

Supercolla

I molluschi bivalvi del genere *Mytilus* PRODUCONO una supercolla impermeabile.

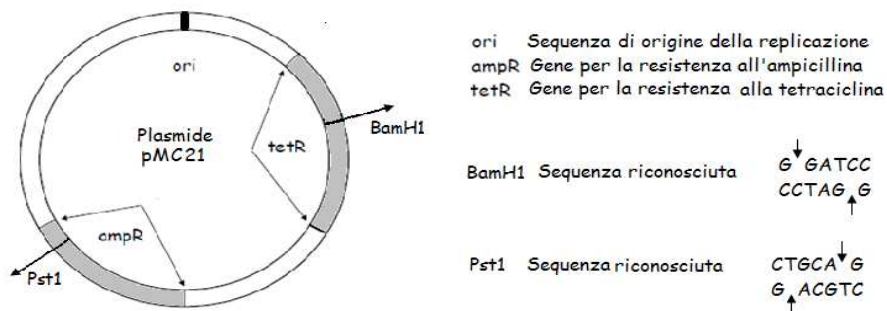
Come riescono ad aderire così bene ad una superficie solida in ambiente acquoso? Si fissano tramite il bisso, costituito da un fascio di filamenti secreti in forma semifluida da una ghiandola presente nel piede. Tali filamenti, a contatto con l'acqua, coagulano immediatamente formando una struttura con elevate capacità di adesione

Tuttavia gli scienziati non pensano di usare i molluschi bivalvi per produrre una supercolla. Ce ne vorrebbero almeno 10.000 per fare appena un grammo di colla. Quindi raccogliere una quantità di molluschi sufficiente a soddisfare la domanda mondiale di supercolla significherebbe distruggere la popolazione dei molluschi bivalvi, di cui molte specie sono già in pericolo. Piuttosto, alcuni ricercatori americani hanno isolato dai mitili il frammento di DNA contenente i geni necessari per la sintesi della molecola con proprietà adesive

Sei diventato un ricercatore, ti è stato richiesto di clonare tale frammento su un vettore plasmidico per produrre grandi quantità di supercolla.

Hai a disposizione:

a) il DNA del plasmide pMC21 (in quantità più che sufficiente)



b) gli enzimi di restrizione BamHI e PstI

c) il DNA del frammento contenente il gene che codifica per la supercolla (in quantità più che sufficiente). Nella figura sono mostrate le sequenze fiancheggianti tale frammento

```

ggatc caaaaatctc _____ cgcgattaggatcc
cctag gtttttagag _____ gcgctaatacctagg
  
```

d) un ceppo di *Escherichia coli* sensibile agli antibiotici ampicillina e tetraciclina

e) l'enzima ligasi

f) terreno di coltura liquido

g) Piastre contenenti i seguenti terreni di coltura solidi

- Agar nutritivo
- Agar nutritivo contenente l'antibiotico ampicillina
- Agar nutritivo contenente l'antibiotico tetraciclina
- Agar nutritivo contenente sia ampicillina che tetraciclina

1. Spiega in sequenza, utilizzando la modalità grafica che ritieni più efficace, le tappe che seguiresti per clonare il gene della supercolla.
2. Motiva la scelta del terreno di coltura solido utilizzato per selezionare le colonie di *E. coli* contenenti il plasmide e successivamente la scelta del terreno di coltura solido per verificare se le colonie ottenute nel precedente terreno contengono il plasmide ricombinante.

Proposta di soluzione

1.

a. Digestione con enzimi di restrizione

Il plasmide in esame contiene una origine della replicazione del plasmide (*ori*) e due geni che codificano per la resistenza a due diversi antibiotici, ampicillina (Ap) e tetraciclina (Tc). Tali geni di resistenza presentano dei siti "unici" (non presenti in altre regioni del plasmide) che possono essere riconosciuti dagli enzimi di restrizione PstI o BamHI ed quindi essere utilizzati come siti di clonaggio per inserire un frammento di DNA. Per la preparazione del plasmide e del frammento da clonare occorre utilizzare l'enzima di restrizione BamHI perché taglia nelle sequenze che fiancheggiano il gene per la supercolla, indicate qui sotto:

5' - g / gatccaaaaatctc _____ cgcgattag / gatcc - 3'
3'- cctag / gtttttagag _____ gcgctaatacctag / g - 5'

E' necessario usare lo stesso enzima di restrizione sia per il plasmide che per il frammento da clonare in modo da generare estremità coesive analoghe su entrambi i DNA (plasmide ed inserto).

Si può inoltre notare che l'utilizzo di BamHI fa sì che l'inserimento del gene della supercolla nel sito di clonaggio interrompa il gene per la resistenza alla tetraciclina.

Non è possibile usare PstI perchè, pur generando estremità coesive, non è in grado di riconoscere e tagliare le sequenze fiancheggianti il gene che codifica per la supercolla.

b. Inserimento del frammento nel plasmide

La tappa successiva è la ligazione, che consiste nel processo di saldatura delle estremità coesive presenti sia sulle molecole di plasmide linearizzato con l' enzima BamHI sia sui frammenti di DNA da clonare trattati con lo stesso enzima. Tale saldatura che darà origine ad un plasmide ricombinante (un plasmide contenente il gene che codifica per la supercolla) si attua in presenza dell'enzima DNA ligasi il quale catalizza il legame covalente fosfodiesterico tra le due molecole di DNA in esame. Occorre sottolineare che può anche avvenire una saldatura tra le estremità coesive presenti sul plasmide linearizzato in tal caso si forma un plasmide circolare identico a quello originario

c. Trasformazione

A questo punto per introdurre il DNA plasmidico in cellule di *Escherichia coli* è necessario ricorrere alla Trasformazione ovvero aggiungere il DNA della miscela di ligazione alle cellule batteriche. É opportuno eseguire anche un controllo "negativo" della trasformazione costituito da cellule di *E coli* alle quali non si aggiunge DNA.

LO STUDENTE NON È TENUTO A CONOSCERE I PARTICOLARI TECNICI DELLA TRASFORMAZIONE DESCRITTI NELLA PARTE SOTTOSTANTE

Poiché *Escherichia coli* non è naturalmente trasformabile occorre rendere tali cellule competenti per l'ingresso di DNA tramite trattamenti chimico fisici. Una volta effettuata la trasformazione, prima di

procedere al piastramento su terreno solido occorre aggiungere (sia alla miscela di trasformazione che al controllo senza DNA) brodo nutritivo ed incubare per breve tempo alla temperatura ottimale per *Escherichia coli* (questa operazione è necessaria per rivitalizzare i batteri.)

2.

a. Piastramento della trasformazione e del controllo su terreno solido

Quando si effettua un esperimento di trasformazione, solo una piccola percentuale di batteri viene trasformata (circa 1 su un 10 milioni di cellule di *E. coli*); occorre quindi utilizzare terreni di coltura in grado di selezionare le cellule batteriche trasformate dal plasmide. Solo le molecole di plasmide a struttura circolare, siano esse ricombinanti (contenenti il frammento di DNA inserito nel plasmide), o non ricombinanti (senza inserto), saranno in grado di dare luogo alla formazione di colonie di *Escherichia coli*, capaci di crescere nel terreno selettivo contenente un opportuno antibiotico. Poichè nel plasmide ricombinante il gene per la resistenza alla tetraciclina è interrotto dal gene che vogliamo clonare, occorre piastrare su terreno solido contenente **ampicillina**. Se si mette la tetraciclina impediamo la crescita di colonie che contengono il plasmide ricombinante. Anche il controllo va piastrato su ampicillina: se l'esperimento è stato condotto correttamente non si osserva la presenza di colonie dal momento che il ceppo di *E. coli* utilizzato è sensibile all'ampicillina.

b. Analisi dei trasformanti per identificare i cloni ricombinanti

Le colonie resistenti all'ampicillina possono contenere il plasmide originario che si è riciclarizzato oppure il plasmide ricombinante contenente l'inserto. Per sapere quali colonie presentano il plasmide ricombinante occorre trasferire (in modo ordinato ovvero nella stessa posizione sulle 2 piastre) le singole colonie ampicillina resistenti, ottenute dalla trasformazione, su una piastra di terreno solido contenente ampicillina e su una piastra di terreno solido contenente tetraciclina. Le colonie che crescono su terreno con ampicillina, ma non sono in grado di crescere in presenza di tetraciclina posseggono il plasmide ricombinante