Le cellule che crescono su ampicillina hanno pertanto acquisito il vettore. Quanto al colore delle colonie, esse saranno blu se i batteri sono stati trasformati con il vettore ricombinante e bianche se trasformate con il solo vettore.

ATTIVITA' 2: RICOMBINANTE O NON RICOMBINANTE?

1) Estrazione del DNA plasmidico

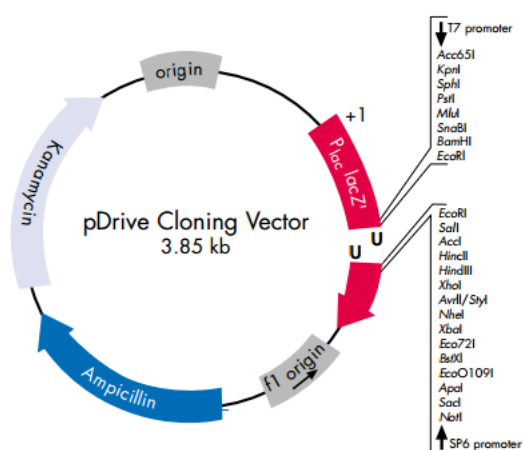
Questo esperimento ha lo scopo di estrarre il DNA plasmidico, pDrive, al fine di confermare se esso è ricombinante oppure no, ovvero se ha inglobato l'inserito di DNA "estraneo". E' stato usato il kit "PureYield Plasmid Miniprep System" della Promega, di seguito il procedimento:

- ❖ trasferire 1,5mL di ciascuna coltura (ricombinante e non) in una eppendorf da 1,5mL e centrifugare a 13000rpm per 1 minuto (questo step serve a raccogliere i batteri cresciuti durante la notte), e si rimuove il terreno;
- ❖ risospendere il pellet cellulare in 600 μ L di TE Buffer o acqua, aggiungere 100 μ L di "Cell Lysis Buffer (Blue)" e bisogna risospendere il tutto capovolgendo per 6 volte la eppendorf, infine aggiungere 350 μ L di "Neutralization Solution" fredda (4-8°C) e bisogna risospendere capovolgendo alcune volte la eppendorf;
- ❖ centrifugare la mix a 13000rpm per 3 minuti;

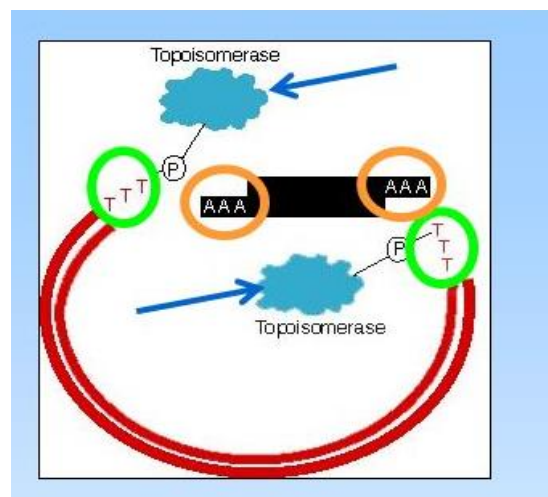
- ❖ trasferire il surnatante (circa 900µL) in una “PureYield Minicolumn” posta in un “Collection Tube” e centrifugare a 13000rpm per 15 secondi, e buttare l’eluato;
- ❖ aggiungere 200µL di “Endotoxin Removed Wash (ERB)” alla colonna e centrifugare a 13000rpm per 15 secondi;
- ❖ aggiungere 400µL di “Column Wash Solution (CWS)” alla colonna e centrifugare a 13000rpm per 30 secondi;
- ❖ trasferire la colonna in una eppendorf da 1,5mL;
- ❖ aggiungere 30µL di “H₂O nuclease-free” o “Elution Buffer” e si aspetta 1 minuto a temperatura ambiente;
- ❖ centrifugare a 13000rpm per 15 secondi;
- ❖ il DNA plasmidico è stato dosato mediante lo spettrofotometro “Multiskan Go” della Thermo Scientific, utilizzando 2µL, e facendo letture a 260nm, inoltre, per determinare il grado di purezza sono state effettuate letture anche a 230 e 280nm;
- ❖ infine, conservare a -20°C.

2) Digestione con un enzima di restrizione

Una volta estratto il DNA plasmidico dalle cellule batteriche trasformate (che erano cresciute su ampicillina), bisogna determinare se il vettore pDrive (vedere in foto la mappa di restrizione) è ricombinante (contiene un inserto) oppure no. Il colore della colonia batterica (bianco o blu) è già un indizio; tuttavia, la presenza dell’inserto nel vettore estratto dalle colonie batteriche bianche deve essere verificata. Per fare ciò è necessario effettuare la digestione con un enzima di restrizione che consenta di “ritagliare” (ossia excidere) l’inserto dal vettore. Il vettore e l’inserto di dna genomico (da inserire nel vettore) sono stati linearizzati con EcoRI al fine di reagire fra di loro, e, per essere nuovamente tagliati e separati devono essere excisi sempre con EcoRI, se si utilizzasse una digestione con BamHI in questo caso non si avrebbe l’excisione dell’inserto. Nel nostro caso, siccome il plasmide è stato tagliato in un sito che lascia delle estremità coesive di Timina, mentre, al frammento da clonare sono state aggiunte delle estremità coesive di Adenina, il legame tra il plasmide e il DNA da clonare è stato fatto dall’enzima topoisomerasi, si parla di Clonaggio di TA (vedere immagine).



Mappa di Restrizione del vettore pDrive



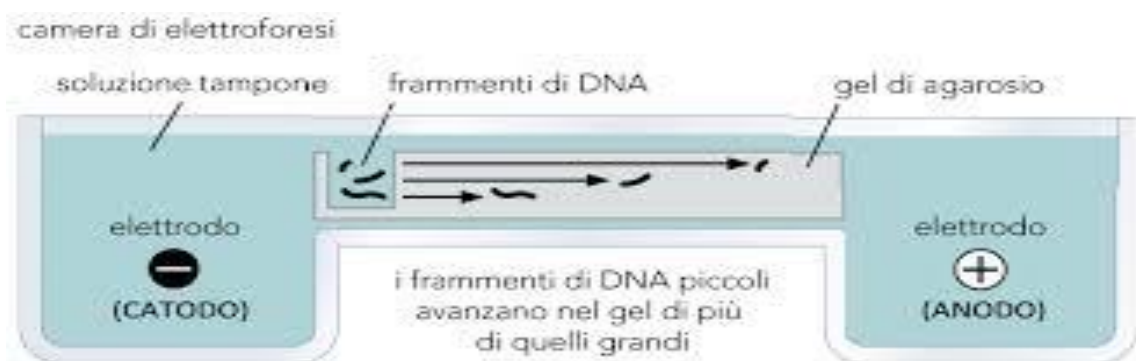
Esempio di Clonaggio TA

Procedimento:

- ❖ prelevare tanti μL di miniprep corrispondente a 100ng di dna plasmidico;
- ❖ aggiungere 2 μL di tampone per EcoRI (NeBuffer 2) 10x;
- ❖ aggiungere 3 μL di enzima EcoRI (0,2 unità/ μL);
- ❖ aggiungere tanti μL di acqua distillata sterile per portare la mix ad un volume finale di 20 μL ;
- ❖ miscelare la mix ed incubarla per 120 minuti a 37°C.

3) Elettroforesi del DNA

L'elettroforesi del DNA plasmidico ha lo scopo di verificare se si tratta di un plasmide ricombinante oppure no, nel caso di un plasmide ricombinante, si può determinare il peso molecolare dell'inserto, dopo digestione con l'enzima di restrizione. L'elettroforesi è una tecnica separativa che si basa sul movimento di molecole elettricamente cariche, immerse in un opportuno gel e tampone, quando sono sottoposte ad un campo elettrico generato mediante una coppia di elettrodi attraverso un alimentatore di corrente. Nel caso specifico, le molecole di DNA plasmidico, essendo cariche negativamente (per la presenza di gruppi fosfato), migreranno verso l'anodo (+); inoltre, il movimento delle molecole sarà inversamente proporzionale alle loro dimensioni, molecole più piccole di dna migreranno più velocemente e viceversa (vedere foto). L'agarosio è un polimero lineare composto da due unità base: il D-galattosio e il 3,6-anidro-L-galattosio, uniti fra loro mediante legami glicosidici. In base alla quantità di tale polimero disciolta in un adeguato tampone si determinano le dimensioni dei pori all'interno dei quali migreranno le varie molecole. Il movimento delle molecole sarà possibile sia perché si applica un voltaggio fra i due elettrodi all'interno della cella elettroforetica all'interno della quale viene messo il gel, sia perché la cella elettroforetica contiene lo stesso tampone che serve per la preparazione del gel.



Elettroforesi del dna

3.1) Preparazione del gel di agarosio

La concentrazione di agarosio del gel viene scelta in base alle dimensioni e alla struttura (lineare o circolare) delle molecole di dna da separare. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra le 3500 e 4500 bp (base pairs, coppie di basi), si utilizza un gel di agarosio all'1%.

Preparazione del gel:

- ❖ preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di “nastro adesivo di carta”;
- ❖ misurare 100 ml di tampone TAE 1X ((Tris 40mM, Acido Acetico 0.12% (v/v), EDTA 1mM, pH: 8.0) in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 1gr di agarosio;
- ❖ sciogliere l'agarosio su una piastra riscaldante a 100°C per circa 5 minuti, il tutto opportunamente sotto agitazione per consentire la solubilizzazione dell'agarosio e coprendo la beuta con un pezzetto di stagnola, per evitare l'evaporazione;
- ❖ agitare delicatamente la soluzione con una presina, facendo attenzione a non scottarsi;
- ❖ far raffreddare la soluzione di agarosio e aggiungere 5µL di Gel Red Nucleic Acid Stain 10,000X (Biotium) (un colorante fluorescente del DNA in grado di intercalarsi negli acidi nucleici e renderli visibili al transilluminatore);
- ❖ quindi versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine. I pozzetti si formano quando, una volta solidificato il gel, viene tolto il pettine;
- ❖ lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 20 minuti (quando è solidificato, il gel diventa opaco);
- ❖ togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella elettroforetica e versare il tampone TAE 1X nella camera di corsa, fino a coprire completamente il gel;
- ❖ infine, togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolari rispetto al gel.

3.2) Corsa elettroforetica

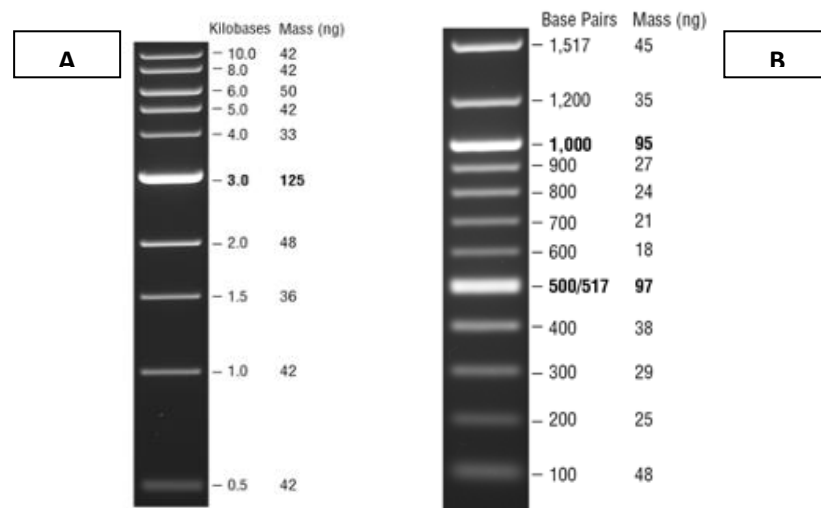
I campioni per la corsa elettroforetica sono stati preparati nel seguente modo:

- ❖ scrivere su ciascuna eppendorf con un pennarello il tipo di campione che vi verrà trasferito:
PM = marcatore di paia di basi lineare, 1Kbp DNA Ladder (BioLabs) e 100bp DNA Ladder (BioLabs)
pDrive tagliato con EcoRI = vettore wild type di controllo
pDrive + inserto, tagliato con EcoRI = vettore trasformato
- ❖ nelle provette corrispondenti a pDrive con e senza inserto aggiungere i 20µL del campione di dna (ovvero tutto il volume della reazione di digestione con l'enzima di restrizione EcoRI) e aggiungere 4µL di Loading dye (Glicerolo 60%, Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM, EDTA 60 mM, Blu di bromofenolo 0.03%, Xilene cianolo 0.03%) 6x e risospendere, evitando di formare bolle (il glicerolo presente nel loading dye serve per rendere più densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e quindi a facilitarne l'entrata nel pozzetto, se si formano bolle, centrifugare brevemente in una centrifuga, in gergo di laboratorio, si dice “spinnare”), mentre, nella provetta

corrispondente al marcatore di pesi molecolare aggiungere 1 μ L del Marker 1Kbp DNA Ladder (BioLabs), 9 μ L di acqua sterile e 2 μ L di Loading Dye 6X;

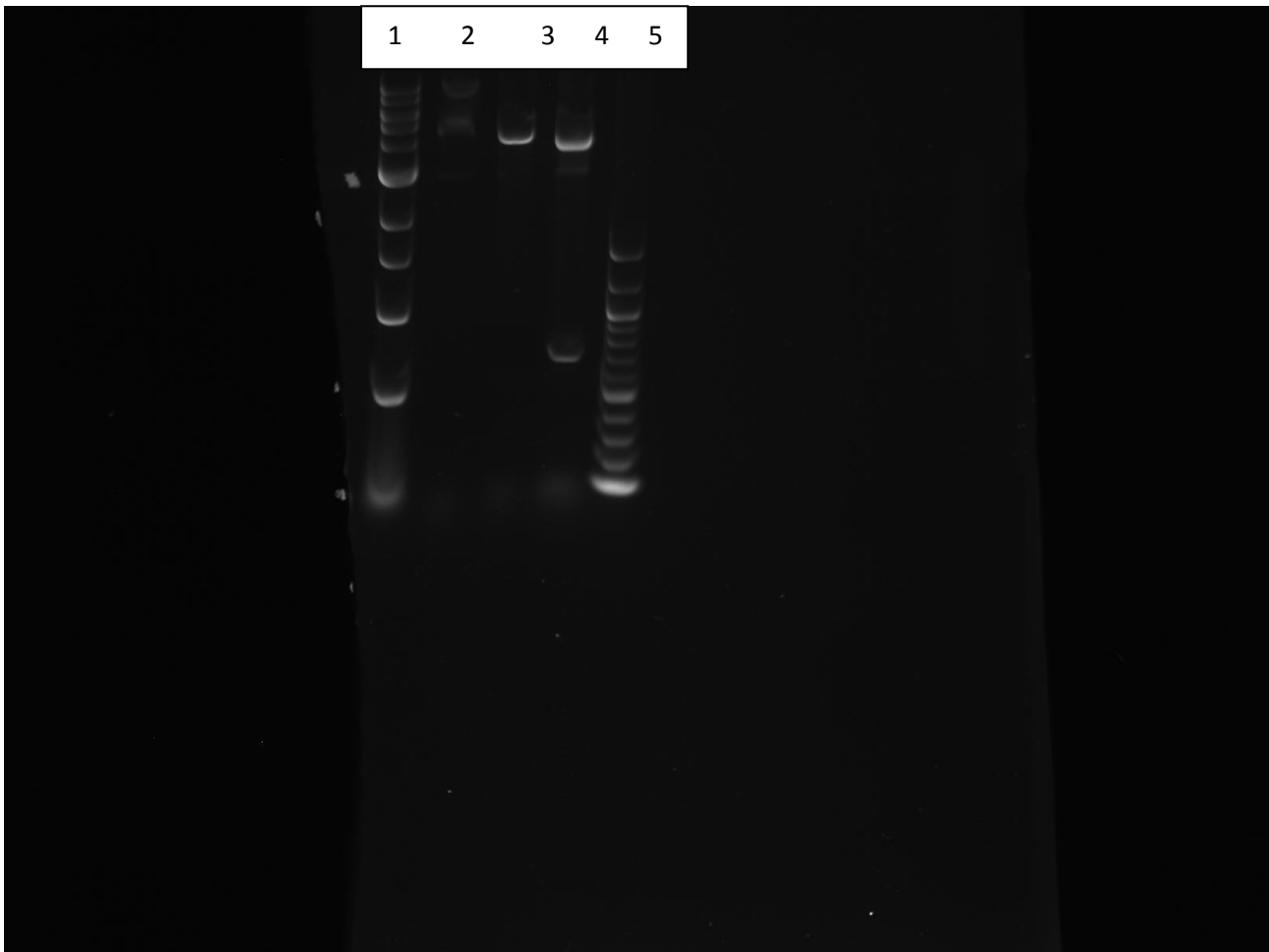
- ❖ posizionare la vaschetta per l'elettroforesi su un foglio nero, perchè sia più facile individuare i pozzetti e caricare lentamente ciascun campione (24 μ L o 12 μ L nel caso del marcatore di pesi molecolare) nei singoli pozzetti, ponendosi con la punta della pipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolare rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto;
- ❖ chiudere il coperchio della cella elettroforetica e collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli dell'alimentatore (il dna essendo carico negativamente migrerà verso il polo positivo);
- ❖ fissare il voltaggio al valore costante di 90V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 40 minuti (osservare la migrazione del loading dye per valutare la migrazione del DNA, che, essendo incolore, non si può vedere, il blu di bromofenolo, contenuto nel loading dye, migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300bp);
- ❖ fermare la corsa elettroforetica quando il blu di bromofenolo si trova a circa 1-2 cm dalla fine del gel, in modo da evitare che il DNA esca dal gel stesso;
- ❖ osservare il gel al transilluminatore e il risultato può essere documentato riprendendo il gel con una telecamera collegata ad un computer;

Inoltre, il tampone da elettroforesi TAE 1X può essere riutilizzato diverse volte, perciò si recupera il tampone usato e lo si versa in una bottiglia con un imbuto, si puliscono tutte le apparecchiature usate ed il banco di lavoro con acqua ed etanolo denaturato, infine, dopo aver finito di lavorare, lavarsi le mani.



Marcatori di paia di basi: A) 1Kbp DNA Ladder (BioLabs), B) 100bp DNA Ladder (BioLabs)

3.3) Risultati ed interpretazione



Descrizione dettagliata del gel:

1. Nel primo pozzetto c'è il marcatore di paia di basi lineare, 1Kbp DNA Ladder (BioLabs): una serie di frammenti di DNA di dimensioni note.
2. Nel secondo pozzetto c'è il vettore pDrive non digerito;
3. Nel terzo pozzetto c'è il vettore pDrive tagliato con EcoRI, vettore non ricombinante;
4. Nel quarto pozzetto c'è il vettore pDrive + inserto tagliato con EcoRI, vettore ricombinante, si evidenziano due bande, di cui la più piccola corrispondente all'inserto e quella più alta corrispondente al vettore;
5. Nel quinto pozzetto c'è il marcatore di paia di basi lineare, 100bp DNA Ladder (BioLabs): una serie di frammenti di DNA più piccoli rispetto al precedente.

Siti WEB utili

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

VERIFICA DELLE CONOSCENZE ACQUISITE DAGLI STUDENTI IN QUANTO A TRASFORMAZIONE BATTERICA ED ELETTROFORESI

http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/intro.html

OPERONE LAC

http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/lacoperon/intro.html

<http://vcell.ndsu.nodak.edu/animations/lacOperon/movie-flash.htm>