



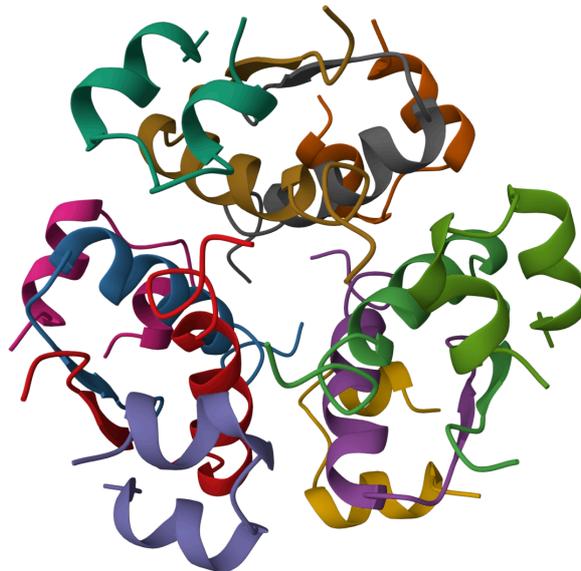
Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

---

# L'INSULINA RICOMBINANTE

Dai batteri al computer

---



Università degli Studi di Milano

L'insulina è un ormone proteico, il cui nome deriva dal latino "*insula*", in quanto secreto da gruppi di cellule endocrine presenti nel pancreas chiamate isole di Langerhans. Principalmente l'insulina permette il metabolismo del glucosio attivando la glicolisi; favorisce l'accumulo di glucosio nel fegato sotto forma di glicogeno e l'immagazzinamento dei grassi.

### Breve storia della scoperta

Studiando al microscopio la struttura del pancreas, il giovane studente di medicina **Paul Langerhans** vi individuò delle masserelle di tessuto sparse (isole di Langerhans). Era il 1869 e da allora si cercò di capire quale fosse la funzione di queste cellule: si pensava producessero un secreto con funzione regolatrice nella digestione.

Nel 1889, **Oscar Minkowski**, in collaborazione con **Joseph von Mering**, notò l'insorgere del diabete in cani a cui era stato rimosso il pancreas. Questa ghiandola doveva quindi essere coinvolta nella regolazione del livello di zuccheri nel sangue, e in particolare le isole di Langerhans, come stabilì più tardi

Negli anni successivi si susseguirono diversi tentativi d'isolare il secreto delle isole di Langerhans, ma solo nell'ottobre del 1920 **Frederick Banting**, leggendo un articolo di Minkowski, intuì un metodo che avrebbe avuto successo. Egli capì che la secrezione esocrina del pancreas poteva distruggere la secrezione interna delle isole di Langerhans, quindi bisognava fare in modo d'eliminarla. Durante l'estate successiva lavorò all'Università di Toronto sotto la supervisione di **John James Rickard Macleod** e con l'aiuto dello studente in medicina **Charles Best**. La sua idea era di legare i dotti pancreatici nei cani; dopo alcune settimane le cellule con funzione digestiva del pancreas sarebbero morte e sarebbero state assorbite dal sistema immunitario, lasciando le isole di Langerhans. Da esse fu prelevato il secreto prodotto che venne chiamato "*isletin*" (da cui insulina).

Somministrato in cani privati del pancreas, questo estratto era in grado di abbassare il livello di zuccheri nel sangue! Nei mesi successivi Banting e Best cercarono di perfezionare il metodo d'estrazione, cercando di abbreviarne i tempi (erano necessarie sei settimane per riuscire a estrarre insulina da un animale!): usarono per questo pancreas fetale bovino, che non ha ancora sviluppato le ghiandole digestive. In seguito, fu necessario purificare l'estratto e a tal fine si avvalsero della collaborazione del biochimico **James Bertram Collip**. Nel 1922 iniziò la sperimentazione clinica: furono iniettate con successo dosi di insulina purificata in bambini diabetici. Dal novembre di quell'anno, la casa farmaceutica Eli Lilly cominciò a produrre insulina purificata.

Nel 1923 F. Banting e J. Macleod ricevettero il premio Nobel per la Medicina, che vollero condividere con Best e Collip.

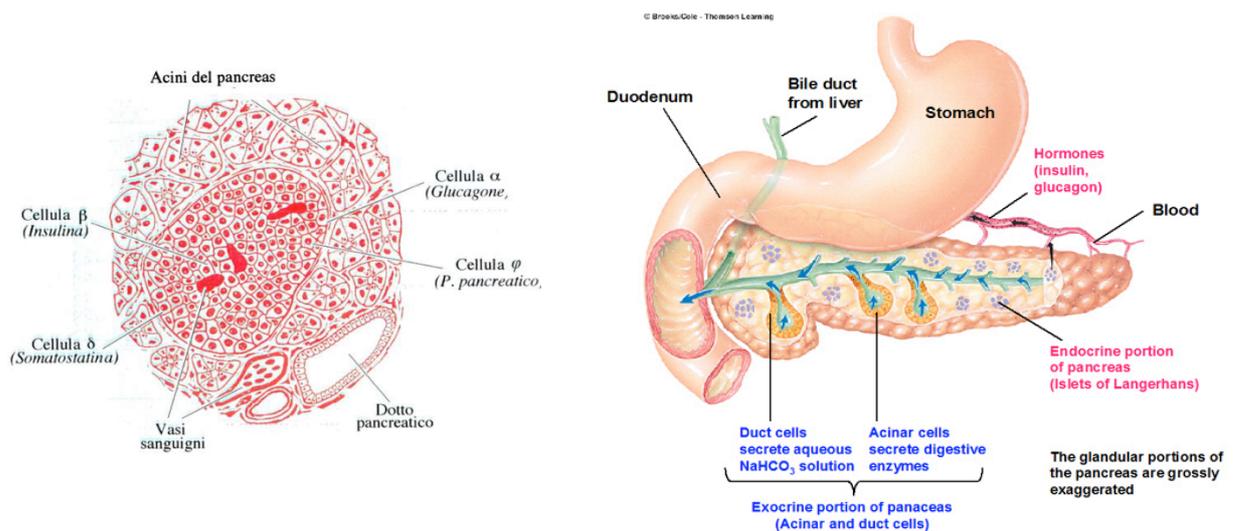
Nel 1958, un altro premio Nobel, questa volta per la Chimica, fu assegnato al biologo molecolare britannico **Frederick Sanger**, per aver determinato la sequenza di aminoacidi dell'insulina. Nel 1969, **Dorothy Crowfoot Hodgkin**, già premio Nobel per la Chimica, determinò la configurazione spaziale dell'insulina, mediante diffrazione a raggi X. Nel 1977, **Rosalyn Sussman Yalow**

ricevette un Nobel per la Medicina per aver sviluppato la tecnica diagnostica radioimmunologica per l'insulina (RIA, Radio Immuno Assay).

### Produzione dell'insulina nel pancreas

Nei mammiferi, l'insulina è sintetizzata dal pancreas: esso è principalmente una ghiandola esocrina, per la produzione di succhi digestivi, ma il 2% della sua massa complessiva ha funzione endocrina. Questa porzione è rappresentata dalle isole di Langerhans, composte da almeno quattro tipi di cellule (Fig. 2):

- cellule  $\alpha$  (15-20%) che secernono glucagone (ormone che promuove il rilascio di glucosio nel sangue rimuovendolo dal glicogeno epatico);
- cellule  $\beta$  (65-80%) che secernono insulina;
- cellule  $\delta$  (3-10%) che secernono somatostatina (ormone che inibisce sia la secrezione di insulina e glucagone sia la sintesi dell'ormone della crescita ipofisario);
- cellule PP (circa 1%) che secernono il peptide pancreatico (ormone che regola la secrezione esocrina del pancreas).



### Struttura dell'insulina

L'insulina è formata da due catene polipeptidiche (catena A e catena B), legate da due ponti disolfuro; un ulteriore ponte disolfuro si forma all'interno della catena A. La catena A è formata da 21 aminoacidi, la B da 30 aminoacidi.

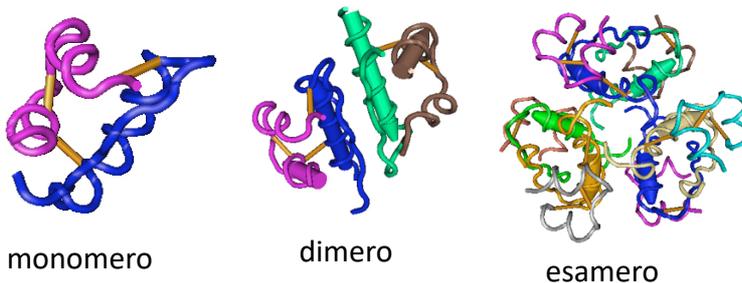
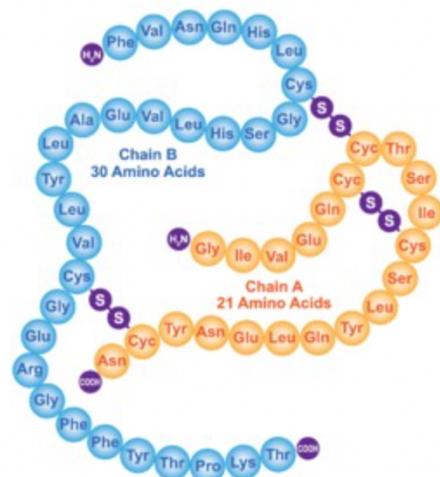
L'insulina viene inizialmente sintetizzata in una forma detta "preproinsulina", un polipeptide di 110 aminoacidi, in cui vi sono sequenze in più:

- una sequenza "pre" aminoterminale (peptide-segnale; 24 aa), che consente la secrezione della proteina;
- una sequenza centrale "pro" (peptide C; 35 aa) che determina il corretto ripiegamento del filamento polipeptidico.

Dopo la traduzione della preproinsulina nel reticolo endoplasmatico, un enzima taglia i 24 aminoacidi aminoterminali, lasciando la proinsulina, che si piega consentendo la formazione dei ponti disolfuro tra residui di cisteina. Quindi passa nelle vescicole dell'apparato di Golgi, dove il peptide C viene rimosso, formando così insulina matura, che viene immagazzinata.

Per quanto riguarda la struttura secondaria, nella catena A si formano due sezioni ad alfa elica, che delimitano una parte centrale a "nastro piatto"; la catena B presenta una sezione maggiore ad alfa elica e si piega a gomito, "avvolgendo" la catena A. La struttura terziaria, come già detto, è stabilizzata da ponti disolfuro. La parte esterna della molecola è principalmente polare, quella interna è per lo più apolare. Per quel che concerne la struttura quaternaria, l'insulina in soluzione tende a formare dimeri, per l'instaurarsi di ponti idrogeno tra le estremità C-terminali della catena B. In presenza di ioni zinco può formare esameri, ossia gruppi di sei molecole; ne risulta una forma toroidale ("a ciambella") con la quale l'insulina è immagazzinata nelle cellule  $\beta$  e secreta nel flusso sanguigno. In ogni caso la forma attiva è formata da un singolo monomero.

## Human Insulin Structure

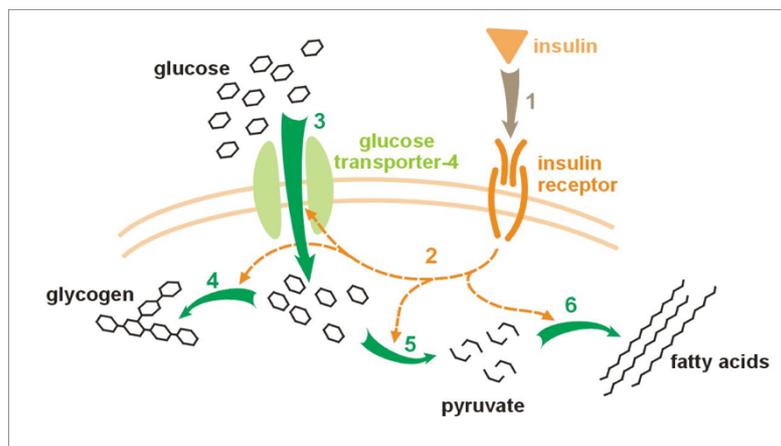


### Azione dell'insulina

L'insulina agisce, direttamente o indirettamente, su gran parte dei tessuti corporei. I suoi effetti possono essere così riassunti:

- aumenta la captazione del glucosio nelle cellule stimolandone la diffusione facilitata: aumentano così le reazioni a cui il glucosio prende parte, quali la glicolisi, la sintesi di grasso e di glicogeno;
- aumenta la sintesi di glicogeno, non solo aumentando la diffusione facilitata del glucosio nelle cellule, ma anche stimolando l'attività dell'enzima che ne catalizza la formazione;
- aumenta la sintesi di acidi grassi e la formazione di trigliceridi, in quanto stimola le cellule del tessuto adiposo ad assumere i lipidi presenti nel sangue e inibisce l'attività dell'enzima che catalizza la demolizione dei trigliceridi;

- promuove il trasporto attivo di aminoacidi nelle cellule, soprattutto muscolari: aumenta così la concentrazione dei metaboliti per la sintesi proteica e quindi la sintesi stessa; inoltre riduce la proteolisi;
- stimola gli enzimi coinvolti nell'utilizzo del glucosio e inibisce quelli coinvolti nella sua sintesi (diminuzione della gluconeogenesi);
- stimola l'assunzione di potassio da parte delle cellule;
- favorisce il rilassamento delle pareti muscolari delle arterie, aumentando così il flusso sanguigno, specialmente in quelle di calibro minore.



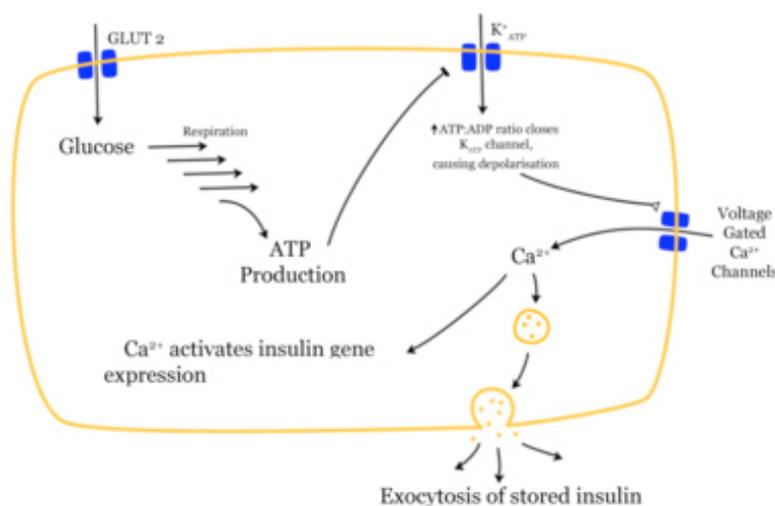
**Nota:** in figura il trasportatore del glucosio è indicato come Glucose Transporter 4 (o GLUT4): si tratta della proteina che si trova nelle membrane cellulari dei tessuti adiposo e muscolare striato (cardiaco e scheletrico). In assenza di insulina esso è immagazzinato all'interno della cellula; il legame insulina-recettore induce la distribuzione del GLUT4 nella membrana, dove consente la diffusione facilitata del glucosio.

Il tessuto muscolare e quello adiposo sono quelli maggiormente influenzati dall'insulina per quanto riguarda la captazione del glucosio (essi in media rappresentano i due terzi di tutte le cellule del corpo umano). Da notare che l'insulina, pur giocando un ruolo primario nel metabolismo del glucosio, non modifica l'assorbimento di questo zucchero nelle cellule dell'encefalo né il suo trasporto attivo nel tubulo renale e nell'epitelio gastrointestinale.

### Regolazione della produzione di insulina

La secrezione di insulina è principalmente regolata dalla concentrazione di glucosio nel sangue che irrori il pancreas, le cellule  $\beta$  in particolare, secondo un meccanismo di feedback negativo. Un aumento di glucosio stimola la secrezione dell'ormone, che provoca un maggiore ingresso di glucosio nelle cellule con conseguente diminuzione della concentrazione nel plasma; la diminuzione del glucosio inibisce ulteriore secrezione di insulina.

Il meccanismo specifico attraverso il quale si ha secrezione di insulina non è completamente chiaro, ma se ne conoscono alcune caratteristiche, che portano al seguente modello: il glucosio entra nelle cellule  $\beta$  del pancreas mediato da uno specifico trasportatore, GLUT2 (presente solo nelle membrane di queste cellule, di quelle epatiche, dell'ipotalamo, dell'intestino tenue e del tubulo renale). Lo zucchero viene utilizzato per la glicolisi e la respirazione cellulare, con produzione di ATP; l'aumento dell'ATP determina la chiusura dei canali del potassio e conseguente depolarizzazione della membrana. In risposta si ha ingresso di ioni calcio e di seguito un ulteriore rilascio di questi nel citoplasma dal reticolo endoplasmatico. Tale aumento del livello del calcio si pensa sia il principale responsabile del rilascio dell'insulina accumulata nelle vescicole di secrezione dell'apparato di Golgi. Tuttavia, l'aumento del glucosio nelle cellule  $\beta$  sembra che attivi anche altre vie metaboliche non legate al calcio e che partecipano alla secrezione di insulina. Inoltre, stimola anche la trascrizione del gene per l'insulina e la successiva traduzione dell'mRNA.



Tuttavia, il glucosio non è l'unico fattore di controllo del rilascio di insulina (sebbene sia il più importante). L'ingestione di cibo in generale, non solo di natura glucidica, determina una maggiore secrezione, così come sono coinvolti anche un certo controllo nervoso (stimoli visivi e gustativi del cibo) e ormonale (ad esempio di ormoni gastrointestinali).

### L'insulina in altri animali

La sequenza di aminoacidi dell'insulina varia da specie a specie (a volte possono esserci aminoacidi aggiuntivi), tuttavia vi sono alcune parti altamente conservate, ad esempio la posizione dei tre ponti disolfuro, entrambe le estremità della catena A e l'estremità C-terminale della catena B. Ne consegue una struttura tridimensionale molto simile. L'insulina prodotta nei mammiferi è molto simile: ad esempio quella bovina differisce da quella umana solo per tre aminoacidi, mentre quella di maiale solo in uno! Persino all'interno dei vertebrati in generale ci sono strette somiglianze: in alcune specie di pesci l'insulina è abbastanza simile da essere efficace anche nell'uomo. Per quanto riguarda invece il peptide C della proinsulina, esso è assai diverso da specie a specie.

## IL DIABETE

L'incapacità dell'organismo a mantenere il glucosio del sangue al di sotto di un certo valore è detto diabete. Esistono vari tipi di "diabete" in medicina (la parola deriva dal greco e vuol dire "passare attraverso"):

- Il diabete mellito, il più frequente, si può originare perché manca del tutto l'insulina, ormone chiave per controllare il glucosio nel sangue o perché l'insulina non riesce ad agire come dovrebbe;
- il diabete insipido, dove manca l'ormone antidiuretico e si ha un'urinazione eccessiva;
- il diabete renale, dove per un difetto del tubulo renale si perde zucchero con le urine anche con la glicemia bassa.

Il diabete dove dalla nascita manca l'insulina è detto di tipo 1, quello dove almeno all'inizio l'insulina c'è, ma non agisce come dovrebbe, è detto di tipo 2. Quest'ultimo, spesso, si associa a sovrappeso e a colesterolo e pressione alti. Esiste infine un diabete transitorio che compare in gravidanza, dovuto a ormoni della placenta, detto. diabete gestazionale.

## ATTIVITÀ DI LABORATORIO

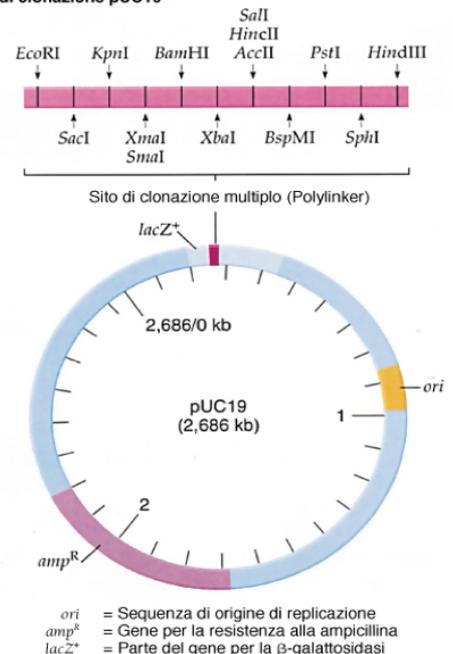
### Produzione di insulina ricombinante

Con la tecnologia del DNA ricombinante è possibile isolare un singolo gene o, più in generale, un frammento di DNA dal genoma di un organismo e produrne molte copie identiche (clonaggio molecolare).

### I plasmidi della serie pUC

Plasmidi oggi molto utilizzati come vettori di clonaggio sono i plasmidi rappresentati dalla cosiddetta serie pUC (p indica plasmide, UC sta per Università della California). I **plasmidi pUC** hanno dimensioni molto piccole e sono presenti nell'ospite batterico *E. coli* in un alto numero di copie, così da rendere agevole e facile la loro purificazione. I plasmidi pUC contengono, oltre ad un'origine di replicazione (*ori*), numerosi siti unici di restrizione riconosciuti dai più comuni enzimi di restrizione, inclusi nella regione del *polylinker*. I plasmidi pUC contengono anche il gene *amp* che, conferendo la resistenza all'antibiotico ampicillina, è utilizzato per selezionare le cellule di *E. coli* al cui interno, dopo trasformazione, è stato introdotto il plasmide. I plasmidi pUC contengono, inoltre, anche un'altra forma di selezione che permette di distinguere in modo facile e visivo (in base al colore bianco o blu delle colonie batteriche) le cellule di *E. coli* che sono state trasformate dal solo vettore (vettore non ricombinante) o dal vettore ricombinante che contiene il DNA esogeno.

Vettore di clonazione pUC19



### La miscela di ligazione

Per ottenere **plasmidi ricombinanti**, le molecole di inserto e di vettore vengono tagliate con lo stesso enzima di restrizione in modo che le estremità siano "compatibili". Una volta messe in provetta in presenza di un opportuno tampone, l'enzima **DNA ligasi** catalizza il legame covalente (legame fosfodiesterico) tra le due molecole di DNA.

Al termine della reazione di ligazione, nella provetta sono presenti diversi tipi di molecole:

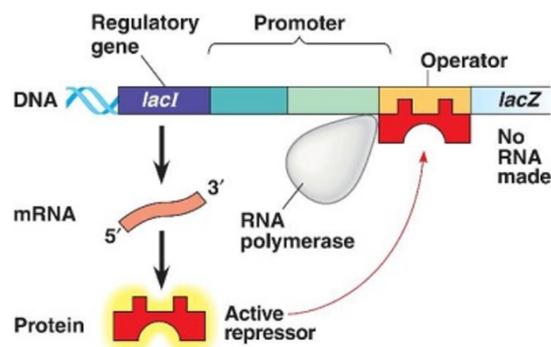
- molecole ricombinanti vere e proprie (vettore + inserto);
- molecole di vettore che si è richiuso su sé stesso senza aver incorporato l'inserto;
- molecole ricombinanti contenenti più di un inserto;
- molecole di solo inserto che non si sono inserite in un vettore;
- molecole di vettore che sono rimaste lineari, ecc.

Pertanto, quando si effettua un esperimento di trasformazione batterica con una miscela di ligazione, molecole diverse possono penetrare all'interno della cellule batteriche. Tra queste, solo le molecole di vettore con struttura circolare, siano esse ricombinanti (cioè con inserto di DNA esogeno) oppure non ricombinanti (cioè senza inserto), danno luogo alla formazione di trasformanti capaci di crescere in terreno selettivo (cioè con l'antibiotico, nel nostro caso ampicillina).

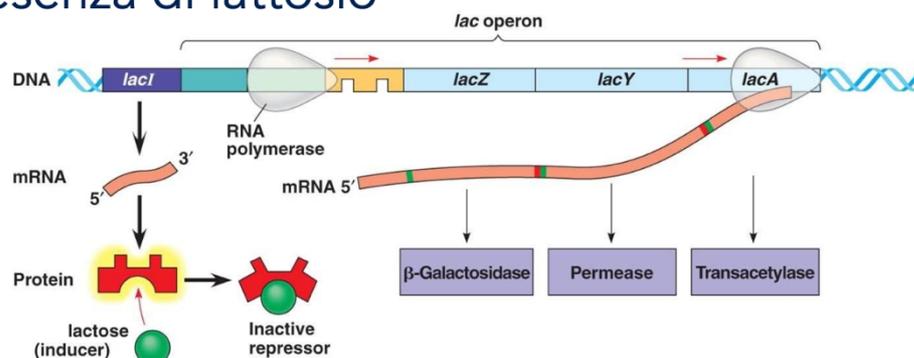
### Ricombinante o non ricombinante?

I plasmidi della serie pUC sono ampiamente utilizzati come vettori di clonaggio, in quanto consentono di distinguere facilmente le cellule batteriche che hanno acquisito il vettore con inserto (vettore ricombinante) da quelle che hanno acquisito il solo vettore (vettore non ricombinante). Questo si ottiene con un semplice test colorimetrico (bianco o blu), per comprendere il quale è, tuttavia, necessario conoscere la base teorica dell'**operone lattosio**.

### In assenza di lattosio



### In presenza di lattosio



In assenza di lattosio, una molecola chiamata repressore, prodotta da un gene regolatore, si lega in una regione a monte dei geni (operatore), impedendo la trascrizione. Quando è presente lattosio, esso si lega al repressore determinandone il distacco dall'operatore e consentendo la trascrizione dei geni:

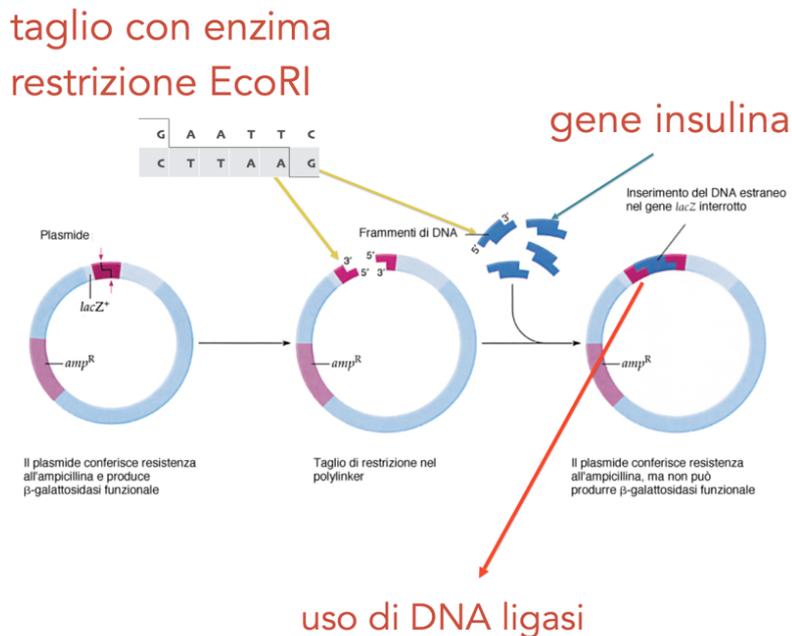
- la beta-galattosidasi, che codifica per l'enzima che idrolizza il legame beta-glicosidico del lattosio convertendolo nei due monomeri (glucosio e galattosio) che verranno utilizzati dal batterio;
- la beta-galattoside permeasi, che codifica per una proteina di membrana che favorisce

l'introduzione del lattosio all'interno della cellula mediante trasporto attivo;

- la tiogalattoside transacetilasi, che codifica per un enzima che libera la cellula dai tiogalattosidi tossici importati insieme al lattosio.

I tre geni che codificano questi tre enzimi sono chiamati, rispettivamente, *lacZ*, *lacY* e *lacA*.

La  $\beta$ -galattosidasi è un enzima molto particolare che si può dividere in due frammenti proteici (detti peptidi  $\alpha$  e  $\omega$ ). Il mantenimento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -galattosidasi anche quando è divisa in due frammenti deriva dalla complementazione reciproca dei due peptidi e si chiama  $\alpha$ -complementazione.



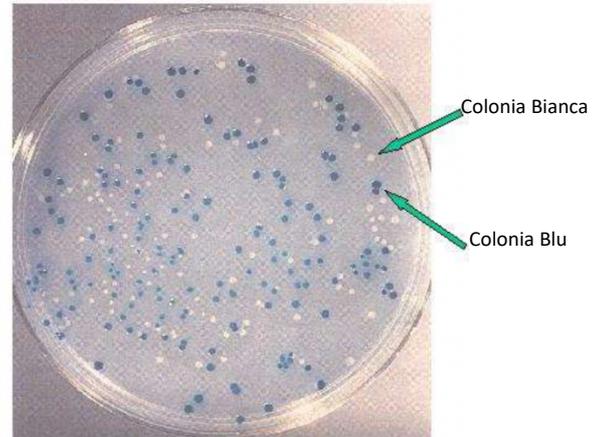
Nei sistemi di clonaggio molecolare che si basano sulla selezione blu/bianco il gene della  $\beta$ -galattosidasi è infatti spezzato in due parti, una che sintetizza il peptide  $\alpha$ , l'altra che sintetizza il peptide  $\omega$ ; tipicamente il gene del peptide  $\alpha$  è portato dal plasmide che si usa per clonare l'inserto di interesse, mentre il ceppo batterico ricevente porta il gene del peptide  $\omega$ .

Inattivando la funzione del peptide  $\alpha$  (cosa che avviene inserendo nel plasmide l'inserto) si perde l' $\alpha$  complementazione e di conseguenza si perde l'attività della  $\beta$ -galattosidasi

Il vettore pUC contiene la parte  $\alpha$  del gene *lacZ*, chiamata *lacZ*<sup>+</sup> che codifica per la parte  $\alpha$  della beta-galattosidasi; la parte  $\omega$  del gene della beta galattosidasi è mantenuta del cromosoma batterico. All'interno di *lacZ*<sup>+</sup> è presente il *polylinker*, in corrispondenza del quale, come abbiamo detto, avviene l'inserimento di DNA esogeno.

## Vettore non ricombinante vs Vettore ricombinante: colonie blu o colonie bianche

Se una cellula batterica viene trasformata dal solo plasmide pUC (cioè dal vettore non ricombinante), in presenza di un induttore artificiale come l'IPTG (isopropil-tiogalattoside), che è un analogo del lattosio, e di un substrato cromogeno della beta-galattosidasi, come l'X-gal (5- bromo-4-cloro-3-indolil-beta- galattoside), la beta-galattosidasi scinde l'X-gal in un prodotto colorato precursore dell'indaco. Le colonie batteriche, quindi, assumeranno un colore blu.



Se nel gene *lacZ* del plasmide vettore è stato inserito del DNA estraneo, e quindi il vettore è diventato un **vettore ricombinante**, le cellule batteriche trasformate non producono più una beta- galattosidasi attiva. Pertanto, in presenza di IPTG (l'induttore artificiale dell'operone *lac*) e di X-gal, quest'ultimo in mancanza dell'enzima beta-galattosidasi non può essere più trasformato nel precursore dell'indaco. Le colonie batteriche, quindi, trasformate con un vettore ricombinante, saranno bianche.

## Il gene è inserito in modo corretto?

Nei vettori ricombinanti ci sono diverse possibilità di interazione tra plasmide e DNA esogeno se entrambi sono stati tagliati con lo stesso enzima di restrizione; le estremità appiccicose al 5' e al 3' sono le stesse per cui:

- a) il DNA esogeno si è integrato nel plasmide ma nella direzione sbagliata;
- b) il DNA esogeno si è integrato nel plasmide nella giusta direzione.

È necessario selezionare il caso in cui il DNA esogeno si è inserito correttamente: solo in questo caso, infatti, sarà possibile ottenere la proteina funzionale.

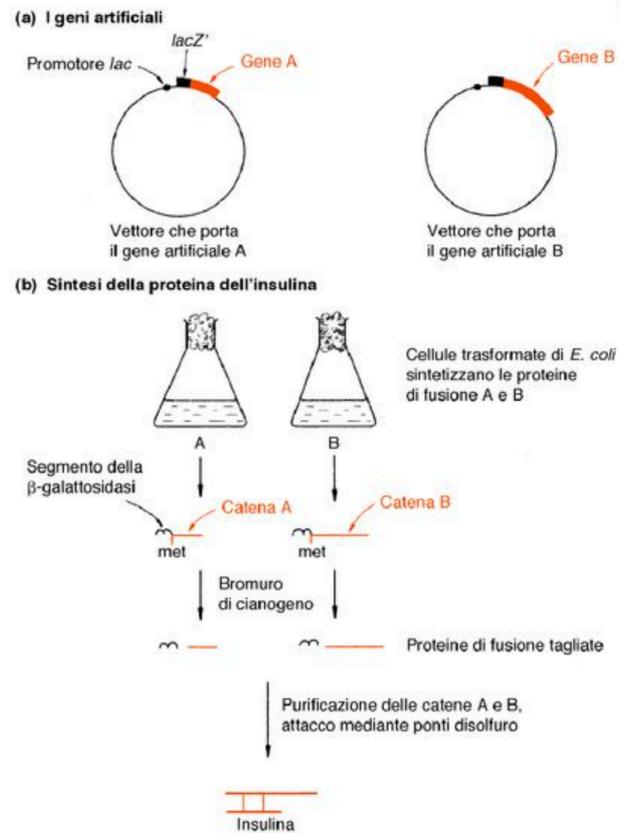
Occorre quindi procedere con:

1. estrazione del DNA plasmidico
2. analisi di tale DNA mediante taglio con un altro enzima di restrizione, diverso da quello usato per l'inserimento del gene.

Poiché le cellule batteriche bianche sono state trasformate dal vettore ricombinante, bisogna estrarre da queste il DNA plasmidico. Mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione è possibile verificare che il DNA esogeno sia inserito con la giusta orientazione in base alla dimensione dei prodotti della digestione, solo nel caso in cui l'enzima origini frammenti di lunghezza diversa. L'analisi dei prodotti di digestione va fatta con un'elettroforesi su gel di agarosio.

## Storia della produzione di insulina ricombinante

Negli anni '70 è stata prodotta insulina umana, inserendo in un vettore di clonaggio a livello del gene Lacz, il DNA della catena A dell'insulina e poi trasformando un ceppo di *Escherichia coli*, e il DNA della catena B in un altro vettore per trasformare un altro ceppo (i due filamenti di DNA da inserire nel vettore/plasmide venivano sintetizzati sulla base della sequenza aminoacidica delle due catene A e B dell'insulina umana e con la DNA polimerasi si sintetizzava il filamento complementare da inserire nei plasmidi). I batteri trasformati con questi plasmidi ricombinanti crescevano e la proteina di fusione veniva raccolta e purificata. Le catene insuliniche venivano separate dalla  $\beta$ -galattosidasi attraverso un trattamento con bromuro di cianogeno, un prodotto chimico che taglia i legami peptidici successivi ai residui di metionina. Alla fine le due catene proteiche venivano mescolate ed in condizioni opportune si formavano i ponti disolfuro, rendendo possibile la sintesi di insulina umana funzionale dai batteri. Questo fu il primo metodo di produzione di insulina utilizzato dalla Genentech in collaborazione con la Eli Lilly and Company.



### Metodo della proinsulina

La strategia delle due catene è stata modificata in seguito (1986) con la produzione di un'unica proteina di fusione  $\beta$ -galattosidasi-insulina, che può essere tagliata in una sola tappa per rilasciare insulina matura. Questa tecnica consiste nel sintetizzare il cDNA della proinsulina a partire dall'mRNA, modificandone la sequenza con l'aggiunta di un codone all'estremità 5' che codifica per la metionina. Il cDNA modificato viene quindi inserito in un gene plasmidico (come LacZ, utilizzato anche nel metodo precedente) e amplificato nei batteri. La proinsulina prodotta dai batteri viene poi separata dall'enzima  $\beta$ -galattosidasi degradando il residuo di metionina. La catena di insulina viene quindi indotta al processo di ripiegamento che consente la formazione dei ponti disolfuro e il peptide C viene rimosso attraverso un taglio enzimatico che dà origine alla proteina matura.

### Insulina dal lievito

Gli scienziati pensarono di fare in modo che l'insulina fosse secreta direttamente nel mezzo di coltura e decisero di utilizzare i lieviti piuttosto che i batteri.

Il lievito è un eucariote, un organismo munito di nucleo, in grado quindi di effettuare i vari passaggi che permettono la maturazione dell'insulina umana. La sequenza della proinsulina viene inserita in un plasmide, ed il plasmide ricombinante trasformato nei lieviti. I lieviti possono a questo punto

produrre proinsulina, la quale viene processata nel lievito analogamente a quanto succede nell'uomo.

La Novo Nordisk S/A è stata la prima azienda ad ottenere insulina secreta dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Attualmente esistono diverse categorie di insulina: ultrarapida, rapida, lenta. Esse si differenziano non per il principio attivo, che è lo stesso per tutte ed è rappresentato dall'insulina umana, ma per la velocità di assorbimento.

## LE TECNICHE USATE IN LABORATORIO

### Trasformazione batterica

Una delle tappe della procedura di clonaggio molecolare consiste nell'effettuare una trasformazione batterica: bisogna far entrare all'interno delle cellule batteriche uno dei prodotti della miscela di ligazione (miscela in cui il vettore e l'inserito da clonare sono stati mischiati in presenza dell'enzima DNA ligasi). Per effettuare la trasformazione batterica, è necessario che le cellule di *E. coli* siano state rese competenti con  $\text{CaCl}_2$ . Come verifica della competenza delle cellule (è il cosiddetto **controllo positivo** dell'esperimento), verrà effettuato anche un esperimento di trasformazione batterica con quantità note di vettore (pUC19). Questo permette anche di calcolare l'**efficienza di trasformazione** nell'esperimento.

### Prodotti di digestione enzimatica dei plasmidi ricombinanti

Per verificare che le cellule batteriche rese competenti che si usano in questo esperimento siano ampicillina-sensibili (cioè per verificare che la eventuale crescita delle cellule in terreno con l'antibiotico, dopo la trasformazione, sia dovuta all'acquisizione del vettore di clonaggio e non sia una caratteristica preesistente della popolazione batterica), verrà effettuata anche una trasformazione in cui le cellule vengono messe a contatto non con il DNA, ma con acqua, ossia il diluente in cui è risospeso il DNA (è il cosiddetto **controllo negativo** dell'esperimento).

### "Miniprep" di DNA plasmidico da cellule di *E. Coli*

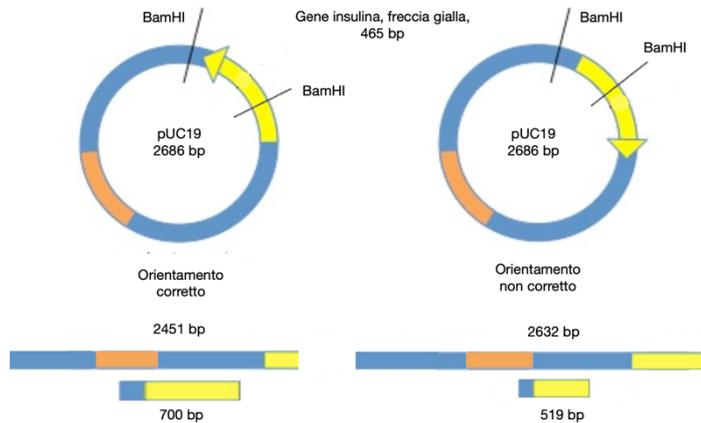
In ogni esperimento di clonaggio è necessario estrarre il DNA plasmidico dalle cellule trasformate ed analizzarlo mediante elettroforesi per verificare la presenza di DNA esogeno nel vettore plasmidico.

Si utilizzerà una procedura rapida di estrazione di DNA plasmidico (genericamente chiamata mini-preparazione o **miniprep** di DNA plasmidico) che permette di valutare il risultato di un esperimento di clonaggio in tempi molto brevi (poche ore, vedi protocollo sperimentale). Il DNA che si ottiene è solo parzialmente purificato ma, per la maggior parte degli scopi, ciò non costituisce un problema. Oltre a proteine, lipidi e zuccheri, vi sono le molecole di RNA. Le molecole di RNA, essendo piccole, hanno una mobilità elettroforetica maggiore del DNA plasmidico (cioè in un gel di agarosio "corrono" di più). Esse sono quindi visibili nella parte bassa del gel. Nella routine dei laboratori di ricerca, ad una miniprep di DNA plasmidico, prima della corsa elettroforetica, viene aggiunto l'enzima RNAsi che degrada specificamente le molecole di RNA, che quindi non risultano più visibili su gel.

## Digestione con un enzima di restrizione

Dopo aver isolato il DNA plasmidico mediante una “miniprep”, dobbiamo analizzare questo DNA tramite utilizzo enzimi di restrizione specifici, per verificare la presenza dell’inserto di DNA.

A questo scopo, è necessario digerire il DNA con un enzima di restrizione (chiamato *Bam*HI) che darà origine a frammenti di lunghezza diversa, a seconda dell’orientamento dell’inserto nel plasmide.



## Elettroforesi del DNA

L’**elettroforesi** è una tecnica che consente di **separare** e **visualizzare** molecole di DNA di diverse dimensioni e struttura. Il DNA si visualizza grazie ad un intercalante che “illumina” letteralmente il DNA se osservato con luce ultravioletta.

Il DNA è carico negativamente, per cui le molecole di DNA che vengono fatte migrare su un gel in presenza di un **campo elettrico** (elettroforesi) migreranno verso il polo positivo. Il gel è costituito da agarosio e può essere immaginato come una rete tridimensionale attraverso le cui maglie migrano le molecole sotto l’azione di un campo elettrico generato da un **alimentatore** (*power supply*). La **velocità di migrazione** di molecole di DNA lineari dipende dal peso molecolare e, quindi, dalle loro dimensioni. Tanto più piccola è la molecola e tanto più questa migra velocemente.