

Molte applicazioni della tecnologia del DNA necessitano della produzione di cloni di un certo tratto di doppia elica o di un gene. Per ottenere queste copie si ricorre all'introduzione del DNA d'interesse in un batterio che duplicherà sia il suo genoma sia il segmento esogeno. Per compiere questa operazione è però necessario disporre di un vettore in grado di trasferire il DNA esogeno all'interno del batterio. Un vettore è rappresentato dal **plasmide**, il quale non è altro che un piccolo anello di DNA circolare a doppio filamento di origine extracromosomica che si trova all'interno del citoplasma di molti batteri.

I plasmidi hanno peculiari caratteristiche che li rendono idonei a essere dei vettori utilizzati nell'ingegneria genetica.

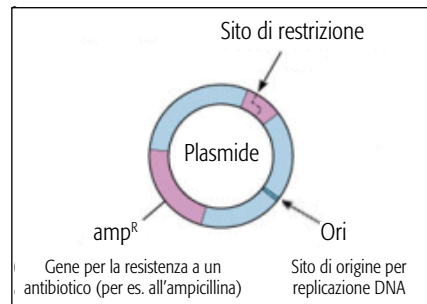
Come già accennato, sono piccoli (qualche migliaio di coppie nucleotidiche), circolari e autoreplicanti. Si duplicano infatti insieme al cromosoma durante la duplicazione cellulare e ogni cellula figlia, in questo caso, conterrà una copia del plasmide. Questa però non è una regola fissa, in quanto alcuni plasmidi possono avere una frequenza di duplicazione maggiore rispetto a quella del cromosoma e le cellule, di conseguenza, conterranno più copie del plasmide. Al contrario, se il plasmide si duplica con frequenza inferiore rispetto al cromosoma, le cellule possono anche non contenere alcuna copia del plasmide.

Un vettore plasmidico è derivato da plasmidi naturali poi ingegnerizzati per rispondere a determinati requisiti. I vettori di clonaggio devono inoltre contenere:

- un'origine di duplicazione (ORI): permette al plasmide una replicazione che può essere indipendente dal cromosoma;
- un sito di taglio per gli enzimi di restrizione (endonucleasi): necessario per tagliare e aprire il plasmide per inse-

rire al suo interno il segmento di DNA esogeno, "cucito" poi da una ligasi;

- un gene per riconoscere il plasmide ingegnerizzato, ossia un gene che codifichi per caratteristiche selezionabili, come la resistenza agli antibiotici.



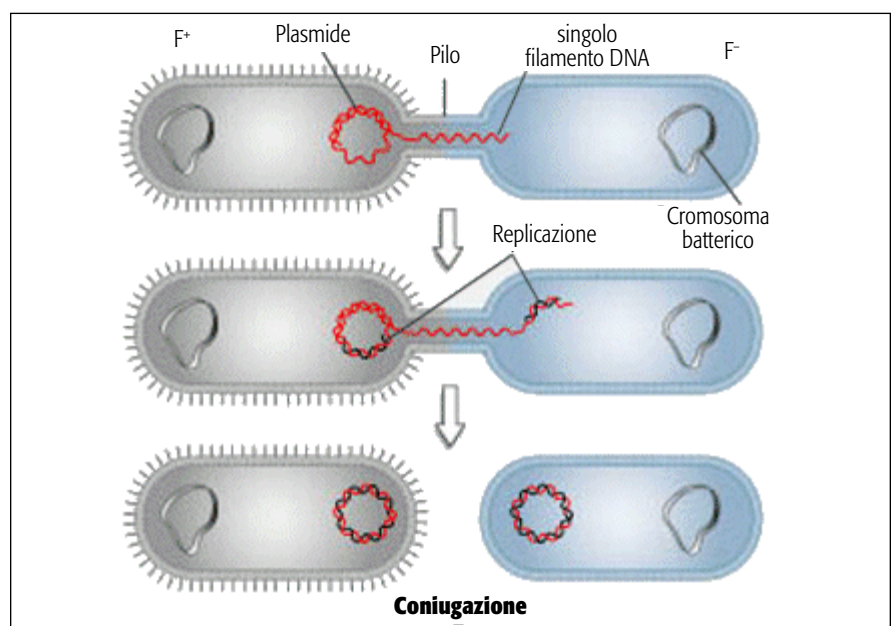
I plasmidi vengono scelti come vettori perché:

1. sono piccoli: avendo un peso molecolare basso sono facili da manipolare e purificare;
2. sono presenti in elevato numero di copie all'interno della cellula (ciò rende quindi possibile l'amplificazione del DNA);
3. la loro forma circolare conferisce maggiore stabilità al DNA durante l'isolamento;
4. hanno siti unici per molti enzimi di restrizione;

5. dispongono di marcatori genetici selezionabili, come la resistenza ad antibiotici o marcatori nutrizionali (che consentono di individuare le cellule contenenti il plasmide).

Esistono diversi tipi di plasmidi, classificati in base al tipo di geni che essi contengono, quindi si distinguono: plasmide F, plasmide R e plasmidi metabolici.

- **Plasmidi F** (fertilità): identificato come il fattore F di *Escherichia coli*, esso contiene 25 geni che codificano le proteine dei pili e del tubo di coniugazione. La cellula avente il plasmide F è identificata come F⁺ ed è in grado di trasferire una copia del suo plasmide a una cellula che ne è priva, identificata come F⁻, trasformandola. Il fattore F, introdotto all'interno della cellula, può essere indipendente oppure integrarsi al cromosoma batterico. Durante il processo di coniugazione il cromosoma si apre vicino alla sequenza del fattore F iniziando quindi la duplicazione. La terminazione libera del filamento di DNA passa nella cellula F⁻ mano a mano che la duplicazione continua.



I plasmidi: vettori di geni

- **Plasmidi R** (resistenza): sono fattori di resistenza che al loro interno contengono geni codificanti proteine che sono in grado di demolire o alterare gli antibiotici. Furono scoperti nel 1959 da un gruppo di scienziati giapponesi che scoprì che in determinate condizioni sperimentali la totalità delle cellule sensibili ai farmaci potevano diventare resistenti in meno di un'ora se mescolati con certi batteri resistenti. Un singolo plasmide può portare fino a 10 diversi geni per la resistenza contenuti in elementi **trasponibili**, e la cellula ospite (la cellula che riceve il plasmide) diventa resistente a 10 diversi tipi di antibiotici tramite coniugazione.
- **Plasmidi metabolici**: sono plasmidi in grado di conferire alle cellule capacità metaboliche insolite (ne è un esempio la crescita di certi batteri sugli idrocarburi, demoliti da enzimi codificati dai geni portati dal plasmide).

Elementi trasponibili: i trasposoni

Esistono frammenti di DNA in grado di spostarsi all'interno di una singola cellula, chiamati **trasposoni**. Essi possono saltare nel cromosoma da una posizione all'altra oppure spostarsi dal plasmide al cromosoma e viceversa. Il processo che identifica gli spostamenti di tali frammenti all'interno del genoma è noto come **trasposizione**.

Nella **trasformazione** i batteri sono trattati con particolari soluzioni di ioni bivalenti, che modificano la parete cellulare e la membrana plasmatica e le rendono permeabili al DNA, che può così entrare.

L'**elettroporazione** è invece una tecnica che sfrutta la stimolazione elettrica sulle cellule in cui il vettore deve essere inserito. Gli impulsi elettrici destabilizzano la membrana plasmatica e inducono la formazione di pori attraverso i quali il DNA può entrare.

I plasmidi utilizzati come vettori di clonaggio possono essere manipolati e utilizzati per scopi diversi, tra i quali vi è il clonaggio genico (o molecolare) così da ottenere più copie di una determinata sequenza nucleotidica.

Se introduciamo un gene esogeno in un batterio, otteniamo un batterio ricombinante. Il gene esogeno si riprodurrà insieme al batterio, ottenendo numerose copie dello stesso gene: clonaggio genico.

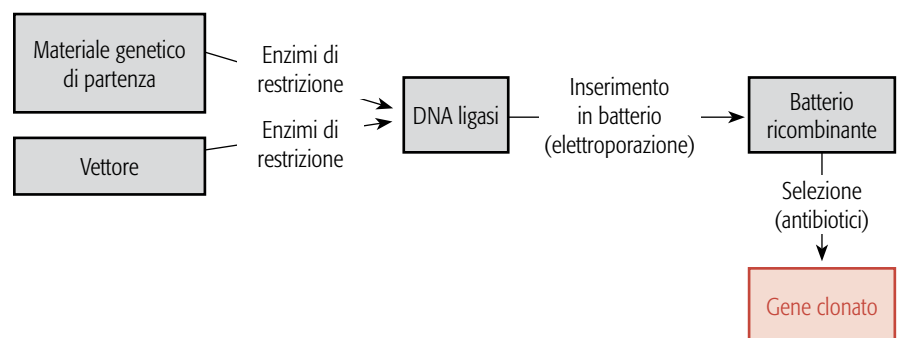
Questo si ottiene attraverso una serie di tappe:

1. Si sottopone il DNA donatore al taglio enzimatico con **enzimi di restrizione** che lo taglieranno in punti specifici, così da crearne frammenti contenenti i geni di nostro interesse.

2. Questi enzimi taglieranno poi il vettore (il plasmide) che vogliamo utilizzare, originando dei punti di rottura che saranno complementari a quelli creati sul DNA, per inserire il materiale genetico che vogliamo clonare.
3. Il DNA appena inserito sarà legato al vettore/plasmide grazie all'intervento di una ligasi, ottenendo così un plasmide (DNA) ricombinante.
4. Il plasmide ricombinante viene inserito all'interno di cellule batteriche (ad esempio *E. coli*) mediante trasformazione o elettroporazione.
5. Il batterio ricombinante, contenente il gene esogeno introdotto nel plasmide, si riproduce, clonando il gene desiderato.
6. I batteri verranno poi "piastrati" ossia coltivati in piastra di Petri su un terreno selettivo (per far sopravvivere soltanto i batteri che hanno subito la trasformazione), sfruttando per il loro riconoscimento i marcatori inseriti nel plasmide (ad esempio il gene per la resistenza a un particolare antibiotico).
7. Una volta selezionati, vengono posti in coltura, consentendo così la produzione della sostanza richiesta.
8. Si procede infine alla purificazione del prodotto che abbiamo clonato.

I plasmidi, in condizioni naturali, utilizzano la coniugazione come metodo di trasferimento da una cellula all'altra, ma in ingegneria genetica questi vettori sono modificati al fine di evitare che il trasferimento avvenga attraverso il contatto tra cellule.

L'introduzione del vettore avviene per trasformazione o per elettroporazione.



I plasmidi: vettori di geni

Clonazione plasmidica

