

*Trasferimento genico e  
Trasformazione Batterica:  
Gli esperimenti di  
Fred Griffith ed Oswald  
Avery*

# Trasferimento genico nei batteri

**I batteri sono organismi unicellulari procarioti.**

- 1. Possono trasferire DNA plasmidiale da una cellula all'altra.**

**Il trasferimento è sempre unidirezionale e parziale**

**(CONIUGAZIONE).**

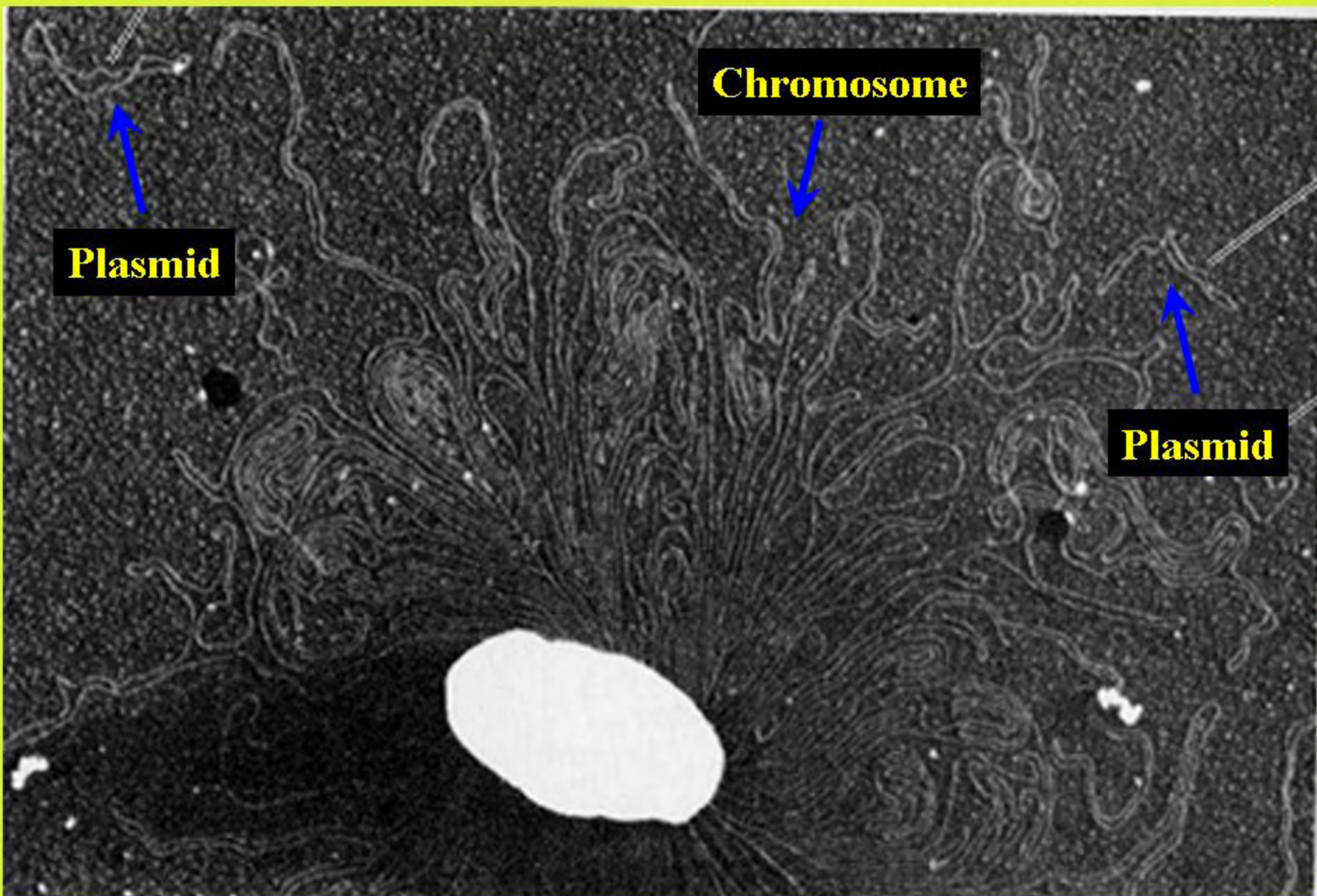
- 2. Possono essere infettati da virus detti *batteriofagi* che inseriscono il proprio DNA ed esprimono i propri geni nella**

**cellula batterica (TRASDUZIONE).**

- 3. Possono assorbire DNA libero dall'ambiente esterno (raro in natura) ed in certe condizioni assumere i caratteri genetici da**

**esso codificati. (TRASFORMAZIONE).**

# DNA da una cellula di E. coli

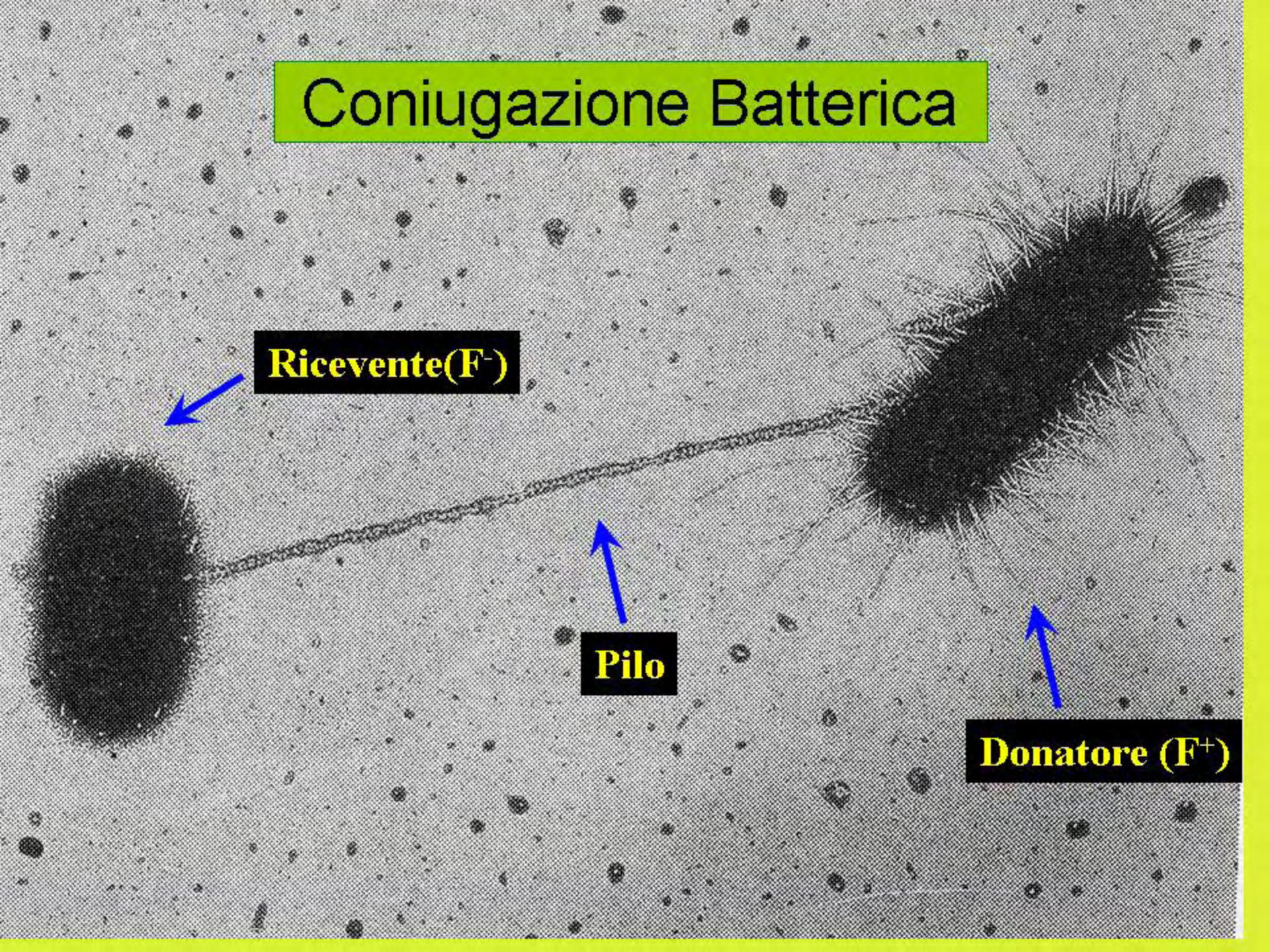


# Coniugazione Batterica

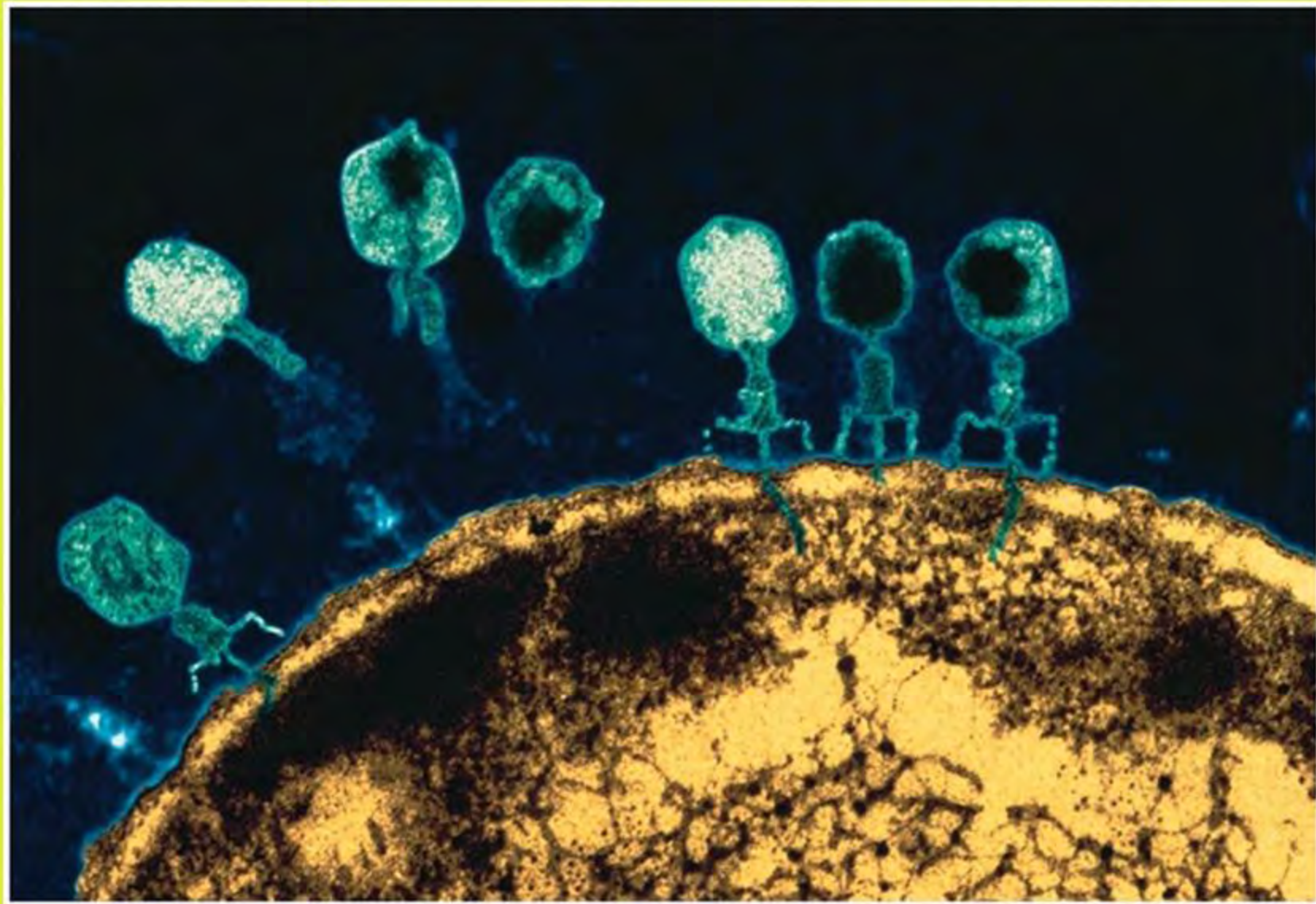
**Ricevente(F<sup>-</sup>)**

**Pilo**

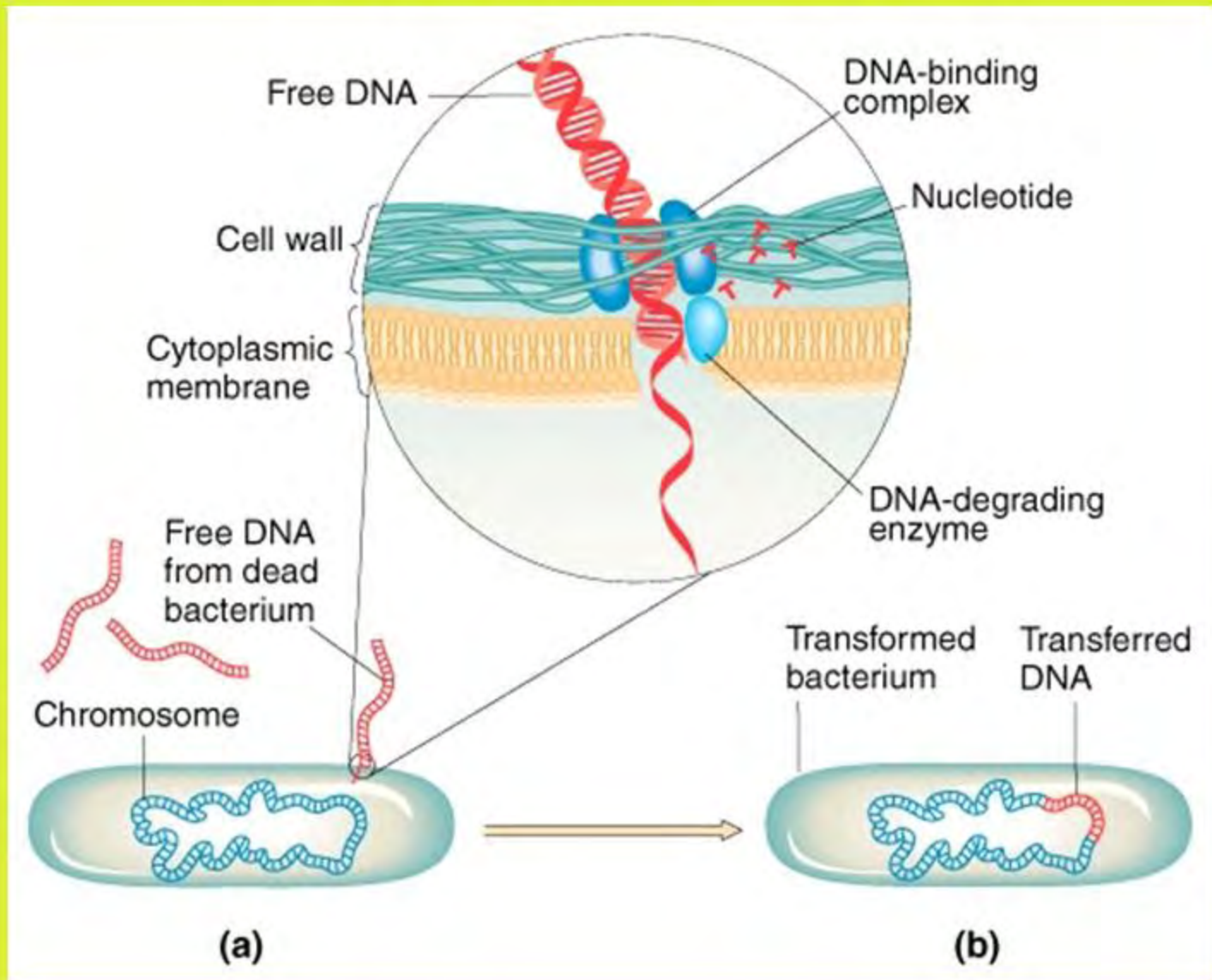
**Donatore (F<sup>+</sup>)**



# Batteriofagi adesi ad una cellula batterica

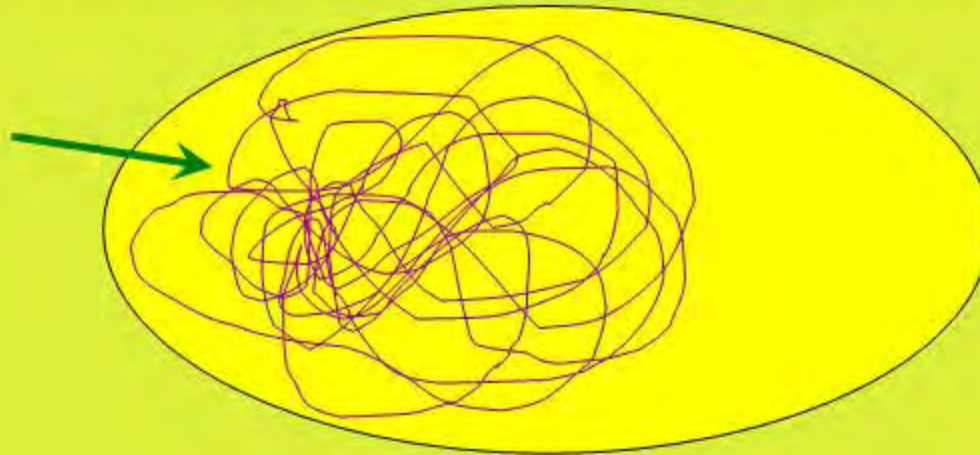


# Trasformazione Batterica

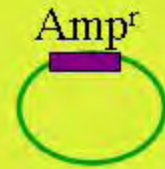


# Trasformazione batterica con un plasmide

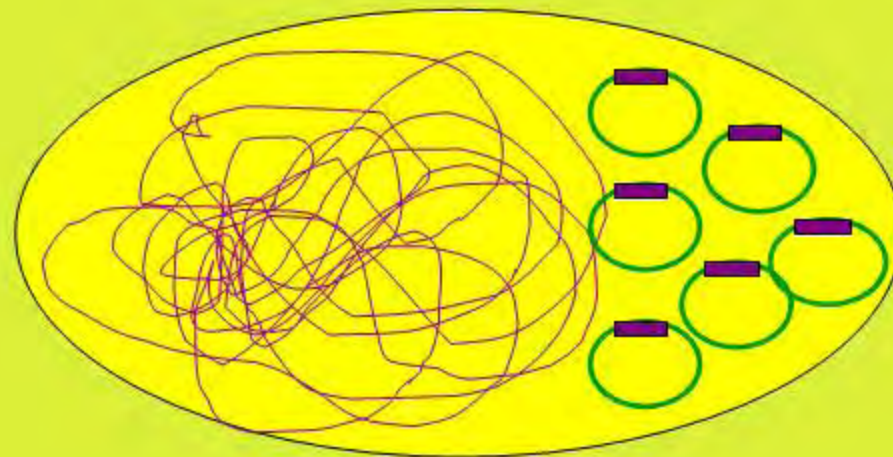
**cromosoma**



**Cellula di  
*E. Coli*  
Amp<sup>s</sup>**

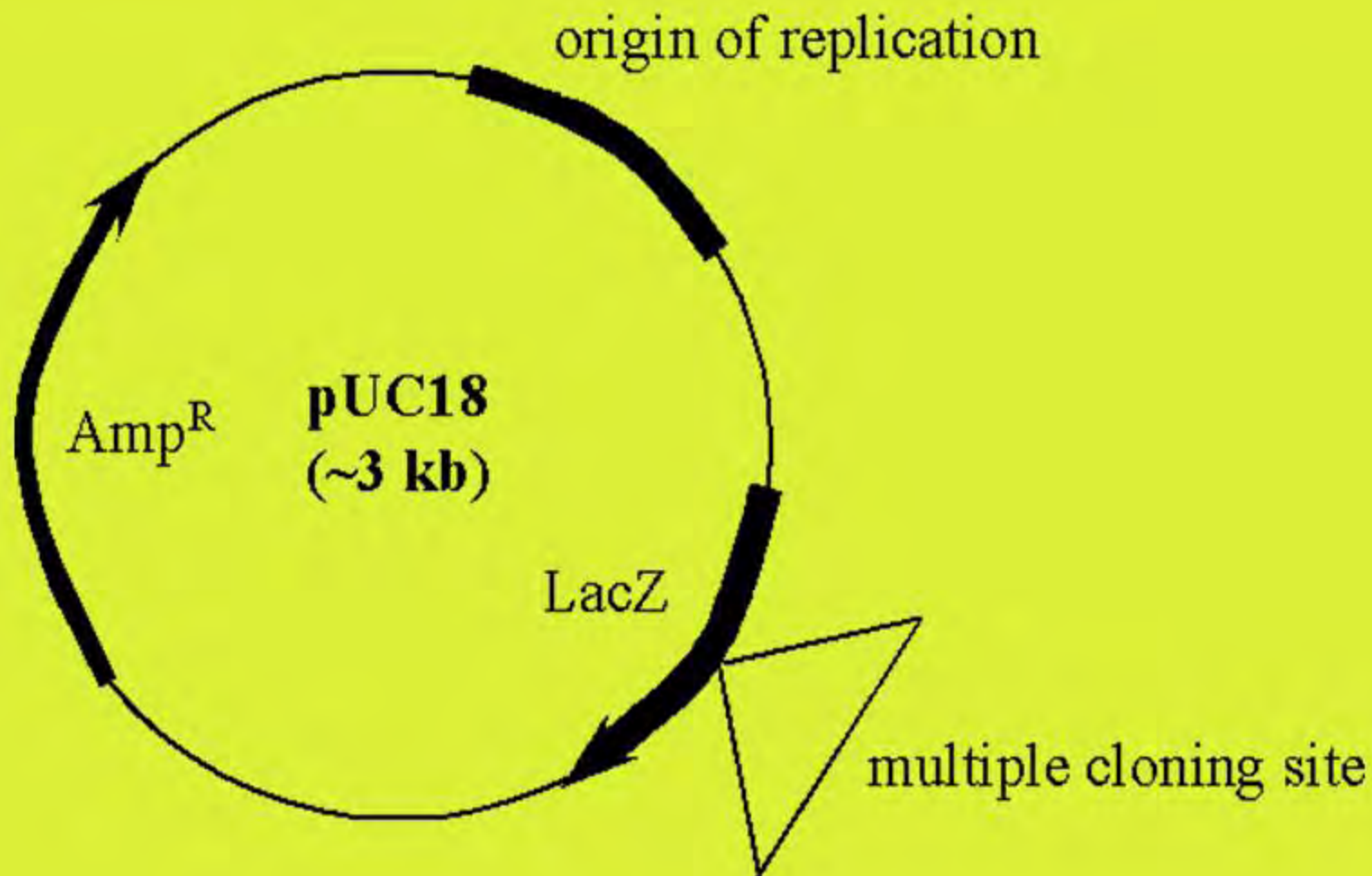


**Plasmide Amp<sup>r</sup>**



**Cellula di *E. Coli*  
Amp<sup>r</sup> + plasmide**

Un esempio di plasmide ingegnerizzato per essere utilizzato come vettore di clonaggio genico



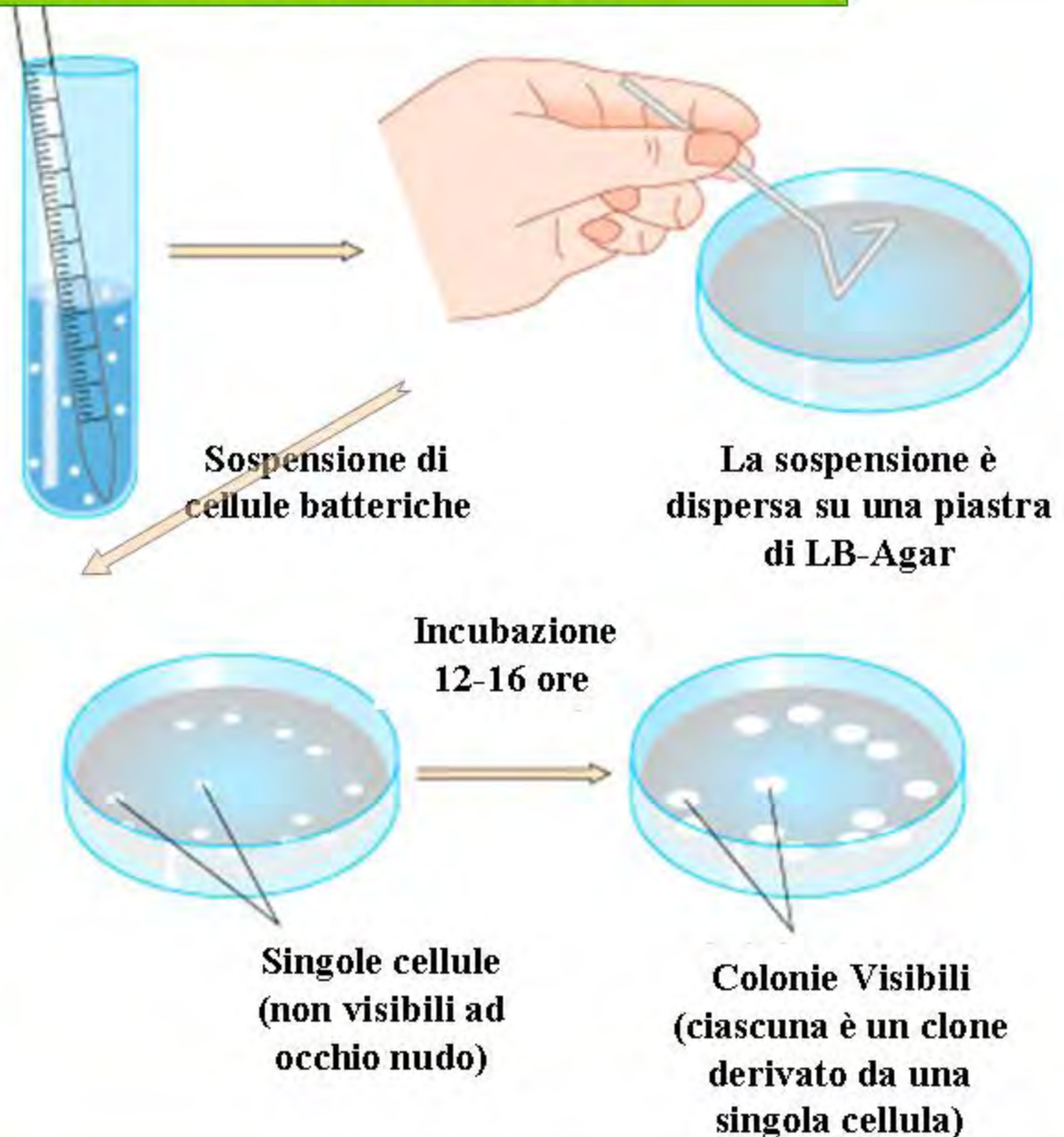


# Coltura dei Batteri

Il modello più utilizzato per la genetica batterica è *Escherichia coli*.

I batteri possono essere coltivati su uno strato di terreno semisolido nel quale si origina una colonia per ogni cellula vitale che si moltiplica.

La colonia costituisce un clone dal punto di vista genetico



# Schema dell'esperimento

## Giorno 1

- Preparazione delle piastre di coltura:
- 3x LB agar+ Mg e
- 3x LB agar+ Mg + ampicillina
- Inoculo di E.coli in LB agar +Mg, incubazione a 37° per 12-16 ore

# Schema dell'esperimento

## Giorno 2

- Risospensione di un colonia in 100µl di transformation buffer (soluzione di  $\text{CaCl}_2$  o simili).
- Aggiunta di 50µl di sospensione ad una provetta con 1µl di DNA plasmidiale
- Incubazione di 30' in ghiaccio
- Dispersione della sospensione batterica con e senza DNA su terreno con e senza ampicillina.
- Dispersione della stessa quantità di trasformazione buffer sterile su piastre con e senza Ampicillina
- Incubazione a 37° per 12-16 ore

# Materiale Necessario

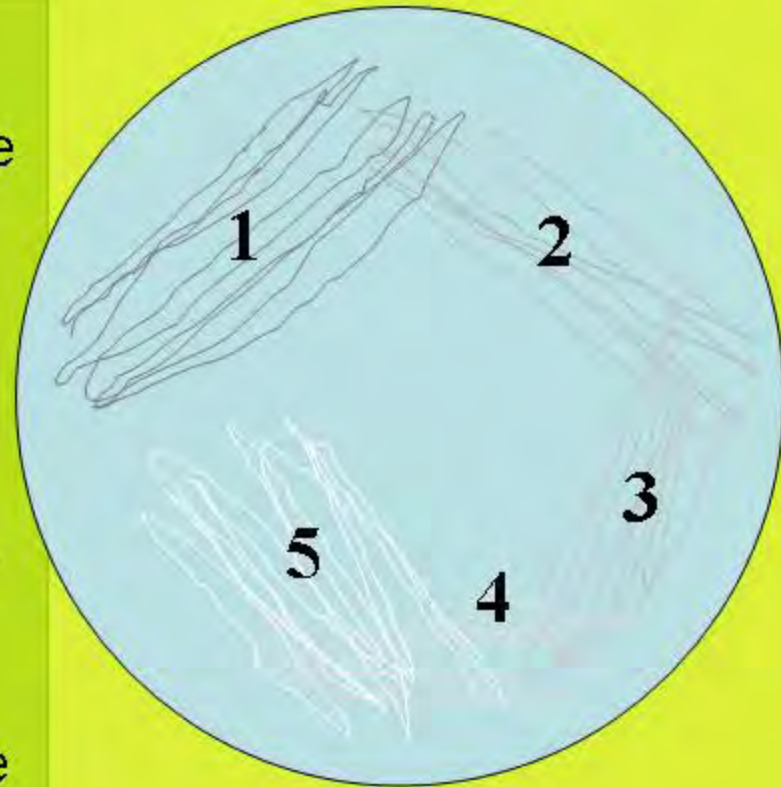
- Terreno LB-Agar +  $MgCl_2$
- Soluzione di Ampicillina sterile  $50\mu g/\mu l$
- Transformation Buffer
- Coltura di E.coli DH5, XL10, JM109 o simili (congelata in glicerolo 10%)
- Provette da 1,5 – 2,0 ml
- Ansa da batteriologia
- Spatole da batteriologia
- Scatole di petri
- Provette sterili da 20 – 50 ml
- Vaschette con acqua e ghiaccio. Tavolette di polistirolo espanso da utilizzare come portaprovette galleggianti
- Soluzione di plasmide ( $100-200\text{ ng}/\mu l$ ) recante la resistenza all'ampicillina (ed eventualmente altri geni) Ad esempio: pQE-GFP
  
- Forno a microonde o piastra riscaldata o bruciatore bunsen
- Incubatore a  $37^\circ$

# Trasformazione Giorno 1

- Contrassegnare le piastre di petri rispettivamente con le sigle *LB* e *LB-Amp*
- Riscaldare il terreno fino a fusione completa dell'agar. Raffreddare a 50° circa (in una vaschetta con acqua calda)
- Trasferire sterilmente 40 ml di terreno in una provetta da 50 ml ed aggiungere 40 µl di ampicillina (= una goccia con una pipetta pasteur sterile)
- Mescolare e distribuire nelle tre piastre contrassegnate *LB-Amp*
- Distribuire 10-12 ml di terreno LB senza ampicillina nelle quattro piastre contrassegnate *LB*

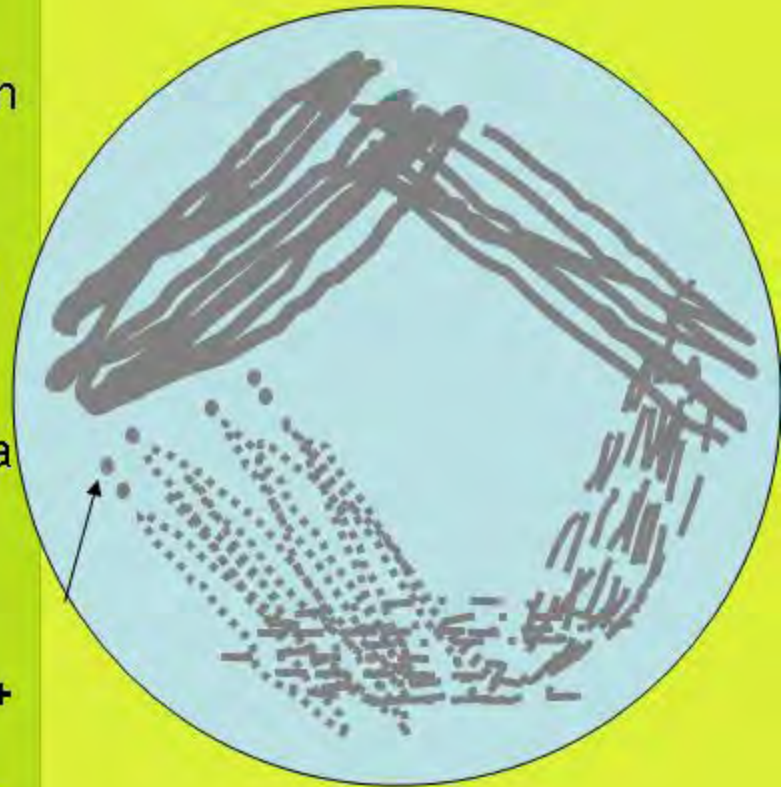
# Trasformazione Giorno 1

- Con un'ansa sterile grattare la superficie della coltura batterica congelata e distribuirla sulla superficie di una piastra **LB** tracciando il lato di un ipotetico pentagono.
- Con un movimento successivo, riprendere lo strisciamento a partire dal termine del lato precedente per tracciare gli altri lati del poligono
- Incubare la piastra inoculata a 37-40° per 12/16 ore
- Conservare le altre piastre chiuse a temperatura ambiente per 24 – 48 ore



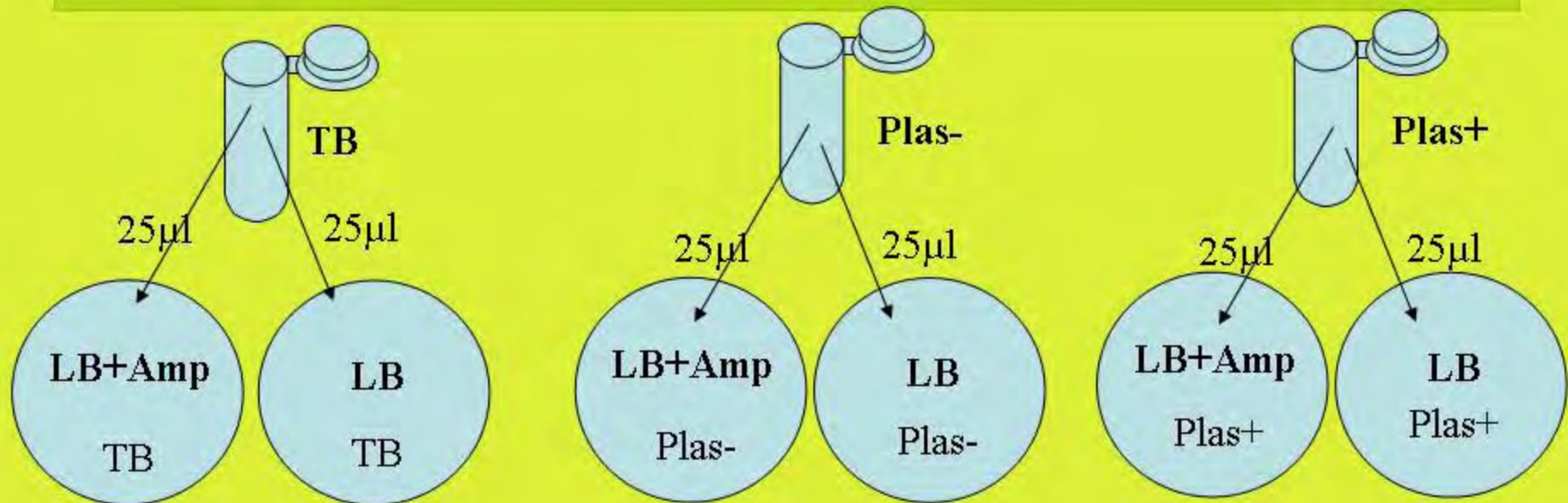
# Trasformazione Giorno 2

- Contrassegnare tre provette da 2ml : **TB**; **Plas+**; **Plas-**
- Trasferire sterilmente 100  $\mu$ l di transformation buffer nella provetta contrassegnata **TB** e 100 $\mu$ l nella provetta contrassegnata **Plas-**. Conservare le provette in una vaschetta con acqua e ghiaccio
- Con un'ansa sterile, prelevare una colonia distinta dalla superficie della piastra inoculata il giorno precedente e risospenderla accuratamente nel contenuto della provetta contrassegnata **Plas-**
- Mettere 1  $\mu$ l di plasmide nella provetta **Plas+** ed aggiungere 50  $\mu$ l della sospensione preparata in **Plas-**. *Mescolare delicatamente*
- Incubare le tre provette in ghiaccio per 30'



# Trasformazione Giorno 2

- Contrassegnare le tre piastre **LB** con le sigle riportate sulle provette e tre **LB-Amp** allo stesso modo.
- Trasferire 25 $\mu$ l del contenuto di ciascuno dei tre tubi nelle piastre corrispondenti e distribuirlo con un'ansa sterile o una spatola sterile
- Incubare le piastre a 37° per 12/16 ore



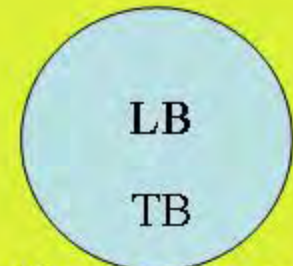


# Trasformazione Giorno 3

- Al termine dell'incubazione osservare le piastre e prendere nota di quanto si osserva.
- Se l'esperimento è riuscito potremo osservare un risultato simile a quello schematizzato qui a fianco



**Nessuna Crescita**



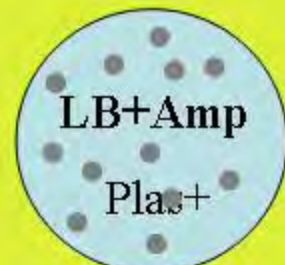
**Nessuna Crescita**



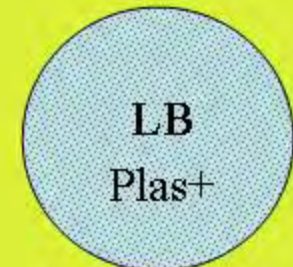
**Nessuna Crescita**



**Crescita Diffusa**



**Crescita di colonie Distinte**



**Crescita Diffusa**