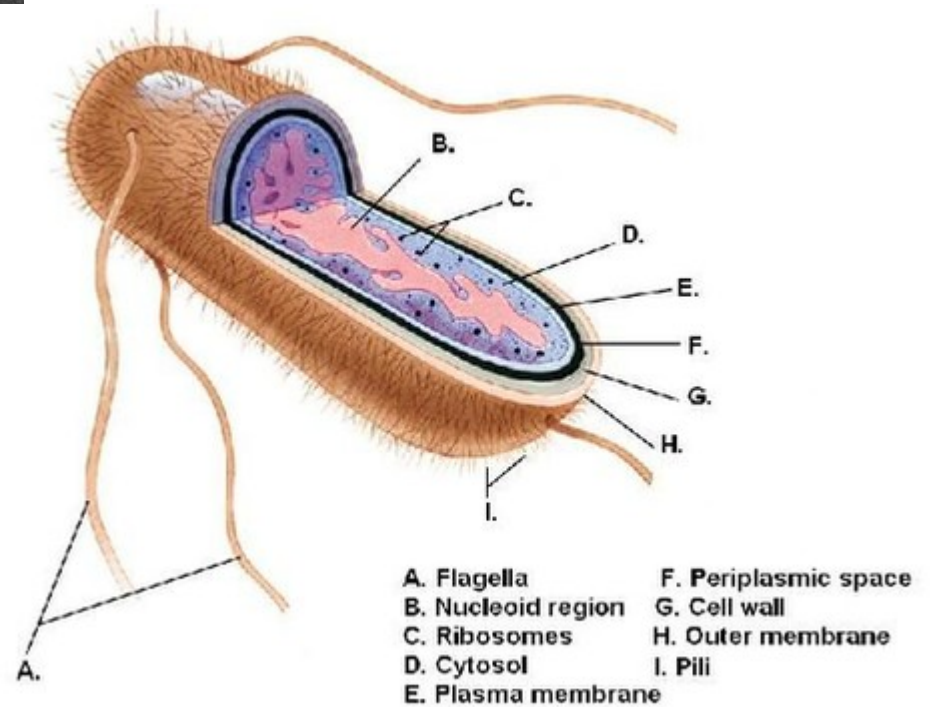
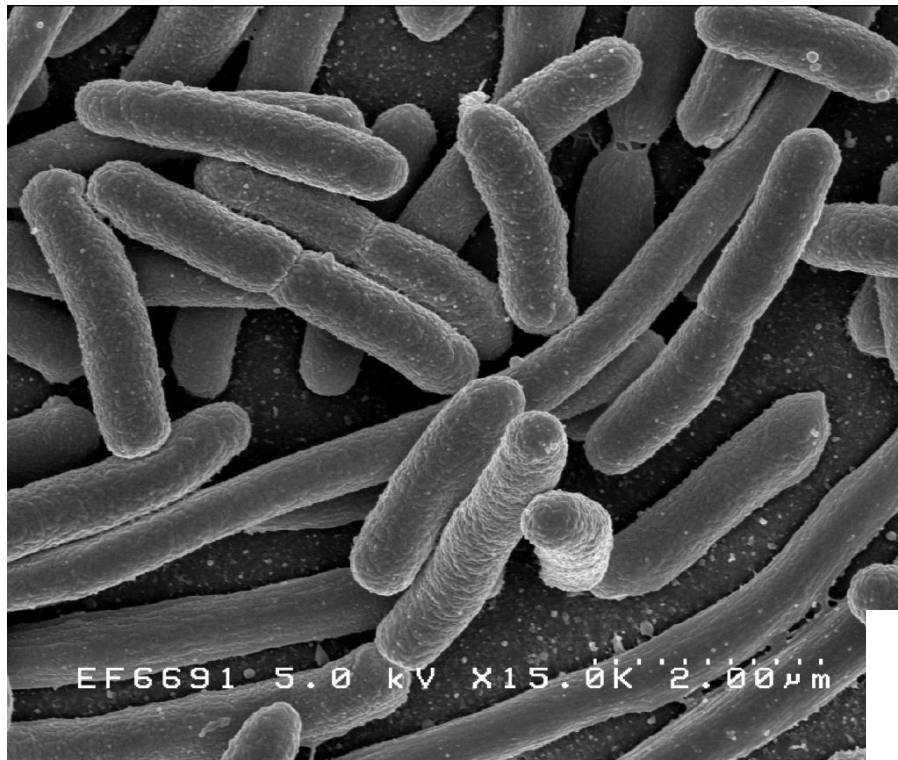


Colture Batteriche (*E. coli*)

Nei laboratori si usano comunemente vari ceppi (strains) selezionati e modificati di *Escherichia coli* (batterio gram negativo non patogeno) che, a seconda del genotipo (con mutazioni su particolari geni o introduzione di geni estranei), vengono utilizzati per diversi scopi. In generale si possono dividere in:

- **Ceppi di propagazione** (clonaggio e propagazione di plasmidi)
- **Ceppi di espressione** (espressione di proteine ricombinanti)



Terreni di coltura:

1) **liquidi** (crescita delle cellule, espressione di proteine ricombinanti, ecc.).

2) **solidi** (selezioni di cloni mediante isolamento di singole colonie, propagazione delle colonie o della linea cellulare).

Terreni di colture complessi (chimicamente non definiti)

I mezzi complessi impiegano estratti grezzi di sostanze come la caseina (proteina del latte), proteine animali, soia, estratti di lieviti, e altre sostanze altamente nutritive: benché chimicamente non definite. Queste sostanze sono commercialmente disponibili in polvere e possono essere pesate e aggiunte al mezzo di coltura. Tuttavia uno svantaggio importante dell'uso di mezzi complessi è la perdita del controllo sulla specificità dei nutrienti del mezzo.

•LB (Luria Bertani medium): 1% triptone, 0.5% estratto di lievito, 0.5% NaCl. (se le cellule contengono un plasmide con una resistenza, si aggiunge l'antibiotico opportuno per la selezione).

Utilizzati per la crescita di cellule e per l'espressione di proteine ricombinanti non modificate.

Terreni di colture minimi (chimicamente definiti)

I mezzi chimicamente definiti sono preparati aggiungendo all'acqua distillata quantità precise di sostanze chimiche organiche o inorganiche. Perciò, è nota la composizione chimica esatta di un mezzo definito. In molti casi, comunque, la conoscenza della composizione chimica esatta non è critica. In questi casi i mezzi non definiti possono essere sufficienti, o persino vantaggiosi.

M9 minimal medium

Na ₂ HPO ₄	6	gram (g)
KH ₂ PO ₄	3	gram (g)
NaCl	0.5	gram (g)
NH ₄ Cl	1	gram (g)
ddH ₂ O to	1	litre (l)
Total volume	1	litre (l)

Note: autoclave. Add 10 ml filter sterilized 100 mM MgSO₄, 20% glucose, 10 mM CaCl₂, 100 mM thiamine-HCl before use.

Opportunamente addizionati di particolari elementi, vengono utilizzati per la selezione di ceppi auxotrofi (incapaci di sintetizzare un particolare composto organico necessario per la propria crescita) o l'espressione di proteine ricombinanti modificate (arricchite in un particolare aminoacido modificato (es Seleniometionina) o con varianti isotopiche (¹³C o ¹⁵N)).

Agar plate

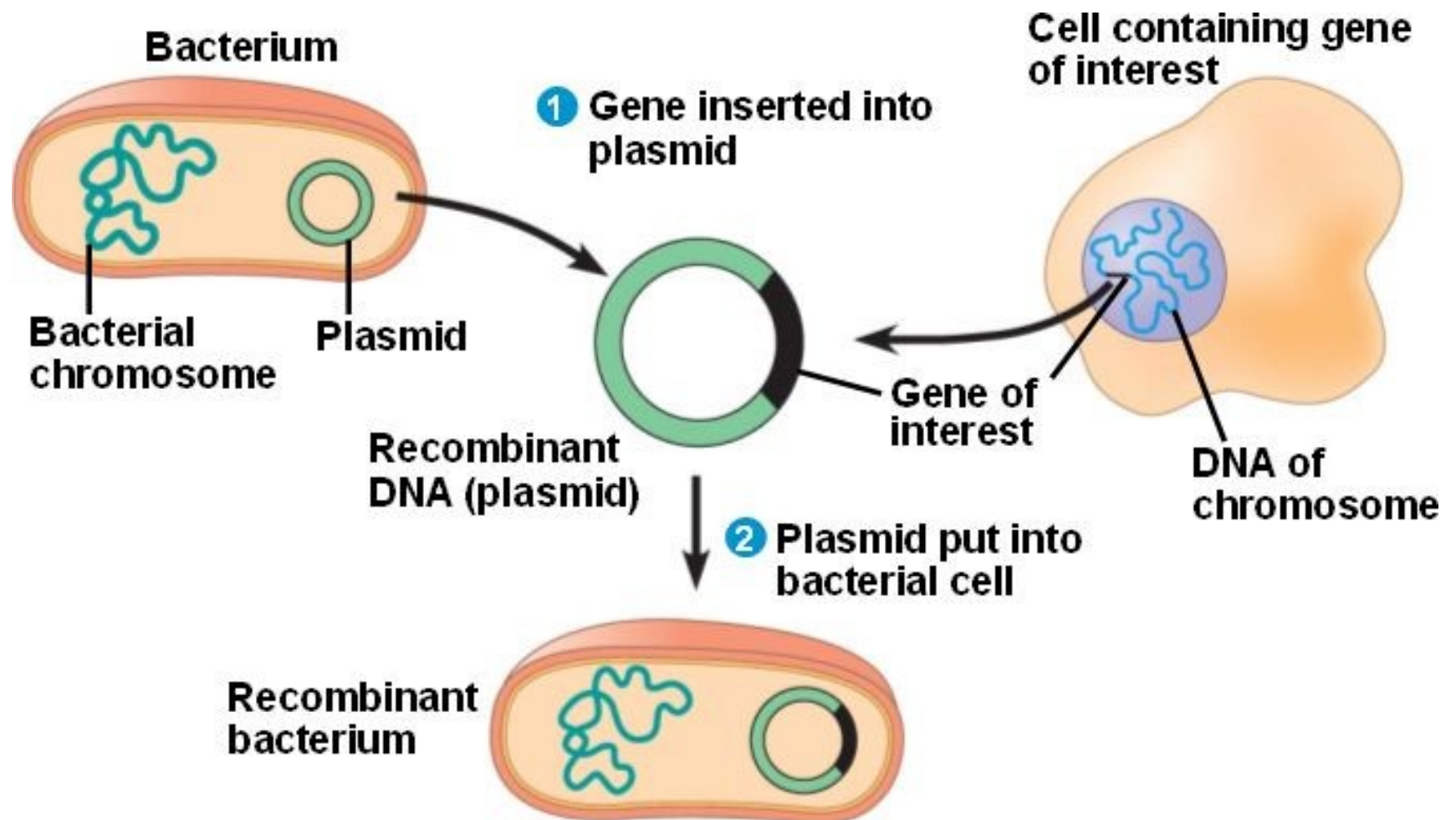
(mezzo di coltura solido)

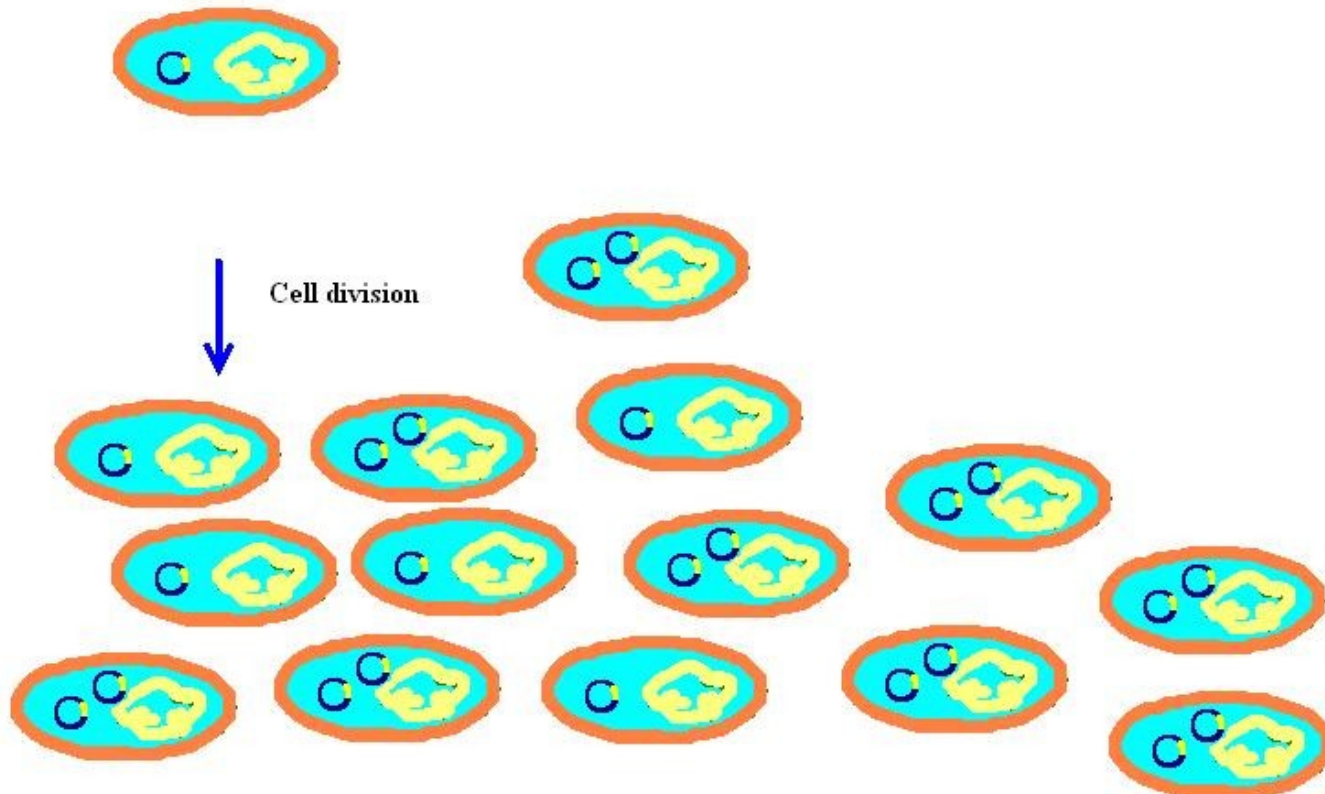
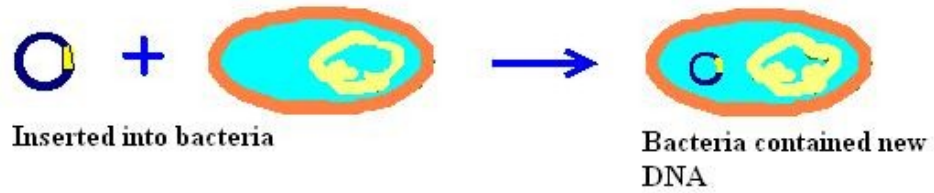
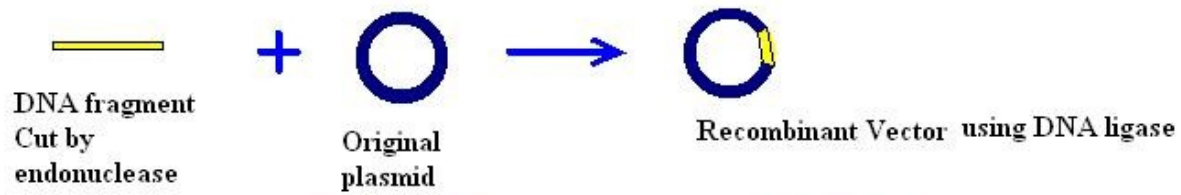
An **agar plate** is a sterile Petri dish that contains a growth medium (typically **agar plus nutrients**) used to culture microorganisms or small plants.

Selective growth compounds may also be added to the media, such as **antibiotics**.



Clonaggio di Geni





Strategia per il clonaggio di frammenti di DNA

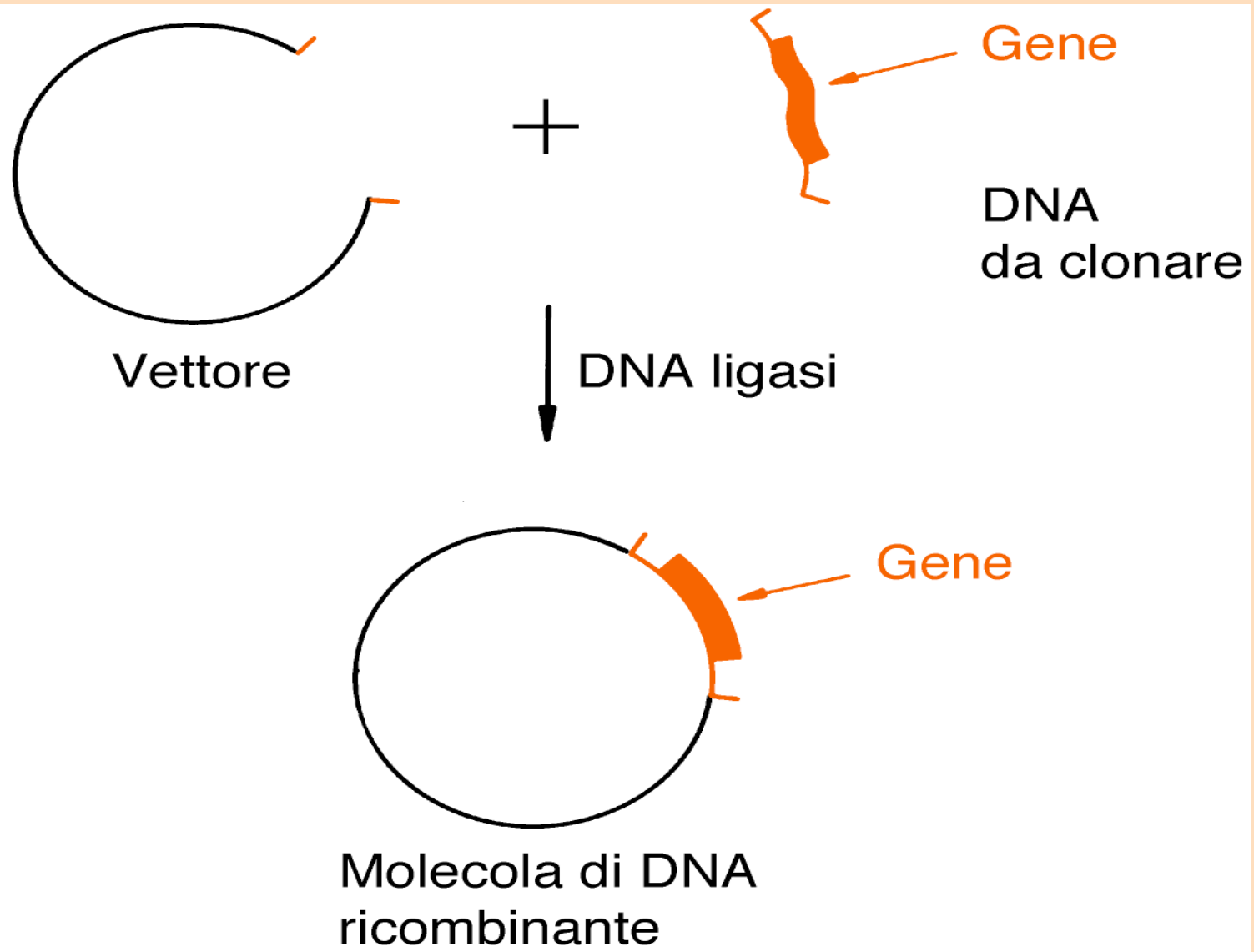
1) Digestione del frammento con endonucleasi di restrizione.

2) Digestione del vettore e defosforilazione.

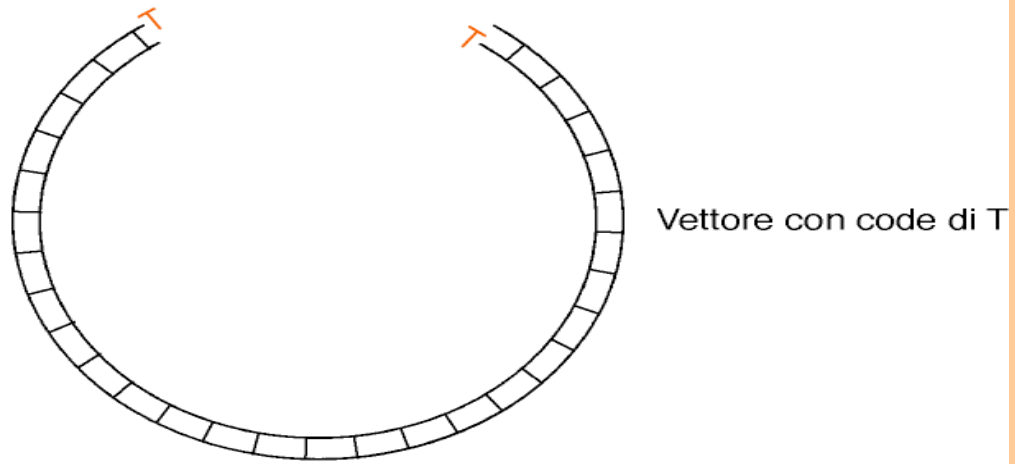
3) Ligazione.

4) Introduzione ed amplificazione del DNA ricombinante in una cellula ospite.

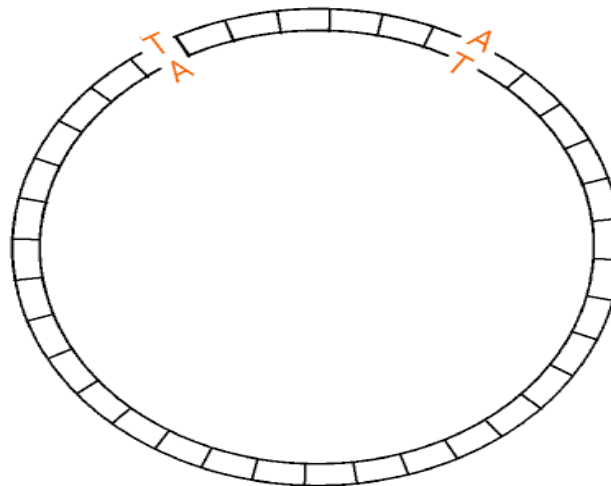
5) Analisi delle colonie.



A  A Prodotto della PCR



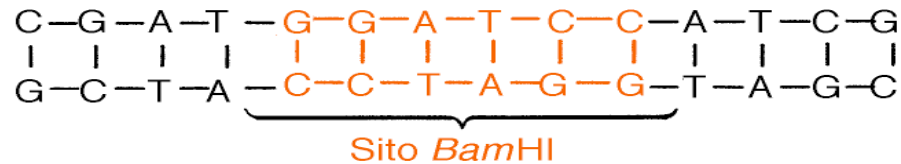
Legatura



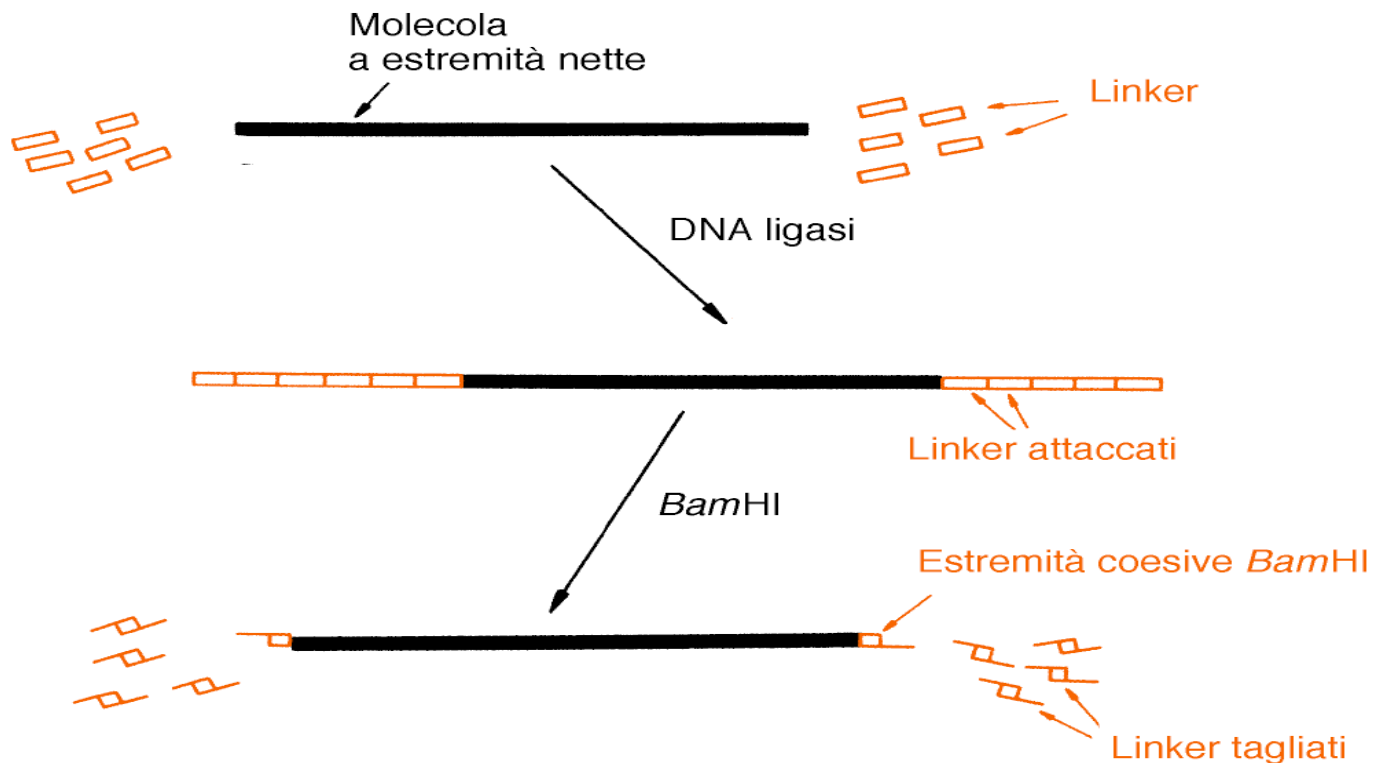
Come si inseriscono i siti di
restrizione alle estremità
dell'inserto da clonare?

Aggiunta di estremità coesive a frammenti “blunt ends”

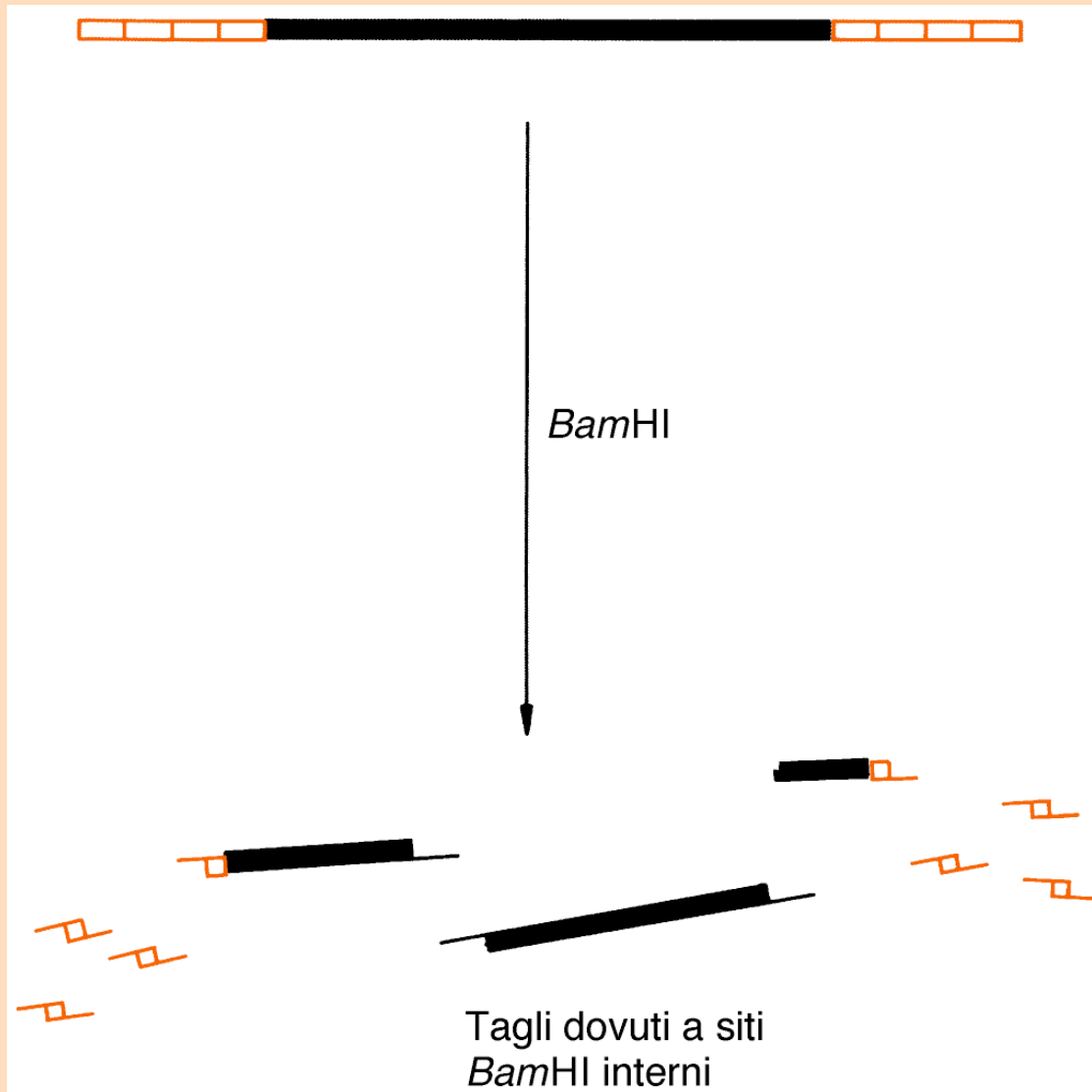
(a) Un tipico linker



(b) L'uso dei linker



Ma se il frammento contiene un sito BamHI I.....



Clonaggio dei prodotti di PCR

I siti di restrizione vengono introdotti con i primers

DNA stampo



Sequenza del primer

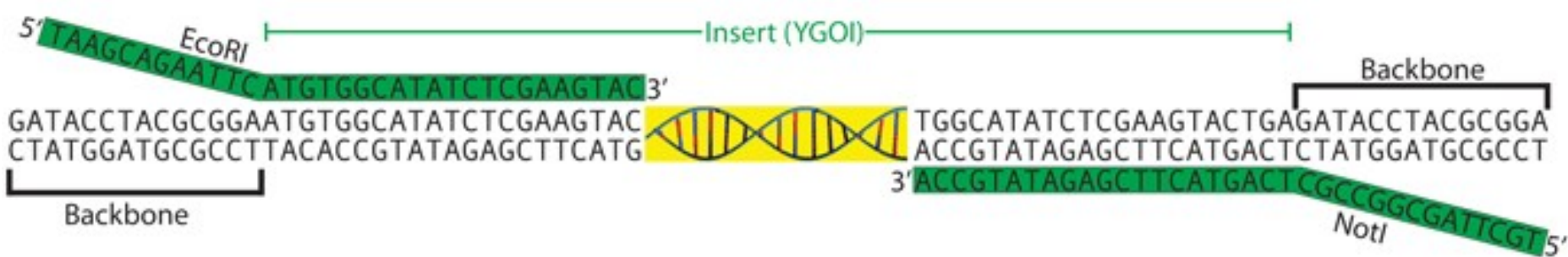


Prodotto della PCR



Restrizione con *Bam*HI





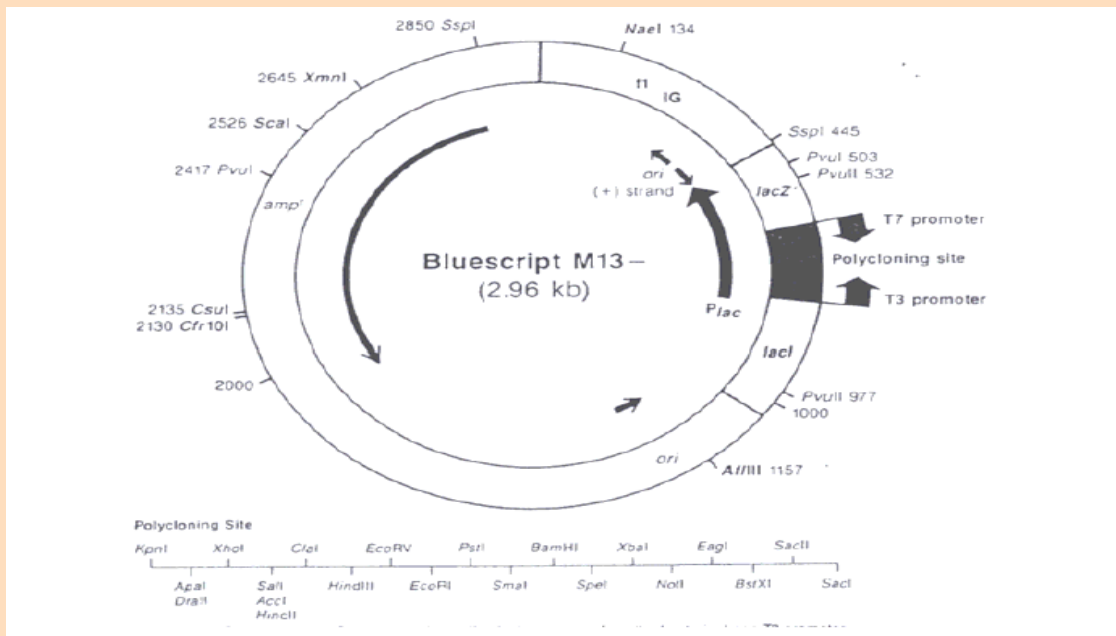
5' - ..GTGTCGCCCT TCGC TGAAGCAGGTG GAATTCTTGCATGCTAGCGGCCGCGGACATATGCA CACCTGCGATC GTAG TGCCCCAACT.. -3'
 3' - ..CACAGCGGGA AGCG ACTTCGTCCACCTTAAGAACGTACGATCGCCGGCGCCTGTATACGT GTGGACGCTAG CATC ACGGGGTGA.. -5'
 MCS AarI AarI attP

Forward Primer: NNNN CACCTGC NNNNTCGC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN AarI
 Reverse Primer: NNNN CACCTGC NNNN CTAC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN AarI

PCR Product: 5' - NNNN CACCTGC NNNN TCGC - Homology Arm 1 - GTAG NNNN GCAGGTG NNNN -3'
 3' - NNNN GTGGACG NNNN AGCG - Homology Arm 1 - CATC NNNN CGTCCAC NNNN -5'
 AarI

Digestione con enzimi di restrizione

- Scegliere enzimi di restrizione presenti come siti unici nel polylinker del vettore di destinazione e che non digeriscano anche il frammento di interesse.
- Utilizzando un singolo enzima per entrambe le estremità si otterranno costrutti in cui l'inserto sarà presente statisticamente nelle due orientazioni.
- Utilizzando due enzimi diversi l'inserto avrà una direzione obbligata > clonaggio direzionale.



**Esempio di un
vettore di
destinazione e
sequenza del
polylinker**

Defosforilazione del plasmide digerito

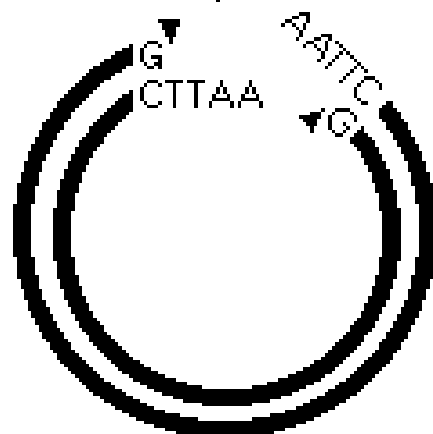
Trattando il plasmide digerito con una fosfatasi (es. CIP Calf Intestine Phosphatase) si rimuove il gruppo fosfato all'estremità 5' evitando che il plasmide possa richiudersi senza l'inserto dando origine a falsi positivi.



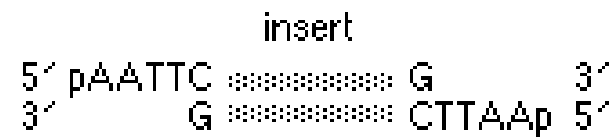
phosphatase



ligase



no recircularization

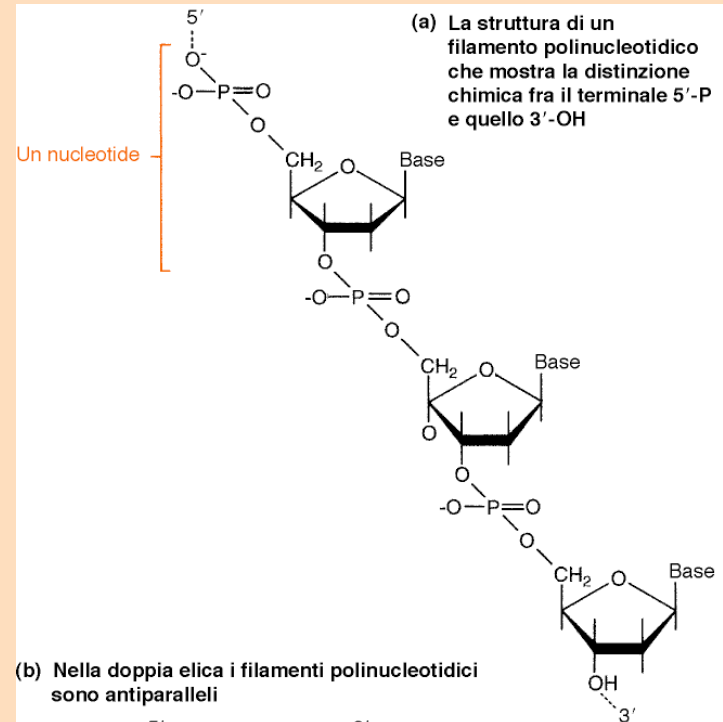
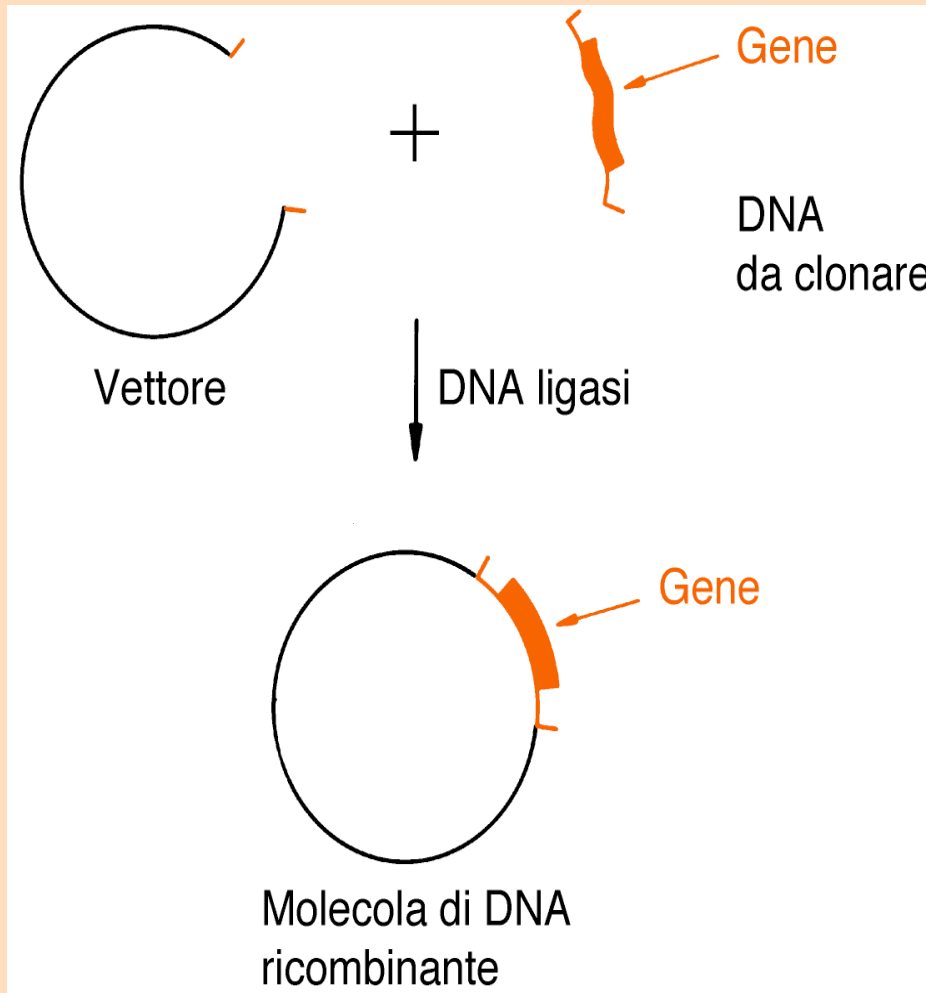


ligase



recombinant DNA
(2 orientations)

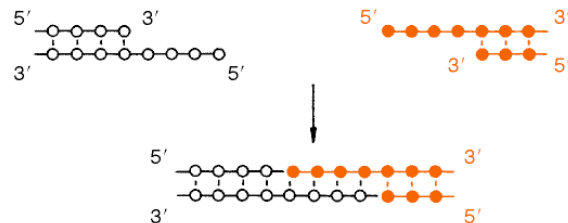
Ligazione



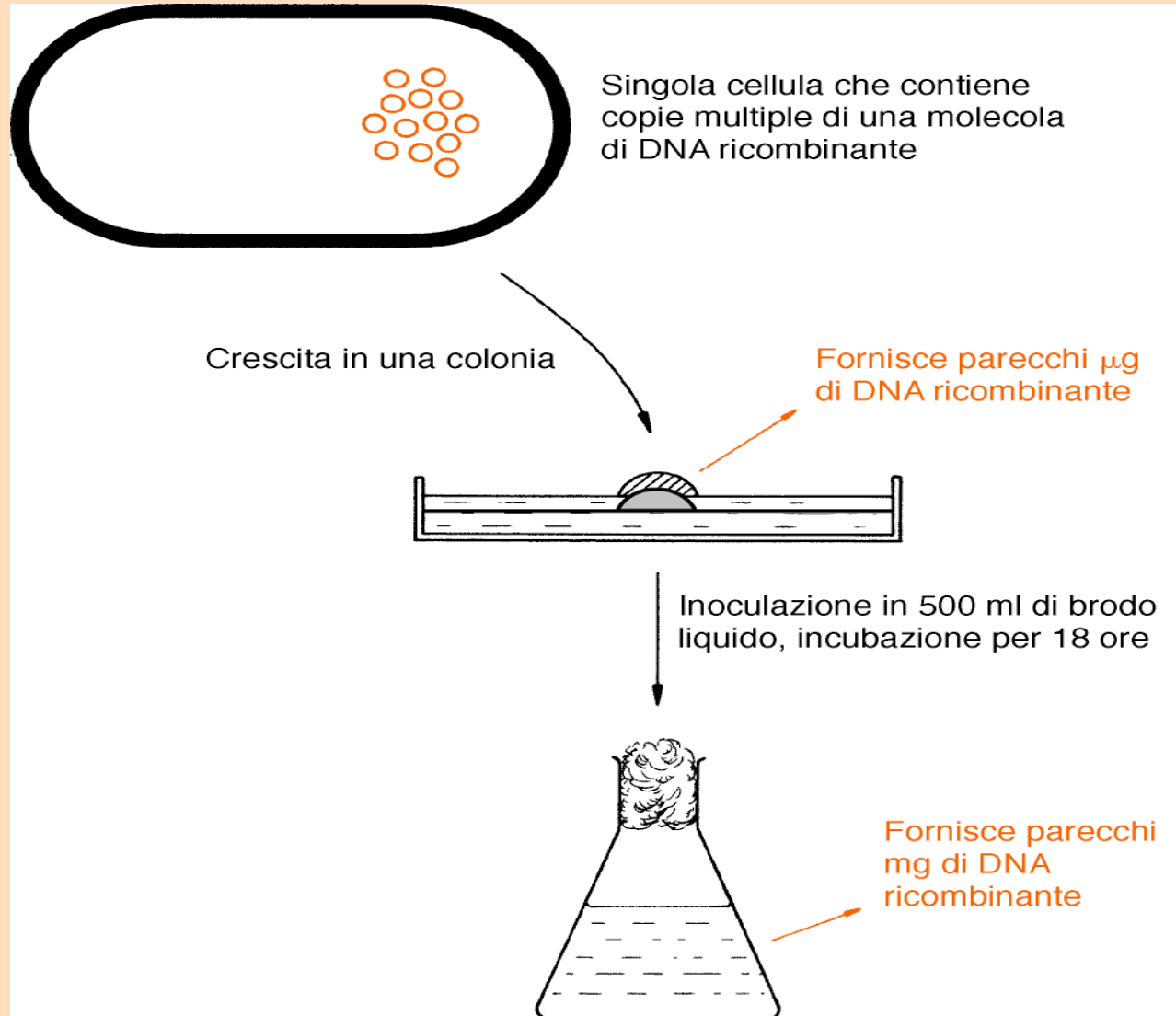
(b) Nella doppia elica i filamenti polinucleotidici sono antiparalleli



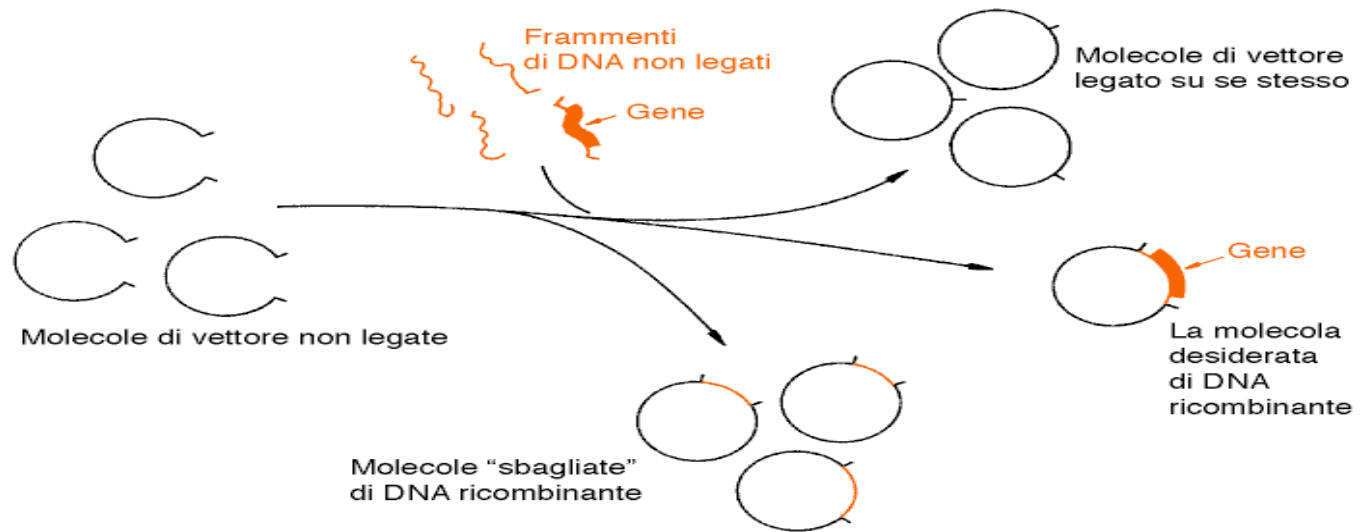
(c) La legatura avviene fra terminali 5'-P e 3'-OH



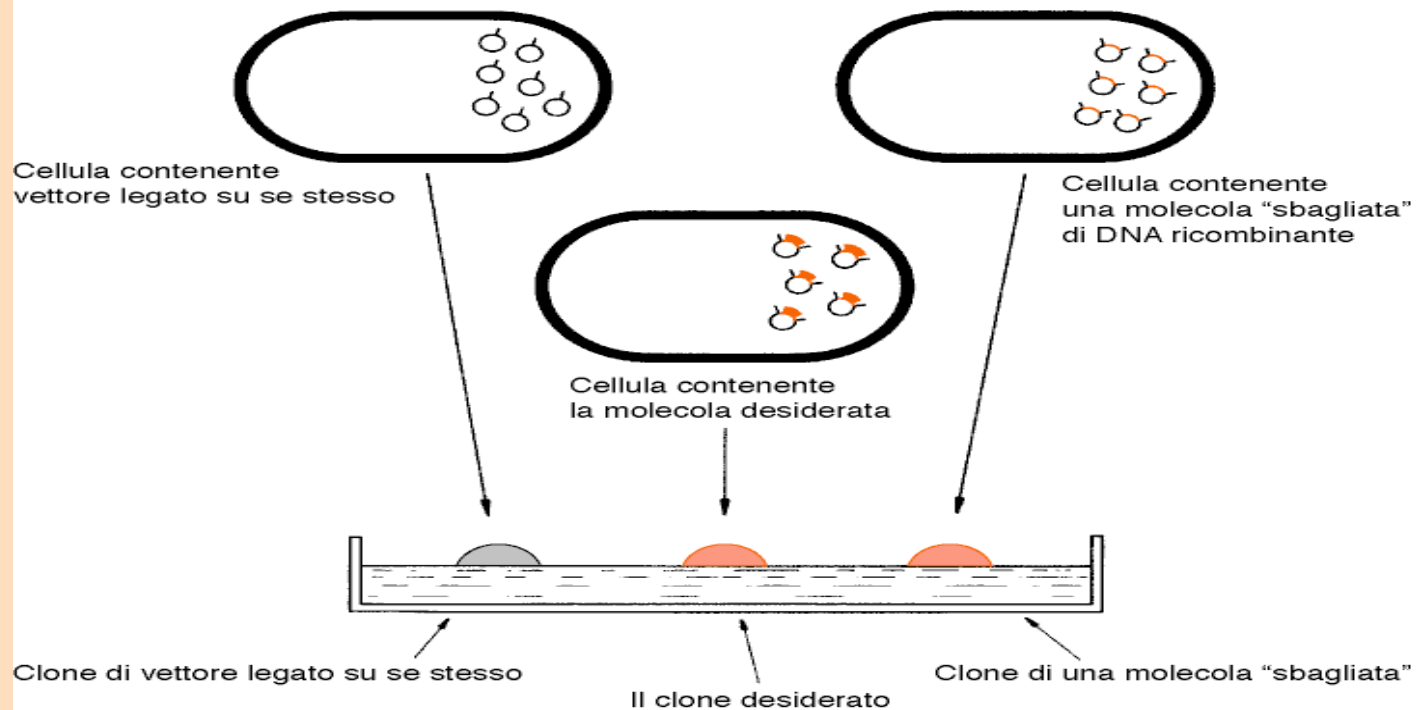
Introduzione di DNA in cellule batteriche



(a) I prodotti della legatura



(b) Tutte le molecole circolari verranno clonate

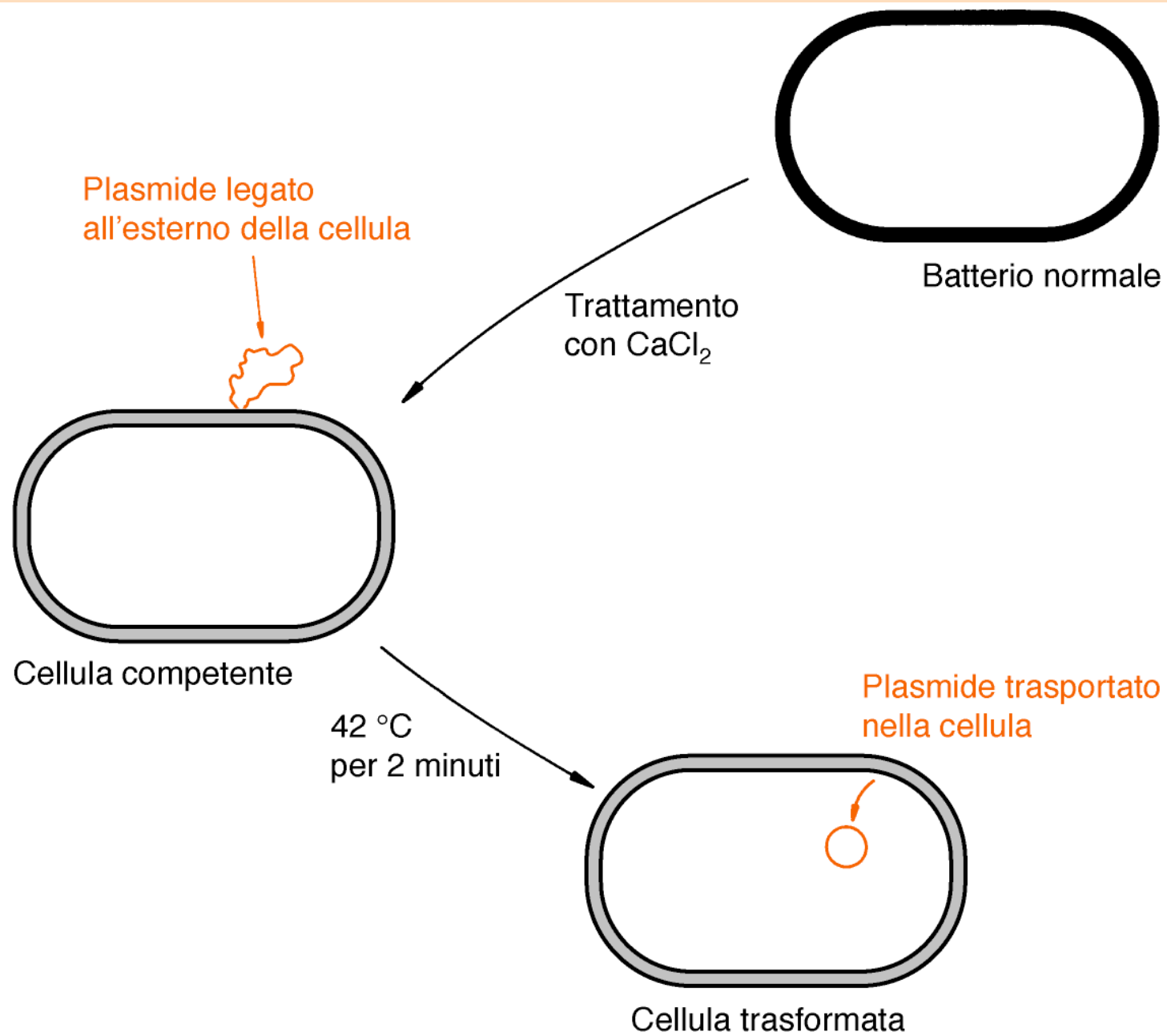


Trasformazione: introduzione di DNA plasmidico in cellule batteriche

- Non tutte le specie batteriche assumono DNA esogeno con la stessa efficienza.
- In laboratorio solo poche specie (soprattutto dei generi *Bacillus* e *Streptococcus*) possono assumere DNA estraneo con facilità.
- In condizioni normali i batteri, tra cui anche *E. coli*, incorporano DNA solo in quantità limitate. Per migliorare l'efficienza della trasformazione, le cellule devono subire un trattamento chimico e/o fisico. Queste cellule vengono dette **competenti**.

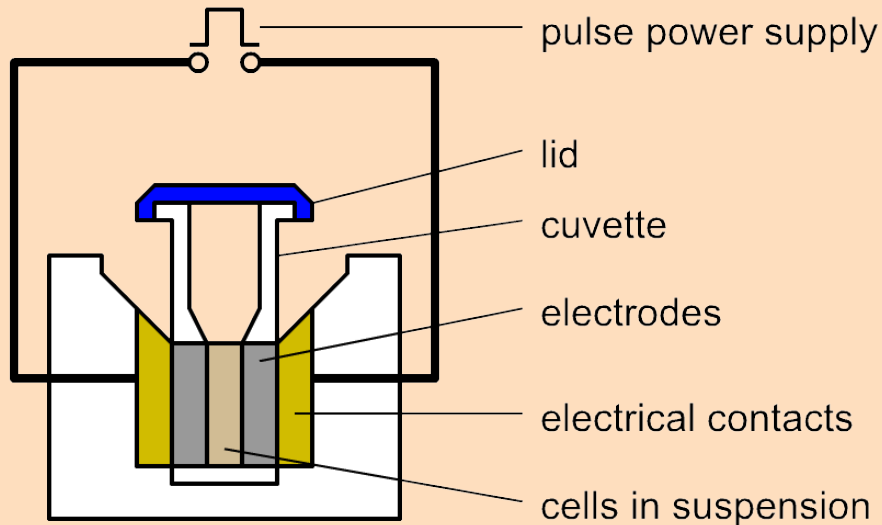
Preparazione di cellule competenti con CaCl_2

Cellule di *E.coli* immerse in una soluzione ghiacciata di CaCl_2 (ma funzionano anche altri sali come RbCl_2) assumono la capacità di legare le molecole di plasmide sull'esterno della cellula, questo poi viene internalizzato mediante un shock termico.



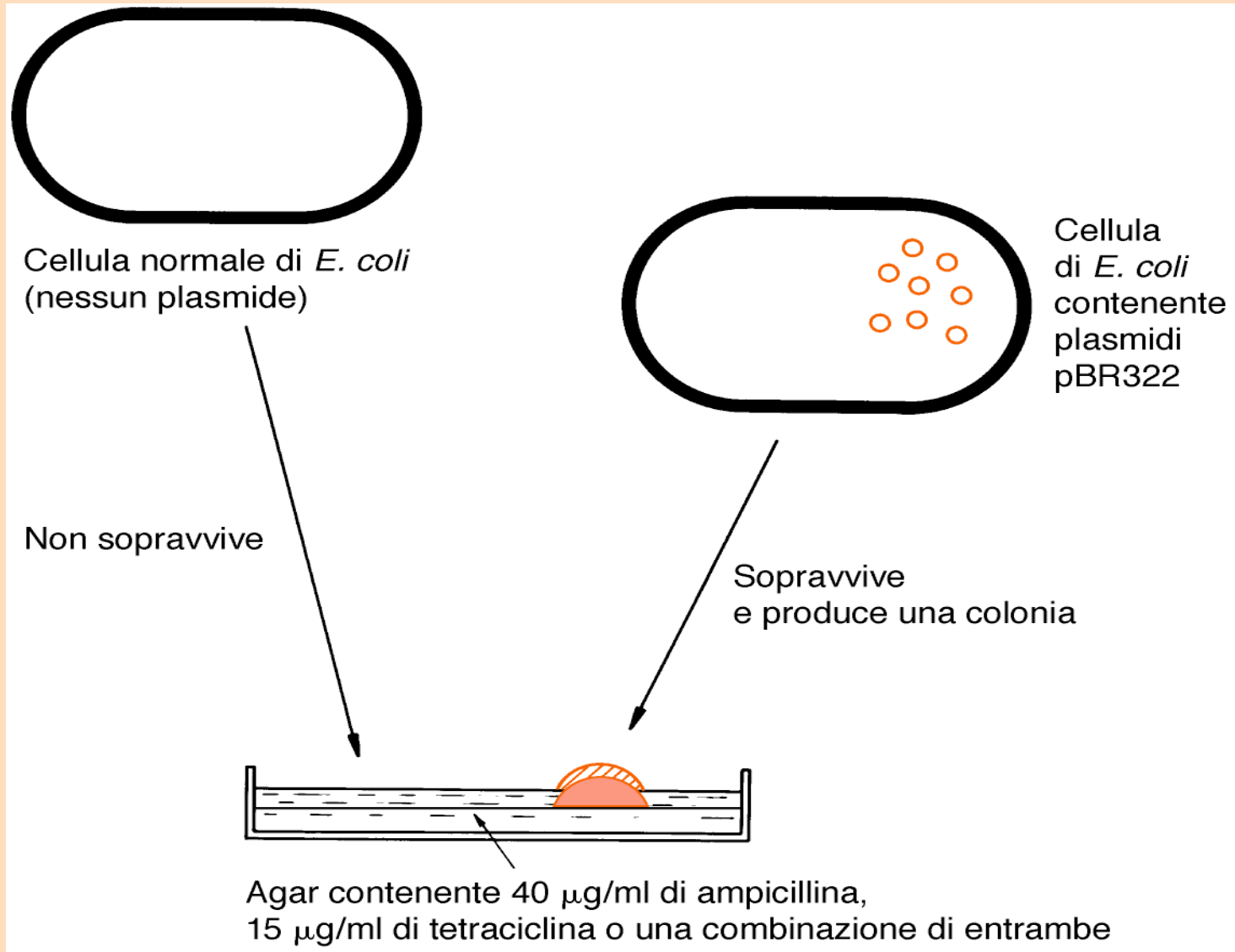
Metodo alternativo per la trasformazione: **elettroporazione**

Le cellule vengono mescolate con la soluzione contenente il plasmide e sottoposte ad una **repentina scarica elettrica** ad alto voltaggio che apre pori nella membrana e permette l'ingresso del DNA.

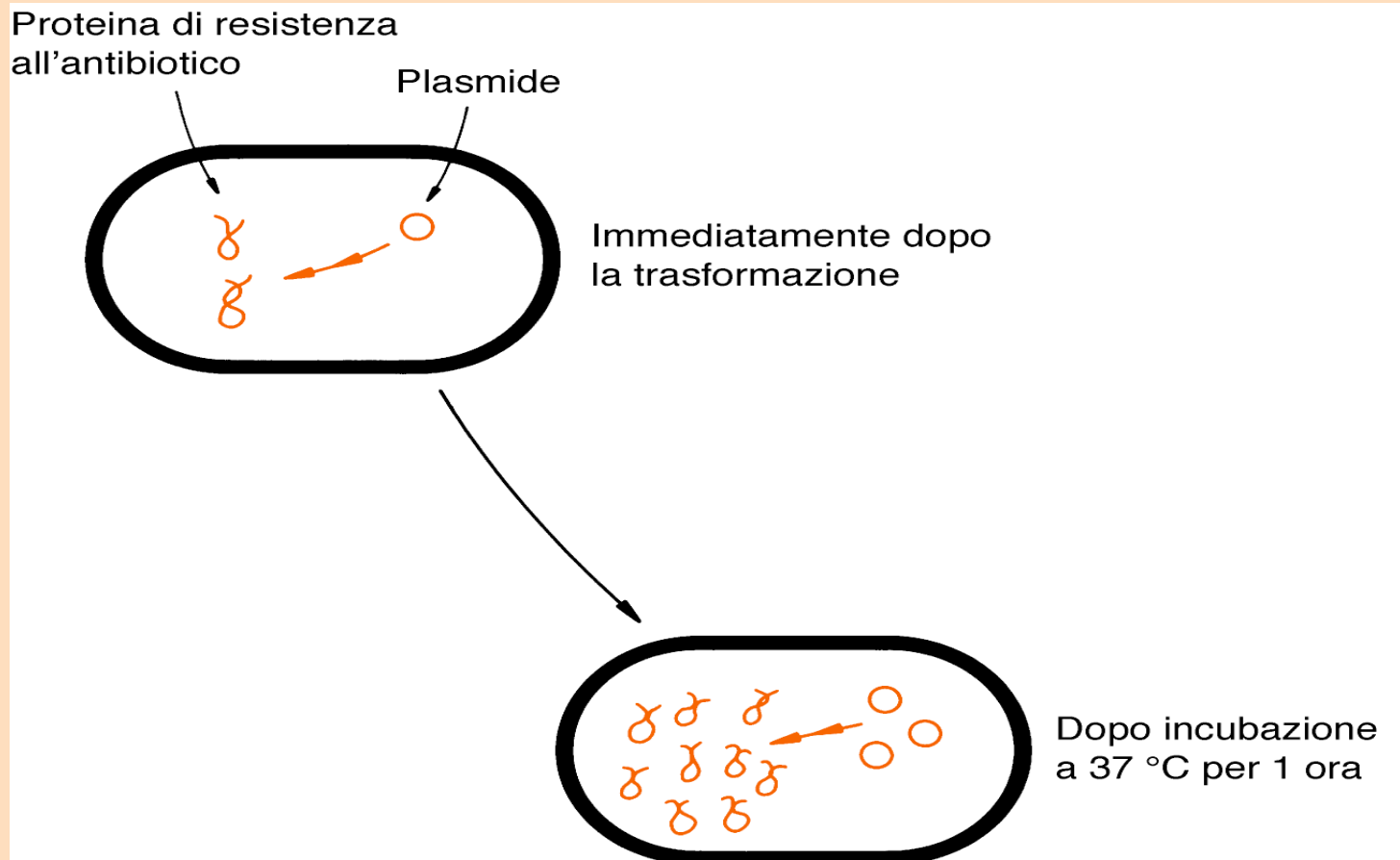


Questo metodo può essere applicato anche a cellule eucariotiche

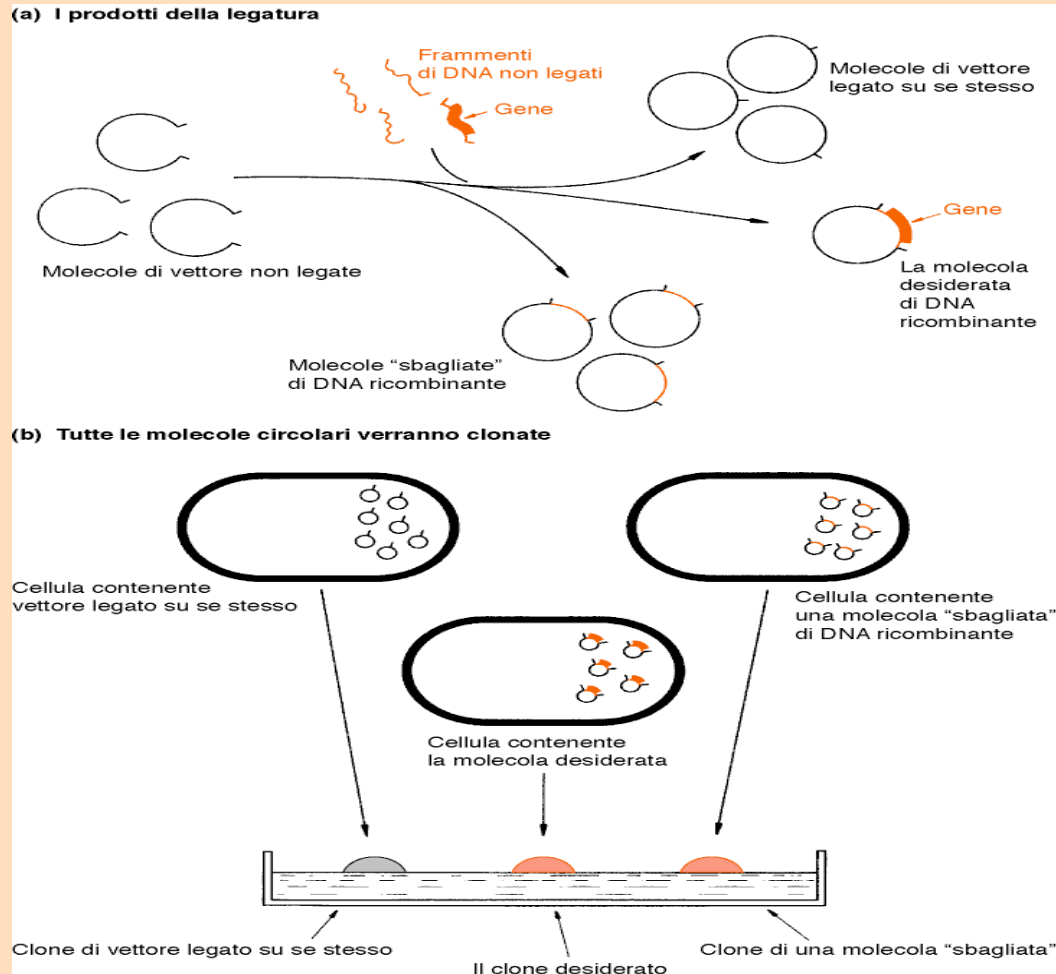
Selezione delle cellule trasformate



Prima di piastrare su terreno selettivo, si incubano le cellule in terreno non selettivo per permettere l'espressione degli enzimi che conferiscono la resistenza.

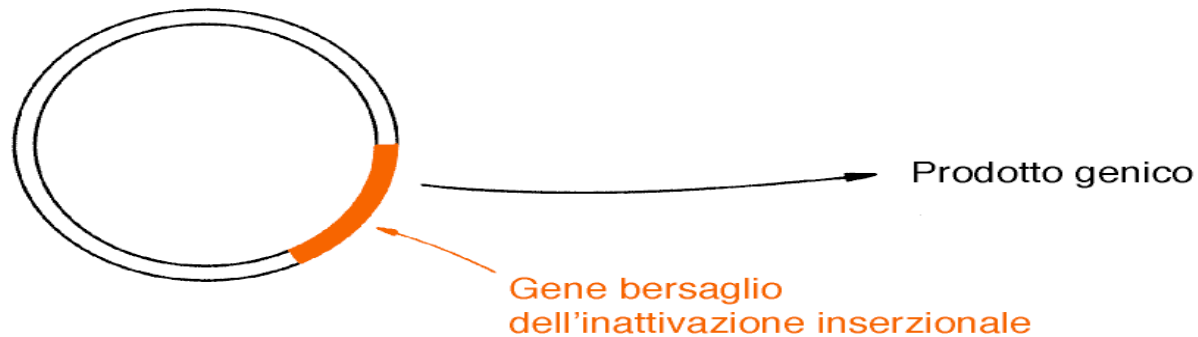


Tutte le cellule che contengono un vettore, sia ricombinante (con l'inserto) che non, danno origine a colonie resistenti.

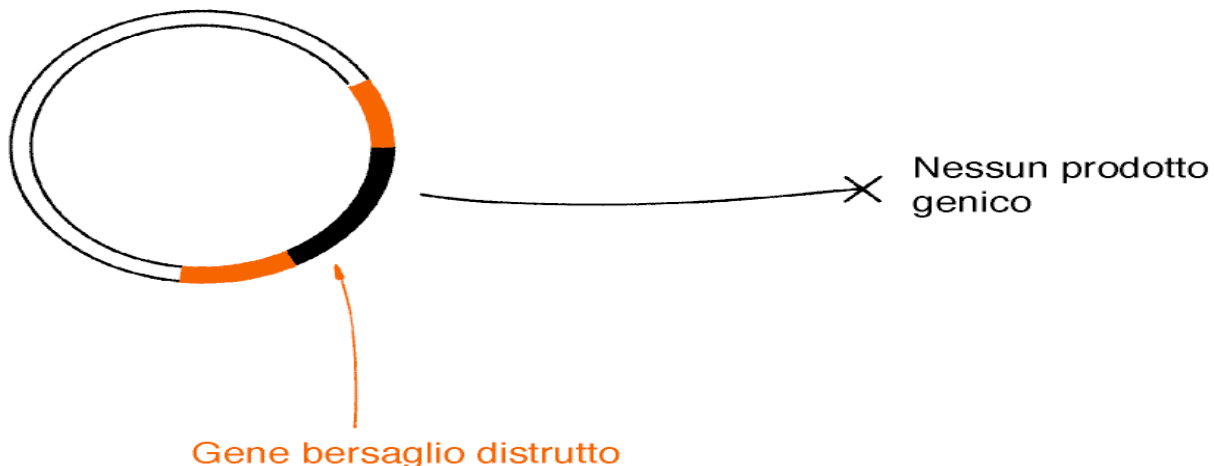


Identificazione delle colonie **ricombinanti** (che contengono il gene o l'inserto di interesse) tramite **inattivazione inserzionale**.

(a) Molecola normale del vettore

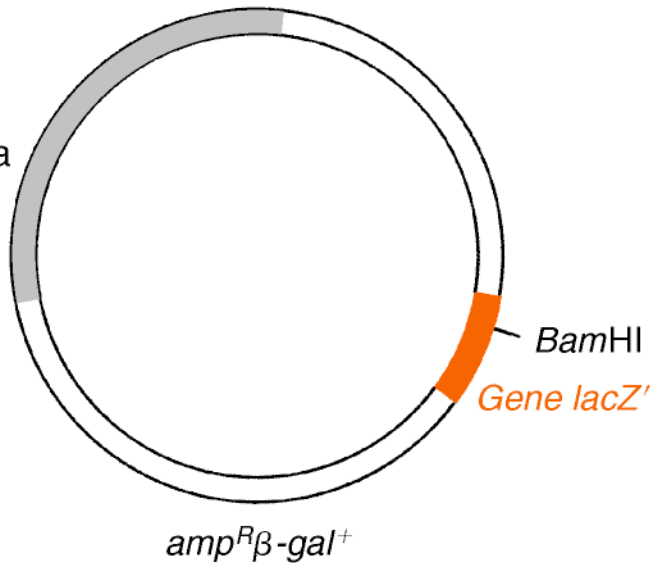


(b) Molecola ricombinante del vettore

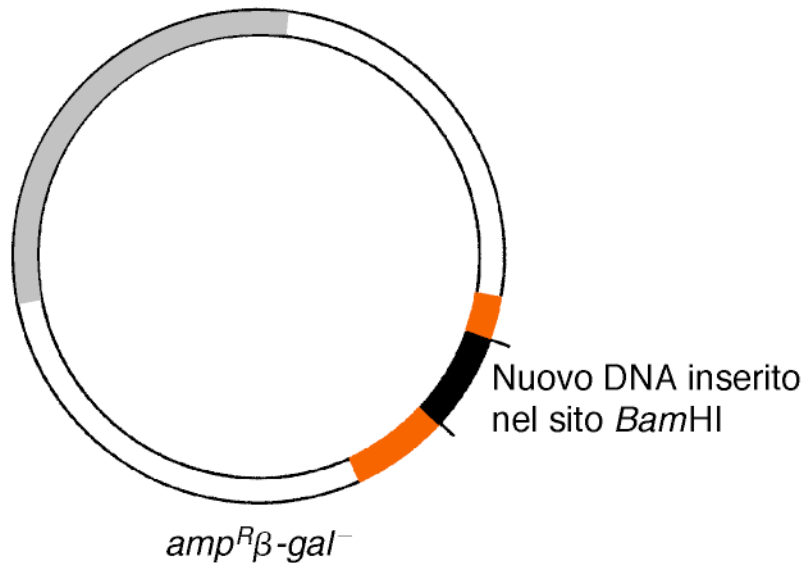


(a) pUC8

Gene della
resistenza
all'ampicillina

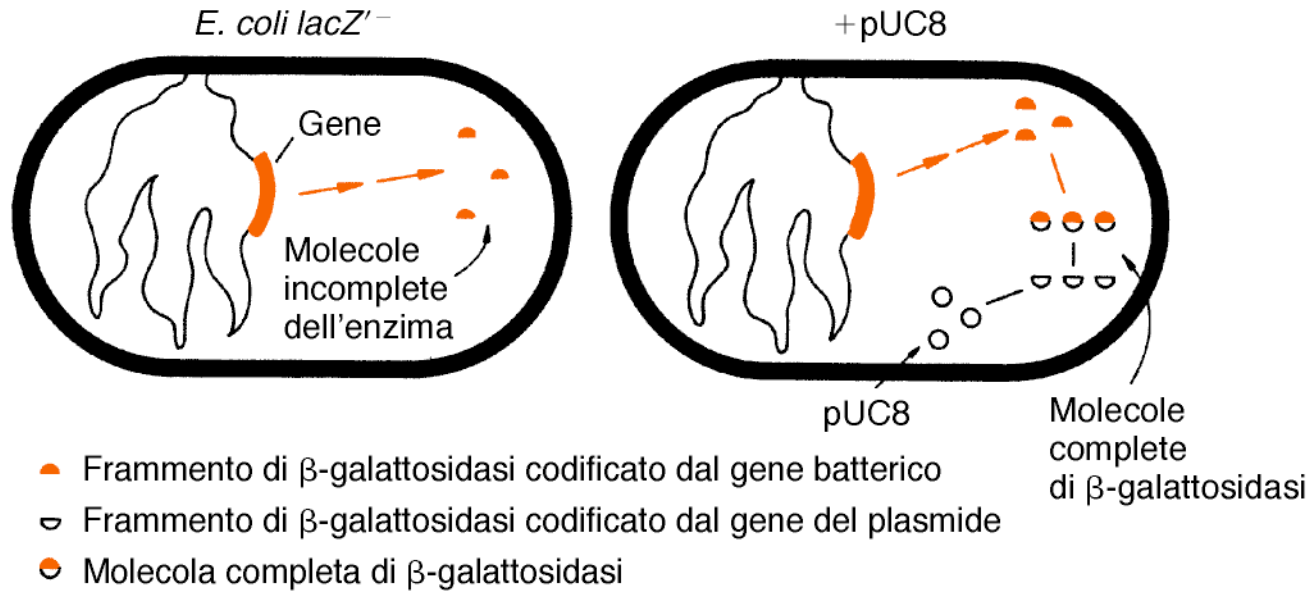


(b) Una molecola ricombinante di pUC8

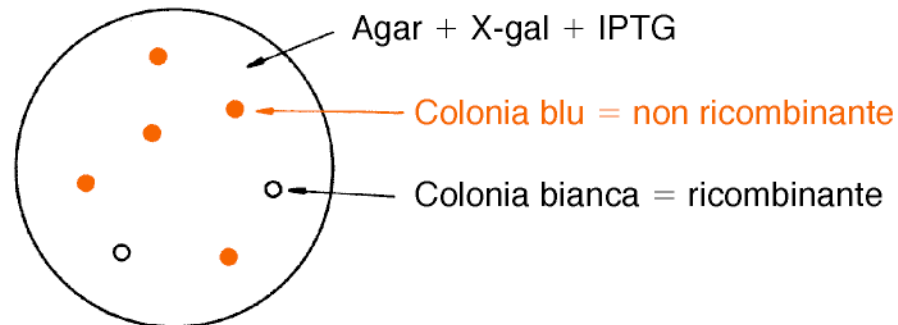


lacZ' codifica
l'enzima
β-galattosidasi.

(a) Il ruolo del gene *lacZ'*

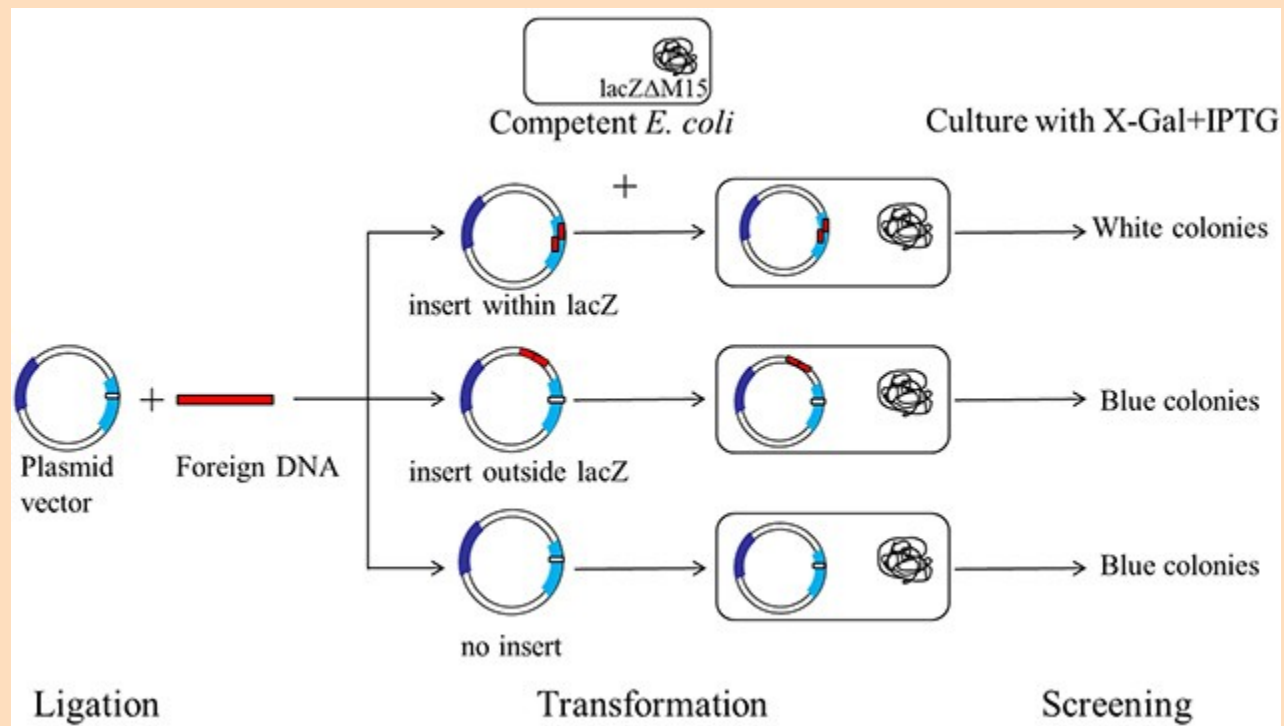


(b) Screening per pUC8 ricombinanti

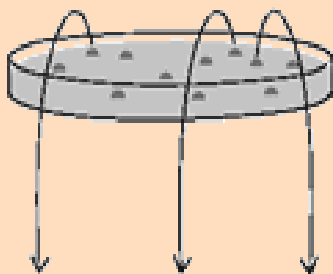


Colonie blu = β -galattosidasi sintetizzata
X-gal \rightarrow prodotto blu

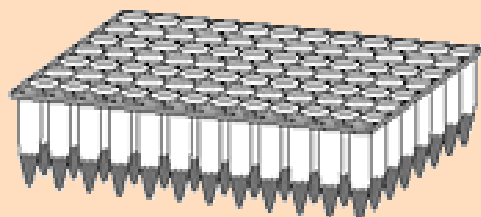
Colonie bianche = β -galattosidasi non sintetizzata
X-gal \rightarrow nessun prodotto blu



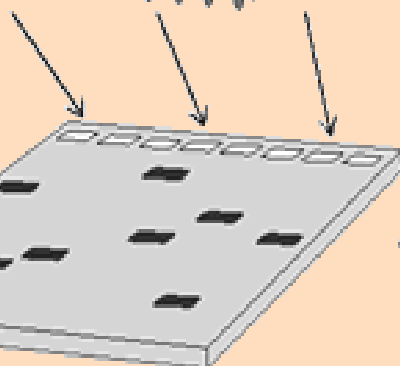
Colony PCR



1. Pick colony into a micro-centrifuge tube or microtiter well.



2. Add PCRLyse™ Solution, vortex, and heat 5' at 99°C.



3. Perform PCR using an aliquot of the lysed cells.

4. Gel electrophoresis and staining.

Colony PCR

This protocol is designed to quickly screen for plasmid inserts directly from *E. coli* colonies. The plasmid should be high copy number such as pUC18 pUC 19, or pBluescript, etc. Even though blue/white screening can be used to determine if inserts are present, this technique can be used to determine insert size and/or orientation in the vector. Alternately, the presence of an insert and its size can be determined by growing each colony in liquid, the plasmid purified by a boiling or alkaline preparation protocol, digestion of the plasmid with restriction enzyme(s) that excises the insert, followed by separation by agarose gel electrophoresis.

Typical colony PCR reaction

Mix together the following on ice; always adding enzyme last. For multiple samples, make a large master mix and aliquot 50 μ l in each PCR tube (also on ice).

38 μ l	sterile distilled water
5 μ l	10X PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X 100)
3 μ l	25 mM $MgCl_2$
1 μ l	10 mM dNTPs (10 mM each dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
1 μ l	20 μ M forward primer
1 μ l	20 μ M reverse primer
0.2-1 μ l	<i>Taq</i> polymerase
50 μ l	total volume

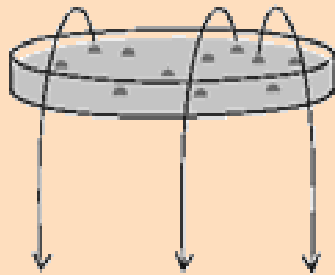
To each cold PCR tube containing the PCR reaction, add a small amount of colony. To do this, use a fine yellow pipette tip attached to a pipetter (set at 30 μ l to avoid addition of air into the PCR reaction) and pipette up and down to mix. The amount of cells should be small, just a touch will do, the small amount required to fill the end of the opening is sufficient. Sufficient mixing will result in complete cell lysis and high yields.

PCR conditions

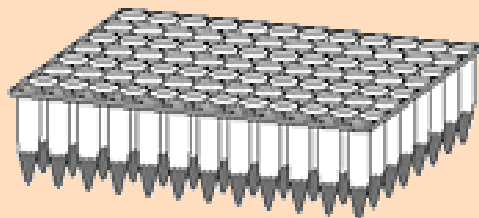
		What happens?
1 cycle	5 min at 95°C	-initial cell breakage and DNA denaturation
30-40 cycles	1 min at 95°C	-DNA denatures into single strands
	1.5 min at 54°C	-primers anneal to ssDNA template (temp depends on primers)
	1 min at 72°C	-primers are extended from 3'-end by <i>Taq</i> (1 min/kb)
1 cycle	5 min at 72°C	-final extension to make sure all products are full length (72°C is optimal for <i>Taq</i> polymerase)



Colony PCR



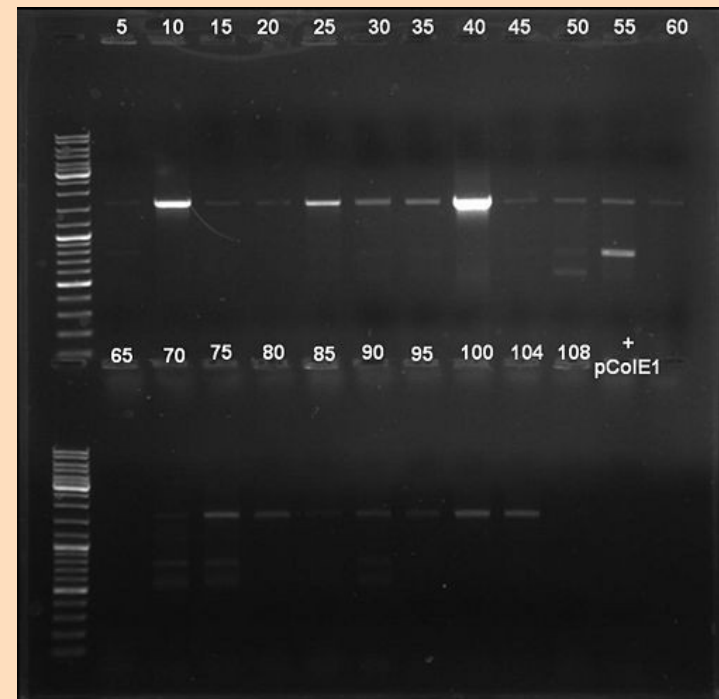
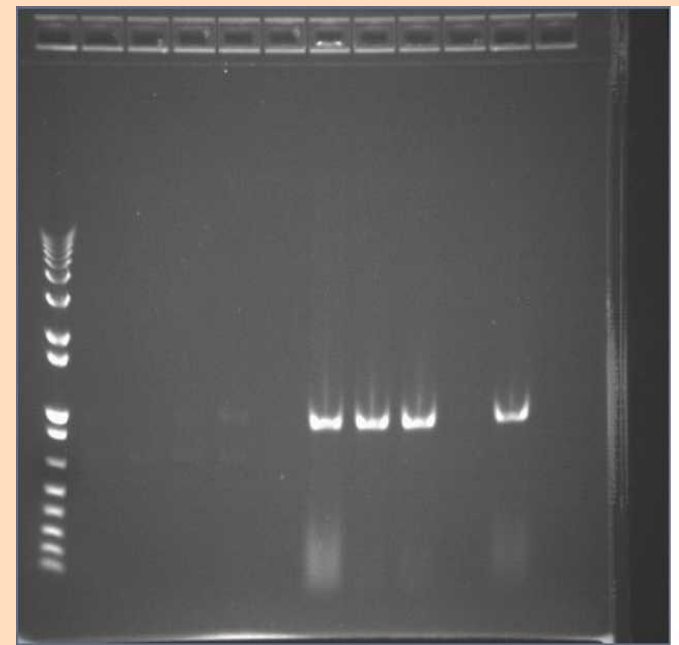
1. Pick colony into a micro-centrifuge tube or microtiter well.



2. Add PCRLyze™ Solution, vortex, and heat 5' at 99°C.

3. Perform PCR using an aliquot of the lysed cells.

4. Gel electrophoresis and staining.



Nel caso si utilizzino vettori derivati da DNA virale, si parla di:

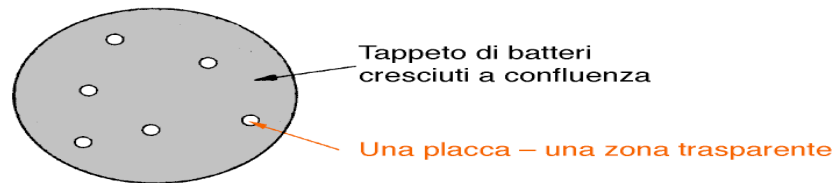
Trasfezione: introduzione diretta di DNA virale nelle cellule.

Infezione: introduzione del DNA nelle cellule da particelle virali già formate.

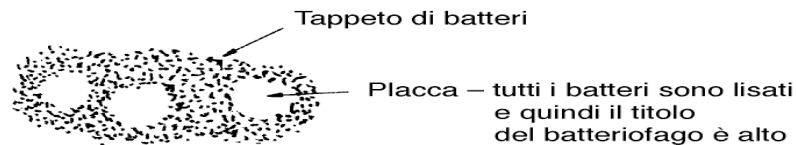
Se l'inserito è contenuto in un vettore di origine fagica, non avremo colonie di batteri che sopravvivono ma, al contrario, placche di lisi (costituite da cellule batteriche morte) corrispondenti alle zone di infezione di ciascuna particella fagica e quindi di ogni singola molecola di DNA ricombinante.

L'infezione fagica si realizza utilizzando fagi preformati *in vitro* si visualizza sotto forma di placche su piastre di agar coperte di batteri.

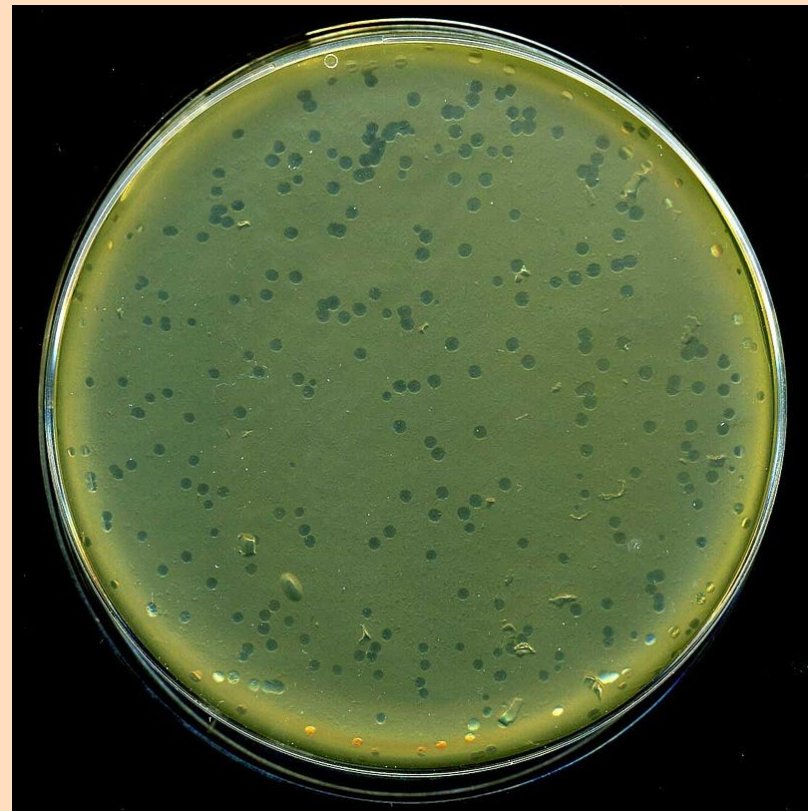
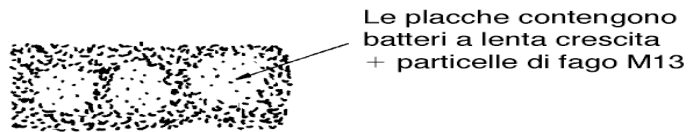
(a) Placche su un tappeto di batteri



(b) Placche litiche

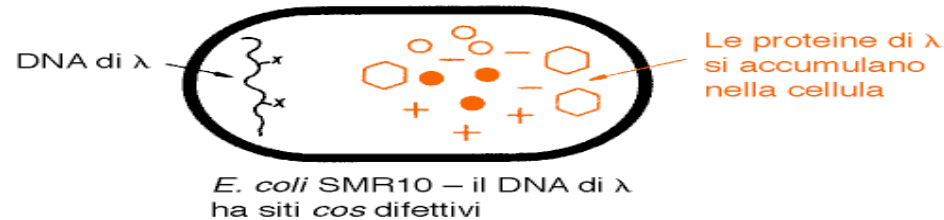


(c) Placche di M13



Packaging *in vitro* delle particelle fagiche

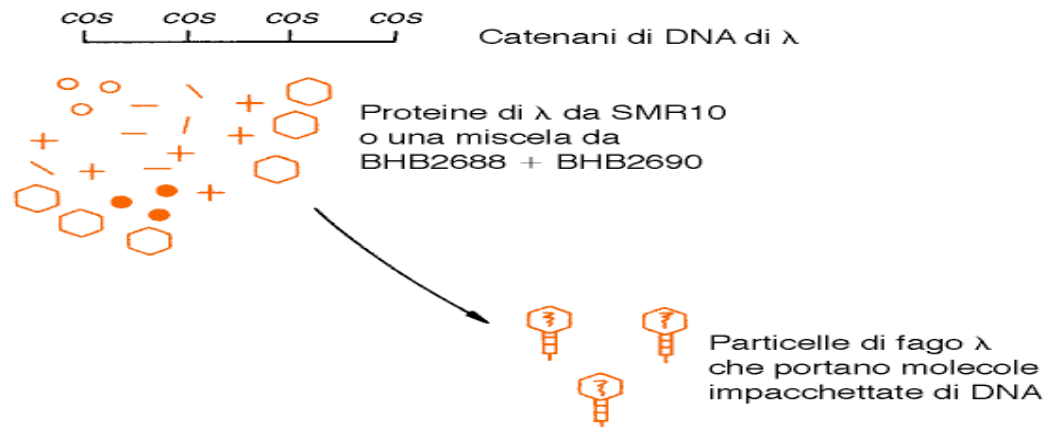
(a) Un sistema di packaging con un singolo ceppo



(b) Un sistema di packaging con due ceppi



(c) Packaging *in vitro*



Preparazione di terreno LB solido (50 ml)

Luria-Bertani (LB) medium

1% tryptone
0.5% yeast extract
0.5% NaCl
1.5% bacteriological agar

- 1) Pesare le quantità necessarie a preparare 50 mL di terreno. Aggiungere 50 mL di acqua distillata.
- 2) Attaccare alla bottiglia un pezzetto di nastro da autoclave.
- 3) Sterilizzare in autoclave.

Preparazione delle cellule competenti

- Prelevare in sterilità 5 mL di una coltura di cellule di E. coli DH5a ad OD 600 di 0.3-0.4 e trasferirli in una provetta Falcon da 50 mL sterile.
- Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4°C ed eliminare il supernatante.
- Risospendere dolcemente le cellule in 0.8 mL di buffer 1 e trasferire sotto cappa la sospensione in un eppendorf da 2 mL.
- Incubare in ghiaccio 15 minuti.
- Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4°C.
- Eliminare sotto cappa il supernatante e risospendere le cellule in 400 µL di buffer 2.
- Congelare in N₂ liquido e conservare a -80°C.

Composizione buffer 1 e buffer 2:

- Buffer 1 (50 mL):
 - RbCl 12 g/l (0.6 g)
 - MnCl₄H₂O 9.9 g/l (0.49 g)
 - 1.5 mL di una soluzione di KAc 1 M a pH 7.5
 - CaCl₂*2H₂O 1.5 g/l (0.075 g)
 - Glicerolo 150 g/l (7.5 g)
 - Si porta a pH 5.8 con HAc, si porta a volume (50 mL) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.
- Buffer 2 (20 mL):
 - 0.4 mL di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
 - RbCl 1.2 g/l (0.025 g)
 - CaCl₂*2H₂O 11 g/l (0.22 g)
 - Glicerolo 150 g/l (3 g)
 - Si porta a volume (20 mL) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.

Preparazione delle piastre di LB-agar

Sciogliere il terreno LB-agar nel microonde (se già solidificato). Aspettare che si raffreddi (ma non che solidifichi) e sotto cappa aggiungere 100 µg/ml di ampicillina (50 uL dello stock 1000X). Versare il terreno nelle due piastre. Lasciarle aperte sotto cappa fino a che l'agar solidifica, chiuderle e conservarle a 4 °C.