



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE E TRASLAZIONALE

## VALIGIA DEL RICERCATORE

### TRASFORMAZIONE BATTERICA CON PLASMIDE pGLO

#### TRASFORMAZIONE BATTERICA

La modificazione genetica è cruciale nello sviluppo delle moderne Biotecnologie con **applicazioni** in ambito agricolo, medico, farmacologico, industriale ecc. Un esempio applicativo fra i più noti riguarda la produzione di insulina ricombinante necessaria per la cura del diabete. L'insulina, ormone che regola la quantità di glucosio presente nel sangue, è stata una delle prime proteine prodotte utilizzando batteri al cui patrimonio genetico è stato "aggiunto" un gene umano. Una volta che i batteri portano l'informazione genetica si comportano poi come vere e proprie "**fabbriche**" di proteine.

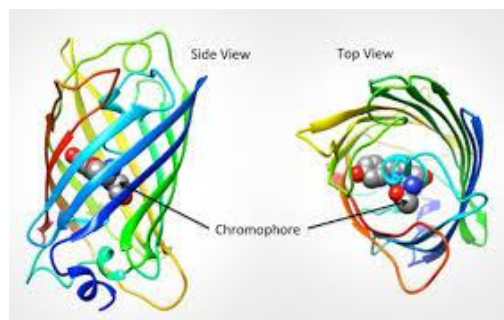
La trasformazione batterica è uno dei processi attraverso i quali i batteri possono acquisire materiale genetico estraneo direttamente dall'ambiente extracellulare. In natura tale fenomeno permette ad alcune specie di batteri di acquisire geni che portano loro un vantaggio nell'adattamento all'ambiente (adattamento evolutivo). La trasformazione fu descritta per la prima volta nel 1928 dal microbiologo britannico Fred Griffith ma solo a metà degli anni '70, con la nascita della Biologia molecolare e dell'ingegneria genetica, tale proprietà è stata sfruttata per introdurre nei batteri piccole sequenze di DNA chiamate plasmidi contenenti un gene estraneo d'interesse. Il gene d'interesse può essere ottenuto da DNA umano, animale, vegetale e, dopo che è stato posto all'interno del plasmide, può essere trasferito ai batteri attraverso la metodica di trasformazione batterica. L'organismo ospite (il batterio) acquisisce quindi del materiale genetico che

contiene l'informazione per la produzione di una proteina di nostro interesse e, nelle giuste condizioni, una volta acquisito il plasmide sarà in grado di produrre la proteina (proteina ricombinante).

Nel corso dell'attività di questo laboratorio didattico gli studenti modificheranno geneticamente dei batteri trasformandoli con un gene che codifica per una proteina fluorescente e valuteranno l'effettiva produzione della proteina ricombinante monitorando la presenza di fluorescenza all'interno del batterio.

## **IL SISTEMA pGLO**

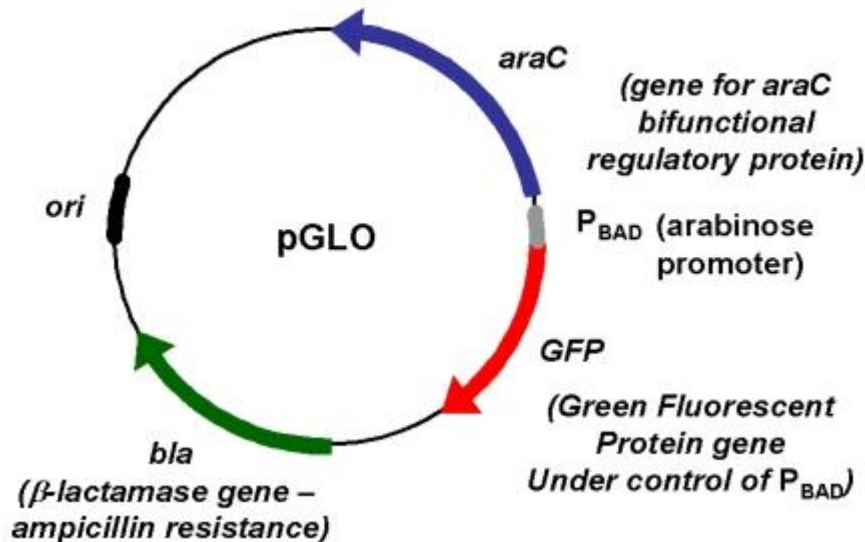
La proteina ricombinante di nostro interesse è chiamata **GFP (Green Fluorescent Protein)** la cui fonte naturale è la medusa Bioluminescente *Aequorea Victoria*. La scoperta di questa proteina che brilla di una luce verde intensa quando è esposta a raggi ultravioletti, l'isolamento del gene e la sua produzione in laboratorio, così come la dimostrazione della sua utilizzabilità come tracciante luminoso di numerosi fenomeni biologici, ha valso ai suoi scopritori il premio **Nobel per la chimica** nel 2008.



Per poter introdurre la GFP nei batteri è necessario l'utilizzo di un piccolo DNA circolare chiamato **Plasmide**. I batteri in aggiunta al loro DNA cromosomico di grandi dimensioni possono contenere anche dei piccoli DNA circolari chiamati appunto plasmidi che si comportano come dei piccoli cromosomi accessori in grado di duplicare in maniera indipendente dal genoma del batterio che li ospita. In natura il plasmide normalmente contiene uno o pochi geni che conferiscono vantaggi per la loro sopravvivenza (come ad esempio geni che permettono la resistenza del batterio agli antibiotici) e sono facilmente trasmissibili ad altri batteri. Anche in questo caso i ricercatori hanno sfruttato i plasmidi presenti in natura e li hanno manipolati per sviluppare dei plasmidi innocui in grado di accettare geni estranei utili per raggiungere diversi obiettivi nel campo delle biotecnologie (plasmidi ricombinanti).

## PLASMIDE pGLO

Il plasmide ricombinante pGLO che utilizzeremo nel corso della nostra attività è rappresentato nella mappa sottostante:



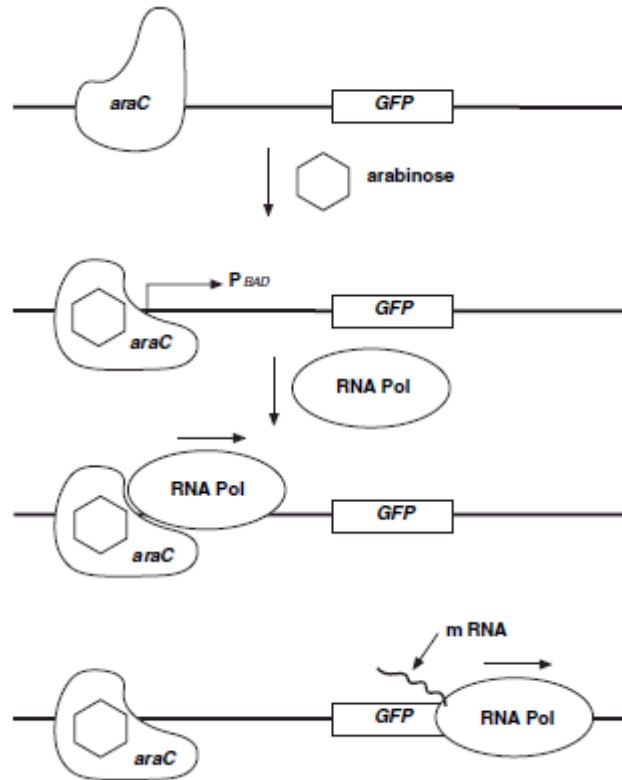
pGLO è costituito da 5400 nucleotidi e contiene sostanzialmente quattro porzioni di DNA significative:

- La sequenza del **gene GFP** di Aequorea Victoria
- La sequenza **ORI**: origine di replicazione, necessaria per avviare la duplicazione autonoma del plasmide all'interno della cellula ospite
- La sequenza del **gene β-lattamase** che codifica per una proteina che conferisce resistenza all'antibiotico Ampicillina
- Le regioni di **regolazione dell'espressione** genica: araC e P<sub>BAD</sub>

## SELEZIONE ANTIBIOTICA DEI BATTERI TRASFORMATI CON pGLO

La trasformazione batterica è in realtà un processo a **bassissima efficienza** e solamente una piccola percentuale dei batteri trattati sono in grado di captare al loro interno il plasmide. Si rende quindi necessario un meccanismo di **selezione** dei batteri che hanno efficacemente incorporato il plasmide d'interesse, nel nostro caso pGLO. Tutti i plasmidi presentano infatti nella loro sequenza un gene che conferisce la resistenza ad un antibiotico di selezione. Nel nostro caso si tratta del gene β-lattamase che conferisce resistenza all'antibiotico Ampicillina, in modo tale che quando questo antibiotico è presente nel terreno di coltura tutte le cellule batteriche che non hanno il plasmide pGLO al loro interno muoiono perché non in grado di sopravvivere in presenza di Ampicillina.

## REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEL PLASMIDE pGLO



L'espressione genica risulta accuratamente regolata in tutti gli organismi viventi per consentire l'adattamento a diverse condizioni ambientali ed impedire una inutile e dispendiosa sovrapproduzione di proteine non necessarie.

Ad esempio i geni coinvolti nel metabolismo cellulare sono finemente regolati in maniera tale che in assenza del metabolita da digerire gli enzimi coinvolti nella sua degradazione non vengano prodotti. Anche nel plasmide pGLO sono stati inseriti degli elementi di regolazione dell'espressione genica per consentire la produzione della proteina ricombinante solo al momento opportuno, ovvero quando viene aggiunto al terreno di coltura lo zucchero **arabinosio**. Questo sistema di regolazione, dipendente dall'arabinosio è costituito dalle due sequenze **araC** e **P<sub>BAD</sub>**. In particolare *araC* è una proteina che lega una specifica sequenza del DNA plasmidico (promotore P<sub>BAD</sub>) in prossimità del gene GFP impedendone la trascrizione da parte dell'enzima RNA polimerasi, fungendo quindi da repressore della trascrizione genica. Lo zucchero arabinosio, quando presente nel terreno di coltura, si lega alla proteina *araC* modificandone la forma. Il cambiamento di conformazione del complesso *araC*-arabinosio consente **all'RNA polimerasi** di iniziare la sua attività trascrizionale con produzione dell'RNA messaggero di GFP e conseguente produzione della proteina GFP.

Ne consegue che l'aggiunta di arabinosio al terreno di coltura è in grado di **"accendere" la produzione della proteina** da parte dei batteri contenenti il plasmide pGLO. In assenza di arabinosio i batteri non sono in grado di produrre GFP.

### **CEPPO BATTERICO UTILIZZATO NELLA TRASFORMAZIONE CON pGLO**

Verso la fine degli anni '70 l'utilizzo sempre più frequente dei batteri per le allora emergenti tecniche di genetica batterica hanno indotto i ricercatori ad identificare dei ceppi di **batteri efficaci** ma allo stesso tempo **sicuri per gli operatori**. Il ceppo batterico utilizzato nei laboratori per le tecniche sopra descritte è un ***Escherichia coli* HB101 K-12**. Si tratta di un ceppo batterico **NON patogenetico**, ovvero che non provoca alcuna malattia nell'uomo. E' inoltre caratterizzato dal fatto che la sua crescita è condizionata dalla presenza di terreni di coltura molto ricchi in nutrienti impedendogli di fatto di crescere quando si trova disperso nell'ambiente.

Per quanto riguarda la capacità dei batteri di acquisire DNA estraneo dall'ambiente, in realtà solo alcune specie batteriche sono in grado di farlo spontaneamente, mentre le altre specie vengono rese **"competenti"** artificialmente in laboratorio. Per fare ciò, bisogna permettere alle molecole di DNA di attraversare la membrana rendendola temporaneamente permeabile. Ciò si può fare mediante metodi chimici che utilizzano il CaCl<sub>2</sub> (Cloruro di Calcio) che si pensa funzioni attraverso il seguente meccanismo. La membrana esterna dei batteri ha una carica negativa dovuta alla presenza di lipopolissaccaridi esterni che tende a respingere molecole di DNA, anch'esse cariche negativamente. La presenza di ioni Ca<sup>2+</sup> in soluzione ha la funzione di mascherare le cariche negative e favorire l'ingresso del DNA all'interno della cellula batterica.

### **SICUREZZA E BUONE PRATICHE IN MICROBIOLOGIA**

Tutti i microrganismi devono essere trattati come **potenzialmente pericolosi**. Comunque il ceppo batterico utilizzato comporta un rischio minimo per la salute dell'operatore, se si adottano delle **buone pratiche di lavoro**. In particolare è importante:

- Utilizzare i **dispositivi di protezione individuale** (camici e guanti)
- **Non toccare parti del corpo non protette** con i guanti dopo aver manipolato i batteri
- Eliminare eventuali **rifiuti nei contenitori appositi**
- **Lavare le mani** al termine del lavoro
- Lavare con alcool denaturato la superficie di lavoro
- In laboratorio è **vietato bere, mangiare, fumare**

**LAVORO IN CONDIZIONI STERILI:** La manipolazione di batteri e le tecniche di Genetica Batterica necessitano di lavorare in condizioni di sterilità. Questo aspetto è di fondamentale importanza al fine di ottenere e **mantenere colture batteriche pure** e allo stesso tempo **rende più sicuro il lavoro dell'operatore**. Le colture batteriche si possono contaminare facilmente dal momento che i batteri sono ovunque: nell'aria, nella pelle negli oggetti ecc. Per ridurre al minimo questo problema tutto il materiale fornito è stato preventivamente sterilizzato e tale dovrà essere preservato. Lo studente dovrà **attenersi alle indicazioni** dei tutors per evitare di contaminare il proprio esperimento.

## PROTOCOLLO

### GIORNO 1

#### PREPARAZIONE DELLE PIASTRE PER LA CRESCITA DEI BATTERI

Reagenti e Materiale a disposizione:

- 3 bottiglie di vetro contenenti ciascuna 100 ml di LB agar sterile per autoclavatura e fatto solidificare all'interno della bottiglia
- Soluzione di Ampicillina 100 mg/ml (1000X) (da conservare a -20°C)
- Soluzione di Arabinosio 18% (150X) (da conservare a 4°C)
- Piastre Petri sterili da 6 cm di diametro

Protocollo

1. Siglare sul fondo della capsula 24 piastre (8 con la sigla LB, 8 con la sigla LB+amp, 8 con la sigla LB+amp+Ara) e disporle su un piano ben pulito
2. Sciogliere uno alla volta il contenuto delle bottiglie con l'utilizzo di un forno a microonde (svitare il tappo ma non del tutto in modo da consentire ai vapori di uscire ma senza aprire del tutto la bottiglia). Portare ad ebollizione seguendo le indicazioni sotto riportate:
3. Bottiglia 1: dopo aver completamente sciolto il terreno portandolo ad ebollizione, attendere **5 minuti** e poi colare il contenuto nelle piastre distribuendo un volume che occupi non più della metà della capsula in altezza. Il numero delle piastre può essere variabile in relazione al volume distribuito per ogni piastra (circa 8 piastre). Attenzione: prendere la bottiglia con un presina o della carta per non scottarsi. Dopo aver versato il terreno caldo mantenere il coperchio della piastra semi-aperto per consentire al vapore di uscire. Non appena le piastre saranno solidificate (circa 15 minuti) chiudere il coperchio, rovesciare la piastra in modo da mantenere l'agar verso l'alto, impilare le piastre, rimetterle nella busta di plastica e mantenerle ben chiuse fino al momento dell'utilizzo.
4. Bottiglia 2: dopo aver completamente sciolto il terreno portandolo ad ebollizione, attendere **18 minuti**, mescolando ogni tanto. Questo tempo di attesa consente di abbassare la temperatura del terreno prima dell'aggiunta dell'antibiotico per evitare che si degradi con il

calore. Aggiungere quindi 100  $\mu$ l di ampicillina 1000X, miscelare in maniera completa per distribuire l'antibiotico e quindi colare il contenuto nelle piastre seguendo la procedura come al punto 4.

5. Bottiglia 3: dopo aver completamente sciolto il terreno portandolo ad ebollizione, attendere **18 minuti**, mescolando ogni tanto. Questo tempo di attesa consente di abbassare la temperatura del terreno a circa 55-60°C prima dell'aggiunta dell'antibiotico e arabinosio per evitare che si degradino con il calore. Aggiungere quindi 100  $\mu$ l di ampicillina 1000X e 670  $\mu$ l di arabinosio 150X, miscelare in maniera completa e quindi colare il contenuto nelle piastre seguendo la procedura come al punto 4.

## GIORNO 2

### **TRASFORMAZIONE BATTERICA CON PLASMIDE pGLO**

Reagenti e Materiale a disposizione:

- Plasmide pGLO concentrato 30 ng/ $\mu$ l (conservare a -20°C)
- Batteri ceppo HB101 (batteri vivi cresciuti su piastre LB)
- Terreno liquido di crescita dei batteri (LB brodo) (conservare a 4°C)
- Piastre **LB** – Piastre **LB/Amp** – Piastre **LB/Amp/Ara** fatte al giorno 1
- Soluzione di Trasformazione (CaCl<sub>2</sub> 50 Mm pH 6.1)
- Provette "eppendorf" sterili
- Set di Micropipette e puntali
- Anse a T sterili confezionate singolarmente
- Contenitore in polistirolo con ghiaccio
- 

Protocollo

Togliere dal frigorifero il terreno LB brodo e tenere a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo

- 1- Mettere in uso 2 provette eppendorf, siglarle opportunamente (+pGLO e – pGLO) e metterle in ghiaccio
- 2- Aggiungere in ciascuna delle due provette eppendorf 250  $\mu$ l della soluzione di Trasformazione e raffreddare la soluzione in ghiaccio per 3-4 minuti.
- 3- Aggiungere in entrambe le eppendorf i batteri HB101 utilizzando un puntale sterile e raccogliendo una strisciata di batteri dalla piastra fornita. Entrare poi nella eppendorf stemperando il puntale in modo da scaricare i batteri nella eppendorf. Miscelare in modo da distribuire bene i batteri nella soluzione. Mantenere in ghiaccio.
- 4- In una delle due provette eppendorf (+pGLO) aggiungere 5  $\mu$ l della soluzione di plasmide PGLO fornita nel kit. Mantenere in ghiaccio
- 5- Miscelare delicatamente e tenere in ghiaccio per 10 minuti
- 6- Shock termico: scaldare i batteri per 50 secondi in bagno termostatico a 42 °C e poi rimettere immediatamente in ghiaccio per altri 2 minuti

- 7- Aggiungere 600 ul di LB brodo preriscaldato a temperatura ambiente. L'aggiunta del terreno di coltura alla miscela di trasformazione consente ai batteri di "recuperare" la loro vitalità
- 8- Mantene la miscela di trasformazione per 10 minuti a temperatura ambiente miscelando per inversione ogni tanto
- 9- Scaldare la miscela di trasformazione per 10 minuti a 37°C miscelando ogni tanto
- 10- Seminare 50 ul di ciascuna miscela sulle piastre LB/LBamp/LBamp.ara opportunamente siglate. Utilizzare un'ansa a T (cambiare per ogni campione) per distribuire la miscela in maniera omogenea su tutta la superficie della piastra.
- 11- Capovolgere le piastre, impilarle e metterle in un incubatore a 37°C per tutta la notte. N.B. non coprire o sigillare le piastre perché il passaggio di aria è fondamentale per la crescita dei batteri

Compilare la tabella sottostante in base al risultato atteso

Batteri seminati	Presenza colonie SI/NO	Fluorescenza SI/NO	Note
HB101 piastre LB			
HB101 piastre LB/AMP			
HB101 piastre LB/AMP/ARA			
HB101/pGLO piastre LB			
HB101/pGLO piastre LB/AMP			
HB101/pGLO piastre LB/AMP/ARA			

### GIORNO 3

Osservare le piastre di coltura batterica seminate il giorno precedente e compilare la tabella sottostante con il risultato ottenuto.

Batteri seminati	Presenza colonie SI/NO	Fluorescenza SI/NO	Note
HB101 piastre LB			
HB101 piastre LB/AMP			
HB101 piastre LB/AMP/ARA			
HB101/pGLO piastre LB			
HB101/pGLO piastre LB/AMP			
HB101/pGLO piastre LB/AMP/ARA			



Dopo aver compilato la colonna relativa alla presenza delle colonie posizionare le piastre sopra un transilluminatore a luce ultravioletta per valutare la fluorescenza delle colonie. Completare quindi la tabella con la parte relativa alla fluorescenza e le note. Confrontare se il risultato dell'esperimento coincide con quanto atteso (vedi tabella del giorno 1).