

Il **clonaggio** è una tecnica molto versatile e impiegata da molti anni in [biologia molecolare](#), permette di ottenere copie identiche di un frammento di DNA. In questo articolo ne sono indicate le peculiarità e le applicazioni.

### Cos'è il clonaggio?

Il clonaggio è una tecnica che permette di produrre copie identiche di un frammento di DNA utilizzando un vettore. Il frammento di [DNA](#) scelto, di qualsiasi fonte essa sia, si può inserire mediante diverse tecniche all'interno di un vettore. Un vettore è una molecola di DNA in grado di “trasportare” il DNA, allo scopo di duplicarlo, in quanto la molecola da sola non è in grado di replicarsi autonomamente. Il vettore, inserito in un ospite, sarà copiato utilizzando il sistema duplicativo dell'ospite stesso; così sarà effettuata una riproduzione fedele del DNA di interesse. La molecola che si ottiene dall'unione del vettore con il frammento di DNA viene chiamata DNA ricombinante.

### Vettori di clonaggio

Affinché possa essere utilizzato per il clonaggio, un vettore deve avere:

- capacità di replicazione autonoma (quindi un sito di origine di replicazione);
- una caratteristica che lo renda selezionabile (ad esempio, un gene che conferisce la resistenza ad un antibiotico);
- un sito in cui sia possibile introdurre il gene da duplicare (molti vettori possiedono ad esempio un sito unico riconosciuto da endonucleasi di restrizione).

### I plasmidi

I vettori senz'altro più comuni, e anche quelli più versatili, sono i [plasmidi](#). Un plasmide è una molecola di DNA a doppio filamento circolare e si distingue dal DNA cromosomale, per cui si chiama DNA extracromosomale.

Le dimensioni del plasmide variano da poche paia di basi a più di 100 kilobasi, ma quelli solitamente utilizzati per il clonaggio vanno da 2 a 5 kilobasi. Il plasmide si duplica prima della divisione cellulare, esattamente come il DNA cromosomale. In una cellula batterica si possono trovare fino a 100 plasmidi.

Un plasmide può essere trasferito da un batterio all'altro attraverso un processo chiamato coniugazione: tra due batteri si stabilisce un contatto attraverso un pilo coniugativo, ovvero una struttura che funge da ponte tra i due batteri, e che permette il passaggio di uno dei due filamenti; il secondo filamento verrà poi duplicato da ciascun batterio.

Il gene di interesse si inserisce attraverso un processo di “taglia e cuci” molecolare: gli enzimi di restrizione riconoscono una sequenza, tagliano in quel punto, dove vi si inserirà il gene di interesse. Quindi, un plasmide da circolare diventerà lineare. Il frammento di DNA si inserisce nel plasmide e attraverso l'utilizzo della ligasi avviene il legame tra i due, e la molecola tornerà circolare.

- Leggi anche: [Genetica batterica: coniugazione, trasduzione e trasformazione](#)

### Vettori fagici

Altri vettori utilizzati sono quelli fagici; il fago introduce il proprio genoma all'interno di un batterio, attraverso un processo chiamato trasfezione.

Dopo la trasfezione, ci sono due vie possibili:

- ciclo litico
- ciclo lisogenico

Nel primo caso il fago duplica il proprio genoma e alla fine distrugge la cellula batterica. Nel secondo caso, il genoma del fago si integra in quello batterico ed entrambi vengono duplicati insieme; quando c'è l'induzione, il genoma fagico si separa spontaneamente da quello batterico, quindi il fago si “ricomponere” e passa al ciclo litico.

Allo scopo del clonaggio, il fago più utilizzato si chiama Fago  $\lambda$ . Per effettuare il clonaggio, si eliminano alcune zone del genoma fagico, che non ne alterano la duplicazione. Quindi è possibile inserire il gene di interesse, in un punto specifico.

### Cosmidi

I cosmidi sono invece una fusione tra un plasmide e parte del genoma fagico, e possono ospitare DNA di dimensioni tra le 30 e le 45 kb. Anche in questo caso il fago, in cui verrà inserito il genoma, attaccherà la cellula ospite batterica e vi inserirà il proprio genoma. La differenza però sta nel fatto che, essendo in parte plasmide, circolerà e si duplicherà autonomamente. Quindi, a differenza del processo di trasfezione fagica, non uscirà spontaneamente dalla cellula, e sarà necessario un processo di selezione simile a quello utilizzato per i plasmidi.

### Cromosomi artificiali

Quando però è necessario clonare frammenti di DNA di dimensioni più grandi si utilizzano i cromosomi artificiali. Ne esistono due tipi:

- **Cromosomi batterici artificiali (BAC):** possono contenere frammenti di DNA fino a 300000 bp; il DNA estraneo si inserisce con metodo classico, sfruttando il sito multiplo di clonaggio. L'ospite sarà rappresentato dal batterio.
- **Cromosomi artificiali di lievito (YAC):** possono contenere frammenti di DNA fino a 2 milioni di bp. Il DNA genomico, per poter essere inserito, si digerisce con enzimi di restrizione, e poi i frammenti si separano tramite elettroforesi. I frammenti si selezionano e si miscelano con il vettore, che li integrerà. L'ospite in questo caso sarà il lievito.

### Le fasi del clonaggio

1. La prima fase consiste nell'ottenere il frammento di DNA; è possibile mediante PCR, oppure può essere una molecola di cDNA ottenuta con l'utilizzo della trascrittasi inversa. Agli inizi dell'impiego di questa tecnica, il frammento di DNA veniva tagliato ed inserito attraverso l'utilizzo di enzimi di restrizione.
2. Si procede con la scelta di un vettore in cui collocare il frammento di DNA, e si prepara l'inserzione.
3. Il vettore può essere inserito in cellule competenti (o rese tali), cioè adatte a ricevere DNA estraneo. Le cellule vengono messe in condizioni di duplicazione.
4. L'ultima fase consiste nella selezione: bisogna capire quali delle cellule ospiti hanno integrato il DNA di interesse. Questa fase si chiama screening.

**Attenzione:** I nostri PDF a volte non contengono tutto il materiale presente nell'articolo originale o potrebbero non essere aggiornati.

**Articolo completo:** <https://www.biopills.net/articoli/ripassiamo-aiuto-studio/biologia-molecolare/clonaggio-il-suo-utilizzo-in-biologia-molecolare/>