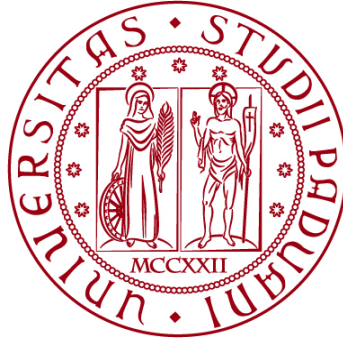


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

Corso di Laurea in Biotecnologie



**ELABORATO DI LAUREA**

**Progettazione e costruzione di un plasmide  
d'espressione dell'enzima eterologo DeHa2 in *E. coli* per  
la biodegradazione dei composti per- e  
polifluoroalchilici (PFAS)**

**Tutor: Prof.ssa Elisabetta Bergantino  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Alessandra Perdon**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## INDICE

<b>1. Abstract</b> .....	4
<b>2. Introduzione</b> .....	5
<b>2.1. PFAS: la storia</b> .....	5
<b>2.2. Il problema nel Veneto</b> .....	6
<b>2.3. Stato dell'arte per la degradazione</b> .....	7
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	9
<b>3.1. Piattaforma Benchling</b> .....	9
<b>3.2. Sequenze utilizzate per l'assemblaggio del costruito</b> .....	10
<b>3.3. Plasmide pJUMP29-1A sfLacZ</b> .....	12
<b>3.4. Ceppo DH5<math>\alpha</math> di <i>E. coli</i></b> .....	13
<b>3.5. Protocolli utilizzati negli esperimenti</b> .....	13
<b>3.5.1. Preparazione di vettore e inserto</b> .....	13
<b>3.5.2. Digestione di vettore e inserto</b> .....	14
<b>3.5.3. Defosforilazione del vettore</b> .....	15
<b>3.5.4. Ligazione</b> .....	15
<b>3.5.5. Trasformazione di cellule <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> competenti</b> .....	16
<b>3.5.6. Colony PCR delle colonie ottenute</b> .....	16
<b>4. Risultati</b> .....	18
<b>4.1. Costruzione della sequenza</b> .....	18
<b>4.2. Clonaggio/Ligazione della sequenza sintetizzata</b> .....	19
<b>5. Discussione</b> .....	22
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	23

## 1. Abstract

I PFAS, o composti per-/polifluoroalchilici, sono composti chimici largamente usati per applicazioni commerciali ed industriali, grazie alla loro particolare struttura chimica che li rende idrorepellenti e oleorepellenti.

Tuttavia, negli ultimi anni si sono anche rivelati come inquinanti tossici ed estremamente persistenti nell'ambiente, in particolare sono molto diffusi nella regione italiana del Veneto a causa dell'inquinamento da PFAS nelle acque di falda: nelle cosiddette "aree rosse", è stato infatti osservato un numero crescente di morti causati da problemi cardiovascolari, oltre ad un aumento di neoplasie maligne.

Le proposte per la loro degradazione sono svariate, ma nessuna si è finora rivelata sufficientemente efficace: una soluzione possibile e innovativa è l'utilizzo di specifici enzimi, eventualmente ingegnerizzati tramite gli strumenti della biologia sintetica, per degradare biologicamente i composti e facilitare il loro smaltimento.

In questa tesi verrà descritta la progettazione di una sequenza sintetica per l'espressione in *E. coli* dell'enzima DeHa2, utilizzato per rimuovere gli ioni fluoruro dai PFAS e facilitarne la degradazione. Successivamente, si descriverà la procedura di clonaggio di tale sequenza in *E. coli* (ceppo DH5 $\alpha$ ), nel plasmide d'espressione pJUMP29-1A. Si precisa che questo lavoro è parte di un progetto più ampio che sarà presentato al concorso mondiale di biologia sintetica iGEM.

## 2. Introduzione

### 2.1. PFAS: la storia

I composti per-/polifluoroalchilici, noti con l'acronimo PFAS, sono definiti come “sostanze fluorurate che contengono almeno un atomo di carbonio di metile o metilene completamente fluorurato”, secondo la OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development, OECS in Italia). Essi furono creati da Roy J. Plunkett quando, nel 1938, produsse inaspettatamente il politetrafluoroetilene (PTFE) durante la sua ricerca su alternative ai refrigeranti fluorocarbonati: dopo diversi anni il composto fu commercializzato sotto il nome di Teflon e divenne conosciuto come un materiale estremamente tollerante al calore e all'adesione (Samora, 2023).

Dagli anni '50 la produzione di PFAS è aumentata esponenzialmente: grazie alla loro natura idrofobica e lipofoba ed alla loro elevata stabilità chimica data dal forte legame carbonio-fluoro, sono stati incorporati in numerosi materiali industriali commercializzati. Alcuni prodotti in cui questi composti sono presenti sono, ad esempio, le schiume degli estintori, le padelle anti-aderenti ed i camici plastificati. I PFAS si sono infatti rilevati essenziali per attribuire ai prodotti trattati con essi elevata resistenza al calore ed impermeabilità ad acqua ed oli, caratteristiche durature nel tempo che rendono i prodotti in questione resistenti a molti agenti chimici e biologici.

Queste caratteristiche descritte presentano tuttavia un lato negativo: la loro elevata longevità li ha resi anche molto resistenti ad ogni tipo di normale degradazione e negli anni sono stati permanentemente introdotti nell'ecosistema acquatico attraverso gli scarichi di rifiuti chimici industriali. La loro presenza è stata segnalata nel suolo, nell'acqua potabile e di falda, nell'aria e negli organismi viventi, come l'uomo, tramite il consumo di cibi e acqua contaminati (Biggeri, et al., 2024).

Dopo l'introduzione nel circolo sanguigno, l'emivita dei PFAS inquinanti varia da molecola a molecola e possono persistere nel corpo anche decenni, comportando una serie di disfunzioni corporee e malattie con gravità proporzionale alla concentrazione raggiunta nei tessuti o nei liquidi circolanti. Alcuni esempi di effetti negativi sono la ridotta risposta anticorpale, l'aumento del rischio di cancro a molti organi ed infertilità maschile.

In particolare, la cancerogenicità dei composti è stata testata in maniera approfondita sui PFOA (acido perfluorottanoico) e PFOS (acido perfluorottansulfonico), i due tipi di PFAS più diffusi nelle acque: la ricerca si è conclusa con la classificazione del PFOA come “cancerogeno per gli umani” (Gruppo 1), basandosi su forti evidenze sperimentali, mentre il PFOS è stato classificato come “possibilmente cancerogeno per gli umani” (Gruppo 2B), basandosi su evidenze forti ma in quantità ancora limitate (Biggeri, et al., 2024).

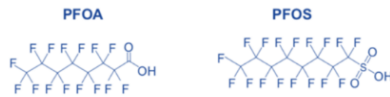


Figura 1: strutture chimiche di PFOA e PFOS

## 2.2. Il problema nel Veneto

Nel 2011, il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare commissionò all'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA-CNR) una ricerca sulla contaminazione dei PFAS nei principali bacini fluviali italiani. Questa ricerca svelò una vasta zona di acque superficiali e sotterranee contaminata nella regione del Veneto, dove questi inquinanti furono anche rilevati in campioni di acqua potabile. Dopo che i risultati furono comunicati al Ministero, nel 2013, l'Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto (ARPAV) attuò un piano di monitoraggio ambientale per determinare l'estensione ed il livello di contaminazione delle acque e per identificare la sorgente di questi inquinanti: ben 12 tipi di PFAS furono misurati nei campioni prelevati e l'azienda Miteni, collocata nel territorio di Trissino (VI), fu identificata quale responsabile della contaminazione (Zamboni, 2021).

Già nel 1965, l'azienda Rimar (in seguito rinominata Miteni) produceva acidi carbossilici perfluorurati utilizzati per impermeabilizzare i tessuti; negli anni la sua attività principale rimase sempre la sintesi e rigenerazione di tensioattivi perfluorurati, i cui prodotti di scarto venivano illegalmente riversati nella falda acquifera nei pressi della zona di produzione. Anche se studi svolti dagli anni Sessanta in poi avevano riscontrato l'inquinamento della falda, fu solo a seguito della ricerca dell'IRSA, nel 2013, che fu annunciata la scoperta in Veneto della più grande contaminazione da PFAS attualmente conosciuta, considerando la vastità di territorio e la popolazione coinvolta.

L'ARPAV stima che la contaminazione delle acque di falda raggiunga gli acquedotti comunali delle province di Verona, Vicenza e Padova. I comuni nell'area di massima esposizione, denominata "area rossa", sono ulteriormente divisi in "area rossa A", che include comuni che si servono di acquedotti contaminati localizzati nel cuore della falda inquinata, ed in "area rossa B", che include comuni che si servono di acquedotti contaminati localizzati esternamente al fulcro dell'inquinamento. Dal 2019 i comuni rientranti nell'area rossa sono 30 e si stima che 140.000 individui siano interessati in prima persona da questo problema (ARPAV, 2024).



Figura 2: divisione delle aree interessate all'inquinamento da PFAS nel Veneto

### 2.3. Stato dell'arte per la degradazione

Per risolvere il grave problema dell'inquinamento da PFAS, molti enti ed aziende nel mondo si sono mobilitate per bonificare l'ambiente da questi inquinanti e ideare un metodo efficace per degradarli e rimuoverli permanentemente. Il metodo ad oggi più utilizzato per la bonifica è la raccolta dei PFAS in filtri a carboni attivi granulari (GAC), molto efficaci con PFAS a catena lunga, o con resine a scambio ionico. Tuttavia questi trattamenti fisici non sono utilizzati come soluzioni permanenti di smaltimento e si limitano ad accumulare i composti per il trasferimento altrove. Negli anni sono anche comparsi nuovi filtri per la raccolta di tipologie specifiche di PFAS, come i MIPs (Molecularly Imprinted Polymers), che sono provvisti di siti di binding specifici e molto simili ai recettori naturali. Per la degradazione di questi composti sono impiegati alcuni trattamenti chimici relativamente nuovi sul mercato. Alcuni esempi sono l'ossidazione a raggi UV, un metodo abbastanza recente per la degradazione di PFOA mineralizzato; la degradazione ossidativa tramite l'utilizzo di un monostrato di atomi fotocatalizzatori che può procedere per diversi cicli senza perdere la propria attività; reazioni elettrochimiche che portano alla degradazione sia ossidativa che riduttiva, e altri. In contemporanea a questi sono stati sviluppati anche diversi trattamenti biologici, quali la degradazione microbica nei suoli e liquidi di scarto, l'utilizzo dei raccolti per il sequestro di sostanze chimiche e l'unione di enzimi a fotocatalizzatori disegnati appositamente (Dickman & Aga, 2022).

La degradazione tramite l'attività naturale di alcuni microrganismi è particolarmente interessante e sono già stati identificati ceppi batterici che riescono a degradare naturalmente i PFAS, presenti anche ad alte concentrazioni: ad esempio, il ceppo HJ4 di *Pseudomonas aeruginosa* è stato osservato essere in grado di degradare parzialmente i PFOS senza alcun trattamento particolare, grazie alla parziale scissione del legame C-C nelle molecole (Kwon, et al., 2014), mentre è stata testata l'efficacia del ceppo A6 della specie *Acidimicrobium* nella defluorinazione del PFOA (Huang, et al., 2022). È stata esaminata da vicino anche l'azione dei funghi che mostrano una simile, se non maggiore, efficienza nel degradare i nuovi inquinanti: da questi studi, una gran varietà di enzimi è stata isolata e caratterizzata per poter eliminare definitivamente i PFAS, avvalendosi di numerosi vantaggi come un minore dispendio energetico, maggior applicazione ad un gran numero di inquinanti e la possibilità di lavorare ad alte o basse concentrazioni di contaminanti a seconda dell'esigenza.

Gli enzimi che più sembrano adatti per la degradazione dei PFAS sono le dealogenasi: esse sono una famiglia di idrolasi specializzate nello scindere i legami carbonio-alogeno nelle molecole, reazione che le rende più semplici e quindi più facilmente degradabili.

Le dealogenasi catalizzano una reazione di riduzione, dove due elettroni per ciascun atomo di alogeno giungono alla molecola tramite una catena di trasporto formata da due gruppi ferro-zolfo, che cedono gli elettroni ad un coenzima presentante un atomo di cobalto al centro. L'enzima lega il composto alogenato nel sito attivo, vicino all'atomo di cobalto, così gli elettroni necessari per la riduzione raggiungono la molecola e l'enzima sostituisce gli atomi di alogeno con atomi di idrogeno (Goodsell & Tonellato, 2018).

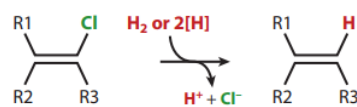


Figura 3: dealogenazione riduttiva

Data la loro particolare attività, le dealogenasi sono il candidato perfetto per la rimozione degli atomi di fluoro che ricoprono i PFAS e negli anni sono state testate tipologie diverse di dealogenasi derivanti da diversi ceppi di batteri e funghi. Enzimi che si sono dimostrati particolarmente efficaci sono le dealogenasi di *Delftia acidovorans*, un batterio molto comune nel suolo che fu isolato da un sito pesantemente contaminato dai PFAS. Questo batterio è in grado di crescere in terreni ricchi di questi inquinanti e di degradarli per ottenere il nutrimento necessario: un progetto svolto da un *team* di studenti americano ha identificato cinque diverse dealogenasi codificate dal genoma di questo batterio e ne ha studiato la forza di legame a varie tipologie di PFAS a corta e a lunga catena. Tramite questa ricerca l'enzima DeHa2 ha mostrato un forte legame all'etile fluoroacetato ( $C_4H_7FO_2$ ), quindi risulta un ottimo candidato per ulteriori studi in materia di degradazione dei PFAS (USAFA, 2021).

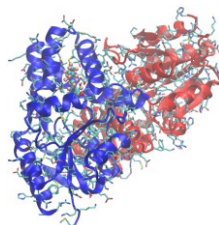


Figura 4: modello 3D dell'enzima DeHa2 di *Delftia acidovorans*

Tuttavia, *Delftia acidovorans* è un batterio che mostra difficoltà nella crescita e manutenzione in laboratorio, quindi è stato necessario creare una strategia per poter far esprimere questo enzima nel più versatile *Escherichia coli*. Nelle seguenti pagine verrà descritta la strategia ideata per il clonaggio di una sequenza sintetica codificante l'enzima DeHa2 in un plasmide d'espressione per *E. coli*.



### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Piattaforma Benchling

Per la costruzione della sequenza contenente l'enzima DeHa2 è stata utilizzata la piattaforma Benchling, accessibile dal web e finalizzata al design, organizzazione e raccolta dati delle proprie ricerche di biologia sintetica. La piattaforma permette di disegnare sequenze e primer con facilità, implementando l'uso di annotazioni e la possibilità di importare le sequenze desiderate da database specifici; inoltre è possibile operare virtualmente gli esperimenti che avvengono normalmente in laboratorio, come la digestione tramite la scelta dei siti di restrizione e la ligazione di più frammenti digeriti in precedenza. Il programma ha anche una funzionalità che permette di annotare al completo i vari protocolli e risultati, tramite modelli già presenti e modificabili a piacimento in base alle esigenze. Tutto ciò che avviene su Benchling è condiviso con i propri colleghi grazie all'adesione alla piattaforma online, rendendo il lavoro di gruppo molto più organizzato e chiaro.

Essendo una piattaforma di biologia sintetica, è importante comprendere i fondamenti di questa disciplina. Essa è considerata a metà tra la biologia molecolare e l'ingegneria e si basa su tre concetti fondamentali: la semplificazione di sistemi biologici per focalizzarsi su componenti chiave che siano maneggevoli, stabilire protocolli fissi e standardizzati per un risultato quanto più riproducibile e disegnare moduli genetici che possano essere combinati e usati in diverse configurazioni. Tenendo in considerazione questi punti chiave, è importante definire gli standard che sono stati seguiti durante la costruzione della sequenza di nostro interesse su Benchling.

Ogni componente presente nella sequenza è stato introdotto tramite l'assemblaggio BioBrick, uno dei tre metodi d'assemblaggio utilizzato in biologia sintetica: esso si basa sulla presenza di quattro siti di restrizione unici localizzati su posizioni specifiche su ogni frammento utilizzato per la costruzione, in modo da evitare risultati indesiderati durante il clonaggio. I primi due siti di restrizione, rispettivamente per l'enzima EcoRI e XbaI (in quest'ordine), sono localizzati a monte dell'intera sequenza di DNA codificante (CDS) e costituiscono il *prefisso BioBrick*; altri due siti di restrizione, rispettivamente per l'enzima SpeI e PstI, sono localizzati a valle della CDS e costituiscono il *suffisso BioBrick*. Al termine di ciascun clonaggio, l'ordine sequenziale di questi siti e la loro posizione esterna alle sequenze ingegnerizzate devono rimanere invariati. Ogni clonaggio avverrà seguendo un procedimento di digestione e ligazione; la sequenza da inserire ed il vettore verranno digeriti con gli stessi enzimi di restrizione e verranno ligati; l'inserito risulterà clonato in maniera direzionata ed il prefisso e suffisso saranno ripristinati. Il prodotto della ligazione sarà introdotto in un ceppo batterico tramite trasformazione.

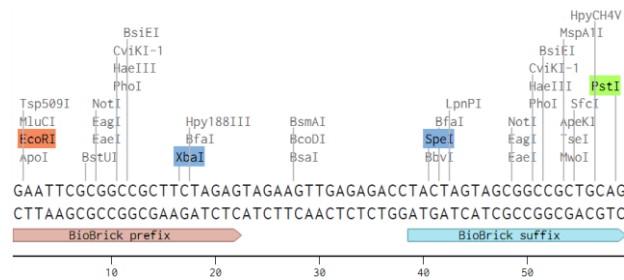


Figura 5: prefisso e suffisso BioBrick (siti di restrizione d'interesse evidenziati)

Una peculiarità del sistema BioBrick è che i due enzimi di restrizione XbaI e SpeI, presenti in posizione interna rispettivamente nel prefisso e suffisso, sono isocaudameri: i siti di restrizione sono diversi, ma le estremità ottenute dopo il taglio sono compatibili tra loro e unendosi formano una sequenza non più palindromica, quindi non compatibile con alcuno dei due enzimi, chiamata “scar”. Questa loro peculiarità risulta molto utile nell’unione di più frammenti in successione tra di loro, abolendo la presenza di siti di restrizione.

Dato che i risultati descritti in questa tesi saranno presentati alla competizione internazionale di biologia sintetica iGEM, è stato possibile usufruire del loro archivio digitale, *Registry*, per poter scegliere ed ottenere sequenze e frammenti di DNA, costruiti da *team* concorrenti che hanno partecipato in precedenza alla competizione ed hanno depositato i loro costrutti in questo database durante la loro esperienza. In aggiunta alla presenza di questi frammenti, ogni anno viene spedito a ciascun *team* un *Distribution Kit*, che consiste in una piastra di 96 pozzetti contenenti sequenze nucleotidiche già sintetizzate per iGEM, che sono fornite in forma liofilizzata e che possono essere utilizzate a libero piacimento. Tutto quello che viene inserito nel *Registry* o spedito con il *Distribution Kit* è compatibile con il metodo BioBrick e presenta il prefisso e suffisso completi: in tal modo l’utilizzo di questi frammenti risulta facilitato.

È doveroso sottolineare che l’unica sequenza che si è potuto recuperare dal *Distribution Kit* di quest’anno è stata quella del plasmide pJUMP29-1A sfLacZ (si veda il capitolo 3.3). Tutte le altre sequenze progettate, seppur ricavate in forma digitale dal *Registry*, sono state sintetizzate e acquistate al termine della pianificazione del clonaggio.

### 3.2. Sequenze utilizzate per l’assemblaggio del costrutto

Per l’assemblaggio della sequenza completa sono state utilizzate quattro sequenze ricavate dal *Registry* di iGEM:

- BioBrick prefix: GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG (22 pb)
- BioBrick suffix: TACTAGTAGCGGCCGCTGCAG (21 pb)
- RBS: ATTAAAGAGGAGAAA (15 pb)
- DeHa2 (678 pb): non riportata per la sua eccessiva lunghezza

Le sequenze per il prefisso e suffisso BioBrick sono ricavabili dalla pagina *Home* del *Registry* e sono state inserite poiché essenziali per standardizzare la sequenza che verrà ottenuta, e permettere in seguito a soggetti terzi di utilizzarla per i propri scopi per la competizione.

La sequenza del RBS utilizzata codifica un forte RBS ed è inserito nel *Registry* nel 2003 con il codice BBa\_B0030: non necessitando di un RBS con particolari caratteristiche, esso è stato scelto dalla breve lista di RBS fornita dal *Registry*, avendo avuto cura di controllare che fosse presente la sequenza di Shine-Dalgarno intatta. Al momento dell'allestimento della sequenza, il RBS è stato posizionato 8 pb a monte della sequenza codificante DeHa2, in modo da creare lo spazio sufficiente per il legame del complesso ribosomiale alla sequenza ed iniziare la trascrizione.

La sequenza della dealogenasi è stata ricavata dal *Registry*, identificata con il codice BBa\_K3347002, ed è stata inserita dal *team* USAFA, partecipante alla competizione nel 2020, dopo la sua scoperta da una ricerca bioinformatica sulle dealogenasi di *Delftia acidovorans* più efficaci per la degradazione dei PFAS. A seguito dei loro esperimenti, la DeHa2 ha riportato dei risultati positivi in maniera significativa in termini di forza di legame a questi composti e capacità di defluorurazione, quindi è stato deciso di utilizzare questa sequenza e di utilizzarla in un contesto differente dal loro progetto.

Le sequenze corrispondenti al promotore pTac e l'operatore lacO sono stati ricavati dalla sequenza del plasmide commerciale pET28 (Addgene), molto utilizzato per l'espressione di proteine ricombinanti:

- pTac: TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAAT (28 pb)
- lacO: TGTGAGCGGATAACAATT (18 pb)

Il promotore pTac è un promotore ibrido tra il promotore Lac ed il promotore Trp, più forte di ognuno dei due: esso è inducibile dal lattosio o IPTG e porta ad una elevata espressione genica quando attivato. A valle del promotore è inserito l'operatore lac, che regola la trascrizione del gene DeHa2 quando il sistema viene attivato da IPTG.

Questo sistema, quando associato al repressore lacI, è indispensabile per evitare l'espressione incontrollata dell'enzima dealogenasi, dato che non è nativo di *E. coli* e potrebbe essere tossico se espresso costitutivamente. Il gene *lacI* (repressore) verrà ricavato dal plasmide pSB4C5-Y34, fornito da un professore universitario associato al progetto, in forma di cassetta d'espressione di lacI (contenente un promotore, RBS e terminatore oltre al gene *lacI*) già munita di prefisso e suffisso BioBrick. La cassetta verrà posizionata a monte del promotore Tac tramite il metodo digestione-ligazione, operando con il prefisso e suffisso BioBrick.

### 3.3. Plasmide pJUMP29-1A sfLacZ

Il plasmide utilizzato per il clonaggio in *E. coli* è il pJUMP29-1A sfLacZ (codice BBa\_J428341 nel *Registry*), ottenuto dal *Distribution Kit* spedito da iGEM. Questo plasmide fa parte della famiglia “Joint Universal Modular Plasmids” (JUMP), una famiglia di vettori standardizzata per semplificare il lavoro con sistemi di clonaggio modulari. Ciascun vettore JUMP è compatibile con i sistemi di clonaggio principali utilizzati nella biologia sintetica, come PhytoBricks e BioBrick, e presenta un backbone basato sulla “Standard European Vector Architecture” (SEVA) che consiste in un design pensato per lo scambio semplice dei tre elementi chiave del vettore, ovvero l’origine di replicazione *ori*, il marker per la selezione con antibiotico e la cassetta d’espressione. La scelta di questo particolare tipo di vettore permette l’utilizzo in futuro del plasmide costruito tramite metodologie diverse e compatibili tra loro, oltre ad essere perfettamente adeguato ad un progetto di biologia sintetica basato sul sistema BioBrick (Valenzuela-Ortega & French, 2021).

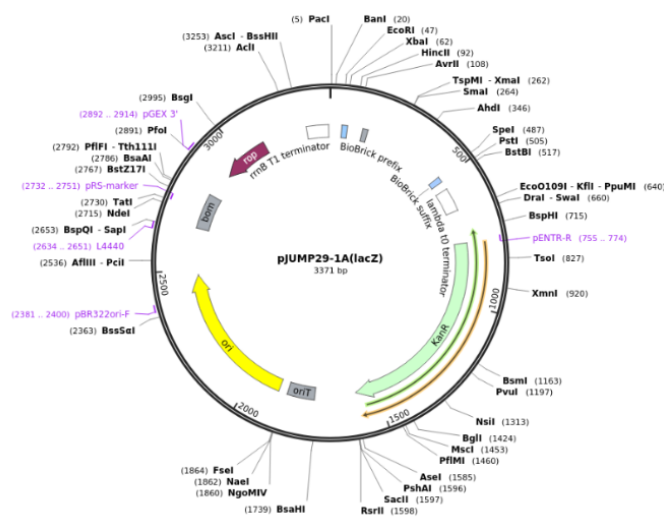


Figura 6: mappa del vettore pJUMP29-1A sfLacZ

Come illustrato dalla mappa, il plasmide presenta il prefisso e suffisso BioBrick completi, dove verrà inserita la sequenza sintetizzata, ed a valle del suffisso è presente un terminatore Lambda T0, già presente nel vettore originale: esso verrà utilizzato come terminatore della sequenza sintetizzata e dovrebbe agire correttamente appena la sequenza è clonata all’interno del plasmide. Oltre alla presenza di un secondo terminatore *rrnB T1*, a monte della sequenza prefisso, sono presenti due origini di replicazione, *oriT* e *ori* di pBR322, e un gene per la resistenza alla kanamicina, l’antibiotico che verrà utilizzato come marker di selezione nei prossimi esperimenti. Per finire, sono presenti l’elemento *bom*, la regione per la mobilità del vettore derivante dal plasmide ColE1, e l’elemento *rop* che interferisce con la replicazione del vettore e ne limita il numero di copie, rendendolo un plasmide a medio-basso numero di copie: questa caratteristica è

essenziale per limitare il numero di plasmidi ricombinanti che codificano DeHa2, potenzialmente tossica per *E. coli* se presente in quantità elevate.

### **3.4. Ceppo DH5 $\alpha$ di *E. coli***

Il ceppo utilizzato per i clonaggi è il ceppo DH5 $\alpha$  del batterio *E. coli*, un ceppo molto comune e largamente utilizzato in laboratorio. Questo ceppo presenta:

- a. la mutazione LacZ $\Delta$ M15 per operare la selezione biancoblu
- b. la delezione del gene *recA* per evitare eventi di ricombinazione ed aumentare la stabilità del plasmide ricombinante
- c. una mutazione sul gene *endA* per aumentare il rendimento e la qualità del DNA
- d. un'alta efficienza di trasformazione.

Il ceppo utilizzato era disponibile in laboratorio in aliquote di cellule già rese chemio-competenti.

### **3.5. Protocolli utilizzati negli esperimenti**

#### **3.5.1. Preparazione di vettore e inserto**

Come prima cosa, è stato necessario risospendere il plasmide liofilizzato pJUMP29-1A sfLacZ (chiamato d'ora in avanti pJUMP) dal pozzetto corrispondente nel *Distribution Kit*.

Il contenuto è inizialmente risospeso in 10  $\mu$ L di acqua distillata; l'operazione è stata ripetuta un paio di volte lasciando riposare la soluzione per 5 minuti, in modo da assicurarsi che tutto il materiale venisse risospeso correttamente. La soluzione contenente il DNA presentava un colore rossiccio a causa del colorante rosso cresolo appositamente inserito. Infine, 1  $\mu$ L del DNA risospeso è stato usato per trasformare cellule competenti; in seguito le cellule trasformate sono state piastrate con l'antibiotico appropriato, a seconda del marker di selezione presente sul DNA utilizzato, e si è attesa la crescita delle colonie trasformate per poterle poi inoculare e raccogliere il DNA del *Distribution Kit* tramite miniprep: la quantità del DNA ricavato è stata successivamente determinata tramite quantificazione con lo spettrofotometro NanoDrop, presente nel laboratorio.

In questo passaggio ed ogni volta che sarà compiuta una miniprep nei prossimi esperimenti, il metodo con cui viene svolta è descritto dal Kit Qiagen per la miniprep, che corrisponde ad una serie di reagenti spediti appositamente da utilizzare con la colonnina Qiagen, anch'essa spedita ed inclusa nel kit con i reagenti corrispondenti.

La sequenza sintetizzata è stata inviata anch'essa in forma liofilizzata dalla ditta da cui è stata ordinata, con la concentrazione iniziale di 1000ng: essa è stata risospesa in 10  $\mu$ L d'acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 100

ng/ $\mu$ L e risospesa ulteriormente per raggiungere la concentrazione finale di 10 ng/ $\mu$ L, utilizzata per le successive reazioni.

Dopo numerosi esperimenti è stato necessario amplificare la sequenza tramite PCR per ottenere nuovamente una quantità sufficiente di DNA con cui lavorare: per questo sono stati disegnati degli specifici primer che mappano il prefisso e suffisso BioBrick, esterni alla sequenza sintetizzata. Al termine della PCR, ciò che è stato ottenuto è stato sempre quantificato con lo spettrofotometro.

Primer forward (prefisso BioBrick): gaattcgcggccgcttagag (22 pb, 54°C Tm)

Primer reverse (suffisso BioBrick): cctgcagcggccgctactag (20 pb, 55°C Tm)

### 3.5.2. Digestione di vettore e inserto

Dopo aver purificato il plasmide pJUMP e la sequenza codificante DeHa2 (a cui ci si riferisce d'ora in avanti come inserto), entrambi sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione EcoRI e PstI, localizzati all'esterno di prefisso e suffisso BioBrick.

*Tabella 1: protocollo digestione*

Reagenti utilizzati	Inserto	Vettore
<b>Buffer O</b>	1-2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Enzima EcoRI</b>	0.5-1 $\mu$ L	0.3-1 $\mu$ L
<b>Enzima PstI</b>	0.5-1 $\mu$ L	0.3-1 $\mu$ L
<b>DNA templat</b>	8-10 $\mu$ L	4-7 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Q.b. per arrivare a volume	Q.b. per arrivare a volume
<b>Totale</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>

Gli enzimi utilizzati sono del tipo “High Fidelity” della Invitrogen, ed il buffer O della Thermo Scientific utilizzato è indicato per lavorare con questi due enzimi nella stessa reazione, secondo la ditta stessa.

Dopo aver lasciato agire la reazione a 37°C per due ore, gli enzimi di restrizione sono stati inattivati a 80°C per 20 minuti e la sequenza è stata successivamente purificata tramite il kit Qiagen per la purificazione del DNA; il kit è composto da vari reagenti da utilizzare con l'apposita colonnina, spediti assieme dalla ditta. In seguito, i prodotti sono stati analizzati su gel con bromuro di etidio come intercalante: se la digestione è avvenuta correttamente, nel pozzetto corrispondente al vettore si dovrebbero osservare due bande, rispettivamente di circa 3000 pb, corrispondente al backbone plasmidico digerito, e 400 pb, corrispondente all'inserto originariamente contenuto tra i due siti di restrizione.

È doveroso notare che le quantità sono rappresentate come range di possibili valori dato che la reazione di digestione è stata ripetuta più volte; poiché un

risultato positivo non era sempre visibile tramite gel elettroforesi ed è stato necessario ripetere l'esperimento con quantità diverse di DNA di partenza, sempre restando su concentrazioni di 250-300 ng/ $\mu$ L per reazione.

### 3.5.3. Defosforilazione del vettore

Dopo aver confermato l'avvenuta digestione, si è proceduto con la defosforilazione del plasmide pJUMP digerito, per evitare la chiusura del plasmide privo di inserto. Per la defosforilazione è stata utilizzata la fosfatasi FastAP della Thermo Scientific, compatibile con i reagenti della digestione precedente e rendendo non necessaria la purificazione del backbone plasmidico.

Tabella 2: protocollo defosforilazione vettore

Reagenti utilizzati	
Buffer FastAP 10x	2-3 $\mu$ L
Enzima FastAP	1 $\mu$ L
DNA templato	14-20 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	Q.b. per arrivare a volume
<b>Totale</b>	<b>20-30<math>\mu</math>L</b>

Dopo aver avviato la reazione, si lascia agire l'enzima per 1 ora a 37°C; in seguito esso viene inattivato a 80°C per circa 30 minuti.

### 3.5.4. Ligazione

Dopo aver inattivato la fosfatasi ed aver recuperato l'inserto digerito, si continua con il protocollo di ligazione. Solitamente la ligazione viene allestita con concentrazioni con rapporto inserto: vettore a favore del primo, al fine di favorirne l'inserimento nel costrutto finale. Nel nostro caso il rapporto scelto per la ligazione risultata positiva è stato di 5:1.

In aggiunta alla reazione di ligazione contenente sia l'inserto che il vettore, è stata allestita in parallelo una reazione di ligazione di controllo, contenente il solo pJUMP defosforilato.

La T4 DNA ligasi ed il buffer utilizzato sono entrambi della ditta Thermo Scientific ed è specificato dalla ditta che sono compatibili e lavorano senza problemi con i reagenti della digestione e della defosforilazione, quindi non è stata necessaria la purificazione dei reagenti utilizzati in precedenza.

Tabella 3: protocollo ligazione

Reagenti utilizzati	Ligazione	Controllo
Buffer T4	2.5µL	2.5µL
Enzima T4 DNA ligasi	1µL	1µL
Inserto	10µL	---
Vettore defosforilato	10µL	10µL
H <sub>2</sub> O	1.5µL	11.5µL
<b>Totale</b>	<b>25µL</b>	<b>25µL</b>

Dopo aver allestito la ligazione, le due reazioni sono state posizionate a 16°C durante la notte per ottenere minore “disordine” nelle provette di reazione ed ottimizzare la possibilità di vettori ligati correttamente.

### 3.5.5. Trasformazione di cellule *E. coli* DH5α competenti

La mattina dopo, vengono raccolte le reazioni di ligazione e si procede con la trasformazione: tutto il materiale ottenuto dalla ligazione e dal controllo viene trasferito in due provette contenenti 50 µL di cellule DH5α chemio-competenti, che vengono successivamente posizionate in ghiaccio per 30 minuti. Scaduto il tempo, le cellule sono poste in un bagnetto termico a 42°C per un minuto, in seguito vengono immediatamente trasferite in ghiaccio dove rimarranno per altri due minuti: lo shock termico permette alle cellule di formare dei pori per lasciar penetrare il DNA ottenuto dalla ligazione al loro interno.

In seguito, a ciascuna provetta vengono aggiunti 400µL di LB e vengono lasciate a 37°C in agitazione per circa 45 minuti, al termine dei quali le provette vengono centrifugate per 5 minuti a 5000 rcf per poter raccogliere le cellule e poter rimuovere il terreno LB in eccesso in sicurezza. Dopo la centrifugazione, 400µL di surnatante viene rimosso dalle provette e le cellule così concentrate vengono risospese e piastrate in due piastre LB Agar contenenti kanamicina, l’antibiotico per il quale il plasmide pJUMP contiene la cassetta di resistenza. Le due piastre, una contenente la ligazione e l’altra contenente il controllo, vengono infine lasciate a 37°C, in attesa della crescita delle colonie.

### 3.5.6. Colony PCR delle colonie ottenute

Dopo un tempo sufficientemente lungo, si dovrebbe osservare sulle piastre un numero distinto di colonie cresciute: se la ligazione è avvenuta correttamente, sulla piastra contenente la ligazione dovrebbero esserci un numero di colonie maggiore rispetto alla piastra con il solo vettore senza inserto ligato.

Identificate le colonie e numerate su entrambe le piastre, si procede all’allestimento della colony PCR per verificare la presenza dell’inserto nei plasmidi ricombinanti: come prima cosa, vengono scelte parecchie colonie dalla piastra con la ligazione e circa un paio di colonie dalla piastra di controllo e, dopo



averle toccate con un puntale, vengono raccolte in provette contenenti 50 $\mu$ L di LB. In seguito, viene preparata la miscela di reagenti utilizzata per la PCR tramite il protocollo consigliato dalla Thermo Scientific, di cui vengono usati i reagenti.

I primer utilizzati per la PCR sono i primer utilizzati per l'amplificazione dell'inserto, ovvero il primer forward che mappa sulla sequenza prefisso ed il primer reverse che mappa sulla sequenza suffisso.

Tabella 4: protocollo colony PCR

<b>Reagenti utilizzati</b>	<b>Mix PCR</b>
<b>Buffer</b>	3 $\mu$ L
<b>dNTPs</b>	1 $\mu$ L
<b>Primer forward</b>	0.75 $\mu$ L
<b>Primer reverse</b>	0.75 $\mu$ L
<b>Taq polimerasi</b>	0.075 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8.425 $\mu$ L
<b>Cellule raccolte in LB</b>	1 $\mu$ L
<b>Totale</b>	<b>15<math>\mu</math>L</b>

Le provette sono state posizionate in un termociclatore dove sono stati impostati i seguenti cicli:

Tabella 5: cicli per colony PCR

<b>Cicli PCR</b>	
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C – 2 minuti
<b>Denaturazione (c)</b>	95°C – 30 secondi
<b>Annealing (c)</b>	55°C – 30 secondi
<b>Estensione (c)</b>	72°C – 1 minuto
<b>Estensione finale</b>	72°C – 5 minuti
<b>Numero di cicli (c): 30</b>	

Quando la reazione di amplificazione è terminata, si analizzano i prodotti su gel, utilizzando il bromuro d'etidio come intercalante per evidenziare al meglio il DNA: se i primer si sono legati correttamente, si dovrebbero evidenziare bande di 800-900 pb, corrispondenti alla lunghezza dell'inserto, confermando che la ligazione è avvenuta con successo.

## 4. Risultati

### 4.1. Costruzione della sequenza

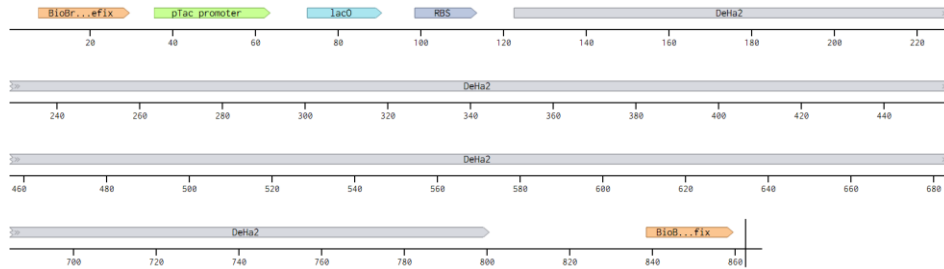


Figura 7: disegno della sequenza sintetizzata

Lo schema mostrato in Figura 7 rappresenta la sequenza completa, dove sono stati annotati i vari elementi di cui è composta: a partire dal lato 5', è presente il prefisso BioBrick presentante i siti di restrizione per i due enzimi EcoRI e XbaI, il promotore pTac e l'operatore Lac, utilizzati per la regolazione della trascrizione della sequenza codificante DeHa2, seguiti dal RBS e dalla sequenza di DeHa2. Al 3' dell'inserto è stato inserito il suffisso BioBrick, che consiste nei siti di restrizione dei due enzimi SpeI e PstI.

È stato deciso di utilizzare il terminatore Lambda T0 già presente nel vettore a valle della sequenza suffisso, che si trova a una distanza compatibile con la trascrizione della sequenza codificante DeHa2. A monte della CDS è presente un sito di riconoscimento per l'enzima NdeI, mentre a valle è presente un sito di riconoscimento per l'enzima BamHI: questi due siti sono stati inseriti per poter digerire il plasmide ricombinante finale tramite questi enzimi e poter sostituire la CDS DeHa2 con quella di una differente dealogenasi, nel caso fosse possibile in futuro testare l'efficacia di altri enzimi contro la degradazione dei PFAS.

Siccome non è stato possibile ottenere le sequenze fisiche dal *Registry* di iGEM, è stato necessario raccogliere le sequenze virtuali dal sito e testare il metodo digestione-ligazione su Benchling grazie all'apposita funzionalità della piattaforma: ogni frammento è stato inserito singolarmente nella sequenza tramite una serie di digestioni e ligazioni virtuali che sarebbero dovute avvenire in laboratorio. In questo modo, è stata ottenuta una sequenza che riflette realisticamente i risultati che si dovrebbero vedere se si svolgessero gli stessi esperimenti nella pratica.

Completata la costruzione della sequenza, essa è stata inviata alla ditta di sequenziamento IDT, che sponsorizza il concorso iGEM. Il prodotto sintetizzato è giunto in laboratorio dopo circa due settimane, insieme ai primer per prefisso e suffisso ordinati in contemporanea dalla stessa ditta. È stato quindi possibile partire con gli esperimenti in laboratorio.

## 4.2. Clonaggio/Ligazione della sequenza sintetizzata

Come descritto in precedenza, la sequenza giunta dalla ditta IDT è stata risospesa insieme al vettore ricavato dal *Distribution Kit* di iGEM, quindi si è proceduto con la digestione con EcoRI e PstI. La sequenza è stata digerita ma non è stato possibile controllare se la reazione fosse avvenuta con successo per il DNA sintetizzato, dato che i frammenti tagliati alle estremità esterne al prefisso e suffisso, lunghi solo una ventina di basi, non sarebbero stati visibili su gel.

Per la digestione del vettore, sono state allestite in contemporanea anche altre due reazioni: in ciascuna era presente solo un enzima, in modo da verificare che i singoli enzimi funzionassero correttamente nel buffer usato per la doppia digestione.

Dopo alcuni tentativi, sono stati ottenuti dei risultati positivi evidenziabili sul gel presentato in Figura 8.

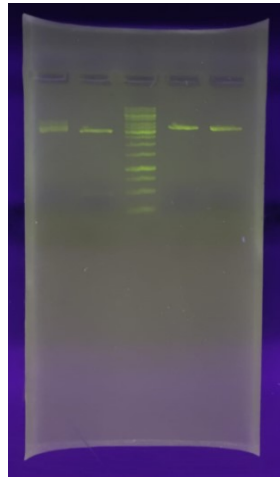


Figura 8: elettroforesi su gel della digestione di pJUMP. I campioni sono stati caricati, da destra a sinistra: pJUMP non digerito, pJUMP digerito con EcoRI e PstI, pJUMP digerito con EcoRI e pJUMP digerito con PstI.

Dalla foto si può osservare che i vettori digeriti con un enzima sono stati linearizzati, mentre la reazione di doppia digestione presenta due bande, una a circa 3000 pb ed una molto più leggera ed in basso, a circa 400-500 pb: la lunghezza di quest'ultima banda corrisponde all'inserto presente nel pJUMP originario, quindi è confermato che la digestione è avvenuta.

In seguito a questi risultati positivi il plasmide è stato defosforilato e, dopo l'inattivazione della fosfatasi FastAP, l'inserto ed il vettore sono stati uniti assieme nella reazione di ligazione e sono stati lasciati a 16°C fino alla mattina successiva, come descritto nei Materiali e Metodi. Le cellule trasformate sono state piastrate, ed il giorno dopo sono stati ottenuti i risultati mostrati in Figura 9.

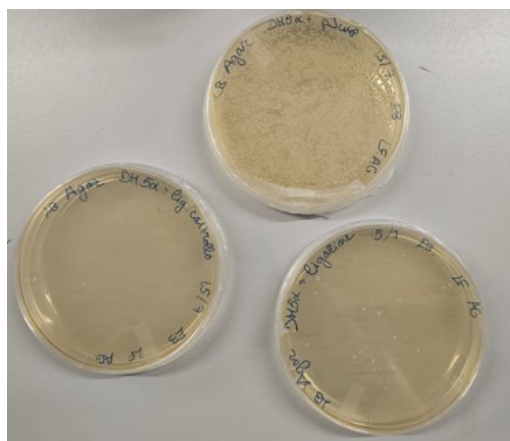


Figura 9: piastre di pJUMP ligato, di controllo e originale

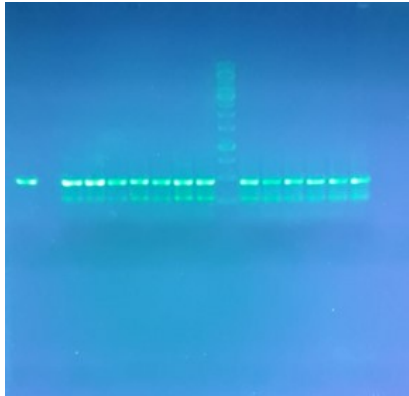
Da questa foto si osserva la grande differenza di numero di colonie nelle piastre del controllo e della ligazione: sulla prima sono cresciute appena 5 colonie, mentre sulla seconda sono state contate 26 colonie. Questo risultato è indice che la ligazione è avvenuta correttamente e che il plasmide ricombinante ha permesso alle cellule di crescere molto più facilmente. Sulla piastra contenente il vettore originale non digerito si possono osservare un numero elevatissimo di colonie, come previsto.

Dalle piastre sono state prelevate un totale di 23 colonie e si è svolta la colony PCR con i reagenti elencati in precedenza: dopo il primo tentativo, i campioni ottenuti sono stati fatti correre su gel.



Figura 10: primo tentativo di colony PCR

Sebbene la foto non sia chiarissima, si nota che non è rilevabile alcuna banda distinta ad altezze specifiche, ma è invece presente solo uno *smear* indistinto sul fondo del gel. Per risolvere il problema, si è ipotizzato che i primer utilizzati per la colony PCR potessero essersi degradati. Dopo aver preparato una nuova soluzione diluita dei primer, a partire dalla soluzione madre concentrata, il protocollo della colony PCR è stato riprodotto e si è svolta una nuova corsa su gel, aggiungendo al primo pozzetto da destra il risultato della PCR derivante da una colonia di pJUMP originale.



*Figura 11: secondo tentativo di colony PCR*

In questa seconda immagine si distinguono molto nitidamente le bande, quindi la risospensione a fresco dei primer si è rivelata la giusta intuizione. I risultati restano negativi; tutte le colonie presentano bande a 400-500 pb, ovvero la lunghezza dell'inserto originale del pJUMP, oltre ad una seconda banda a circa 200 pb, verosimilmente costituita da dimeri di primer.

In seguito a questi risultati, si è optato per verificare la conclusione tratta, estraendo il DNA dalle colonie utilizzate tramite miniprep e svolgendo una digestione di controllo con gli enzimi EcoRI e PstI: se la ligazione fosse avvenuta con l'inserto sintetico desiderato, si sarebbe potuto osservare una corrispondente banda di 800-900 pb. Anche a seguito di questo ultimo esperimento, le bande ottenute sono tutte localizzate intorno alle 400 pb, confermando che tutte le colonie analizzate contenevano il plasmide originario e non quello ricombinante.

## 5. Discussione

A causa di questi risultati negativi, non si sono continuati gli esperimenti per l'inserimento della cassetta di espressione di lacI e si è invece trasferito tutto il materiale utilizzato ad un altro gruppo di ricerca, coinvolto anch'esso nello stesso progetto di partecipazione al concorso iGEM.

Tramite un paio di cambiamenti di reagenti e quantità, si è pensato di utilizzare un ceppo diverso di *E. coli*, chiamato F': questo ceppo è molto particolare, poiché presenta il repressore lacI direttamente nel suo genoma e lo esprime costitutivamente. Dopo questo cambiamento, sono state svolte nuovamente tutte le reazioni qui descritte ed i prodotti ligati sono stati trasformati sia in batteri Top10, un ceppo molto simile al ceppo DH5 $\alpha$ , sia in batteri F': dopo una giornata sono cresciute parecchie colonie sulla piastra con batteri F' trasformati, mentre non è cresciuta alcuna colonia sulla piastra con batteri Top10 trasformati.

Questi risultati fanno pensare che l'enzima DeHa2 sia tossico per *E. coli*, tanto da provocare la mancata crescita di qualsiasi colonia che lo esprima anche in piccole quantità; in effetti l'aggiunta del repressore prima della ligazione dell'insero sembra aver mitigato questo problema. Adesso il DNA ottenuto da queste colonie di F' sarà sequenziato e si potrà quindi capire se sia possibile esprimere questa dealogenasi in *E. coli*.

## BIBLIOGRAFIA

ARPAV, 2024. Sostanze perfluoro alchiliche (PFAS). *ARPAV*.

Biggeri, A. et al., 2024. All-cause, cardiovascular disease and cancer mortality in the population of a large Italian area contaminated by perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (1980–2018). *Environmental Health*, 23(42).

Dickman, R. A. & Aga, D. S., 2022. A review of recent studies on toxicity, sequestration, and degradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Journal of Hazardous Materials*, 436(129120).

Goodsell, D. S. & Tonellato, M., 2018. Dealogenasi. *PianetaChimica*, Aprile.

Huang, S. et al., 2022. Anaerobic degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) in biosolids by *Acidimicrobium* sp. strain A6. *Journal of Hazardous Materials*, 424(127699).

Kwon, B. G. et al., 2014. Biodegradation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) as an emerging contaminant. *Chemosphere*, Volume 109, pp. 221-5.

Samora, S., 2023. The history of PFAS: From World War II to your Teflon pan. *Manufacturing Dive*.

USAFA, 2021. Defluorine Machine. *iGEM*.

Valenzuela-Ortega, M. & French, C., 2021. Joint universal modular plasmids (JUMP): a flexible vector platform for synthetic biology. *Oxford Academy*, 6(1).

Zamboni, M., 2021. PFAS in Veneto: inizia il processo all'azienda inquinatrice. *Epidemiologia & Prevenzione*, Volume 45, pp. 145-148.