

## PROGETTO DETTAGLIATO BIOTECNOLOGIE CELLULARI

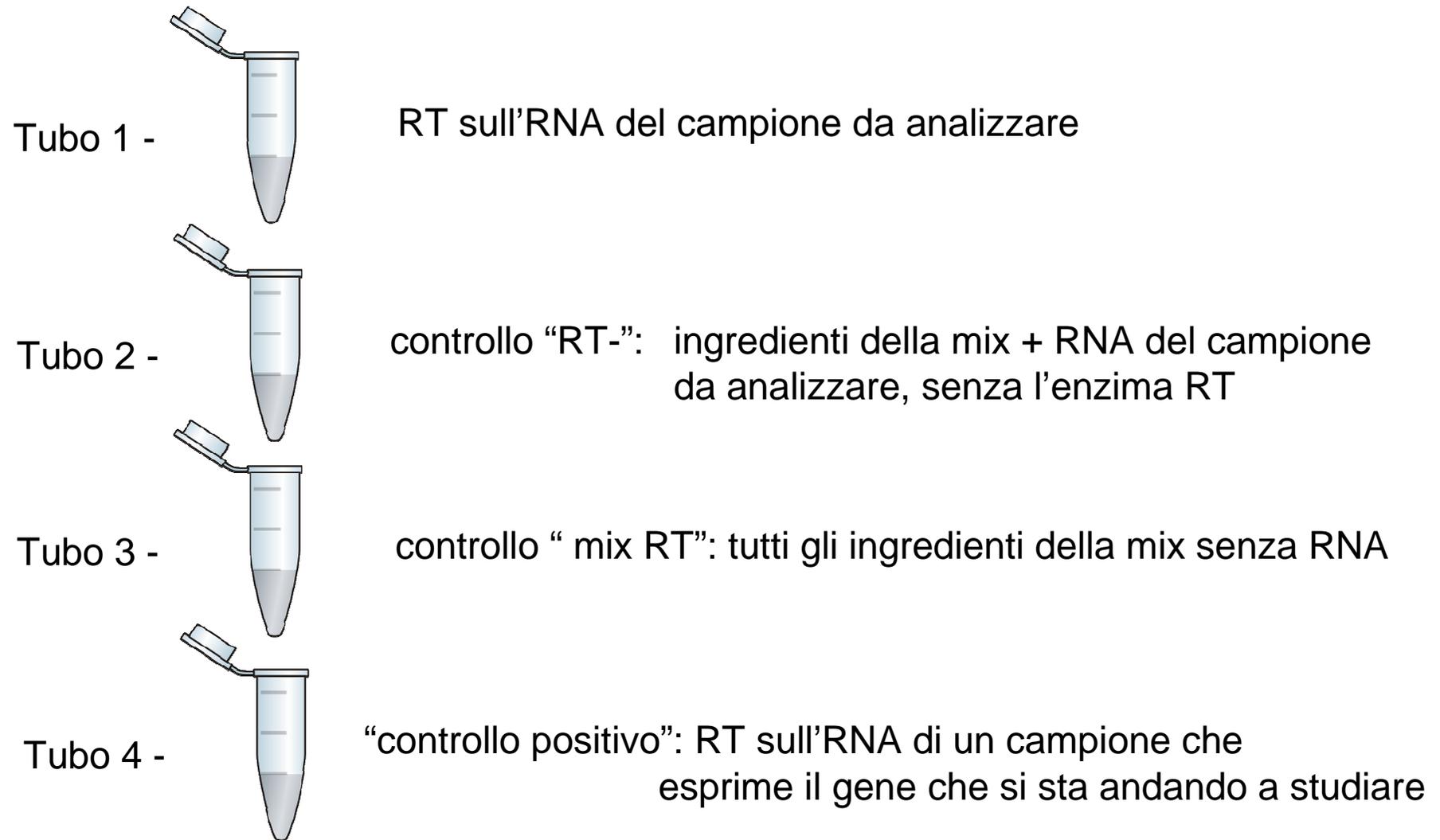
- 1 - Studio delle sequenze presenti in banca dati riguardanti la NRG1-typelll-beta 3
- 2 - Scelta dei primers per amplificare la NRG1-typelll-beta 3 di ratto (tenendo conto del fatto che poi la cloneremo *in frame* in un vettore esprimente la GFP).

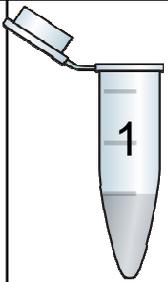
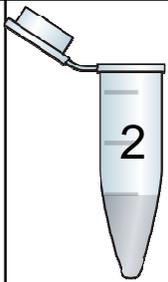
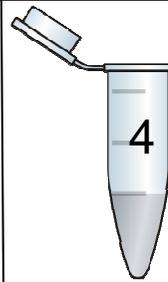
### **3 - RT-PCR**

- 4 - Clonaggio di NRG1-typelll-beta 3 in vettore pCR-bluntll-TOPO
- 5 - Sequenziamento
- 6 - Subclonaggio in vettore di espressione pEGFP-C3 (proteina ibrida NRG-EGFP)
- 7 - Subclonaggio in vettore di espressione pIRES-puro2
- 8 - Subclonaggio in vettore di espressione con coda FLAG per identificazione della proteina
- 9 - Subclonaggio di NRG1-typelll-beta3 in vettore virale adenoassociato pAAV-MCS
- 10 - Subclonaggio di NRG1-typelll-beta3-FLAG in vettore virale adenoassociato pAAV-MCS

NB Per ogni clonaggio e sub-clonaggio studio delle digestioni enzimatiche che consentono di verificare il corretto orientamento dell'inserto, con previsione delle bande attese in caso di clonaggio senso o antisenso

# Reverse Transcription



	 1 “RT+”	 2 “RT-”	 3 “ mix RT”	 4 “controllo +”	MIX x 5	Conc. finale
RNA	μl		—			1 μg
o H <sub>2</sub> O	μl					
Buffer 5x	μl					1x
BSA acetilata 1 μg/μl	μl					0.1 μg/μl
Triton 1%	μl					0.05%
dNTPs 10mM	μl					0,5mM
Esanucleotidi 50 μM	μl					7.5 μM
RT 200u/μl	μl	—				200u/25μl
RNAsin 33u/μl	μl					33u/25μl
Acqua qb a 25μl	μl					
Totale	25 μl	25 μl				

Preparate una mix comune per allestire 5 RT

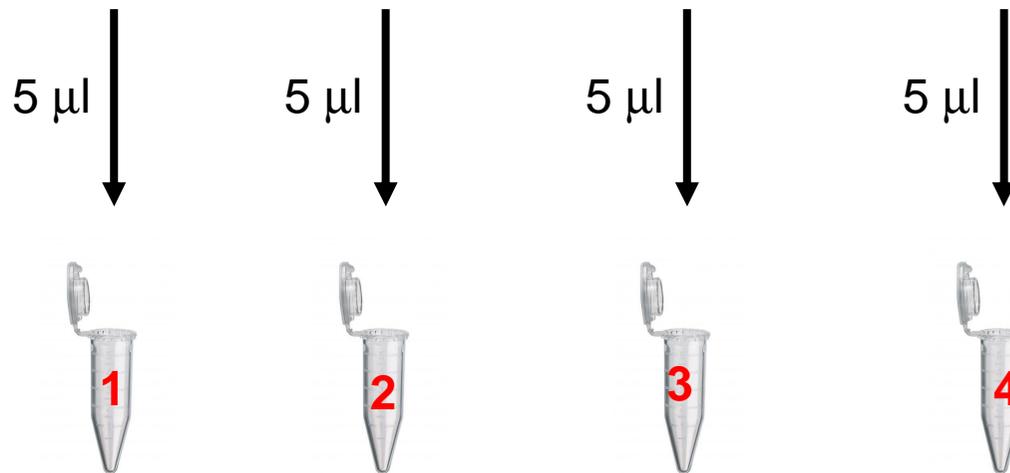
- fate in modo che RNA + H<sub>2</sub>O della prima riga + RT (l'enzima) arrivino a 5 µl,  
In questo modo dovrete aggiungere a tutti i campioni 20 µl di mix comprendente tutti gli ingredienti, tranne RNA (o H<sub>2</sub>O) ed RT (o H<sub>2</sub>O) che aggiungerete ai singoli campioni

- il controllo positivo è concentrato 0,5 µg/µl

# RT-PCR



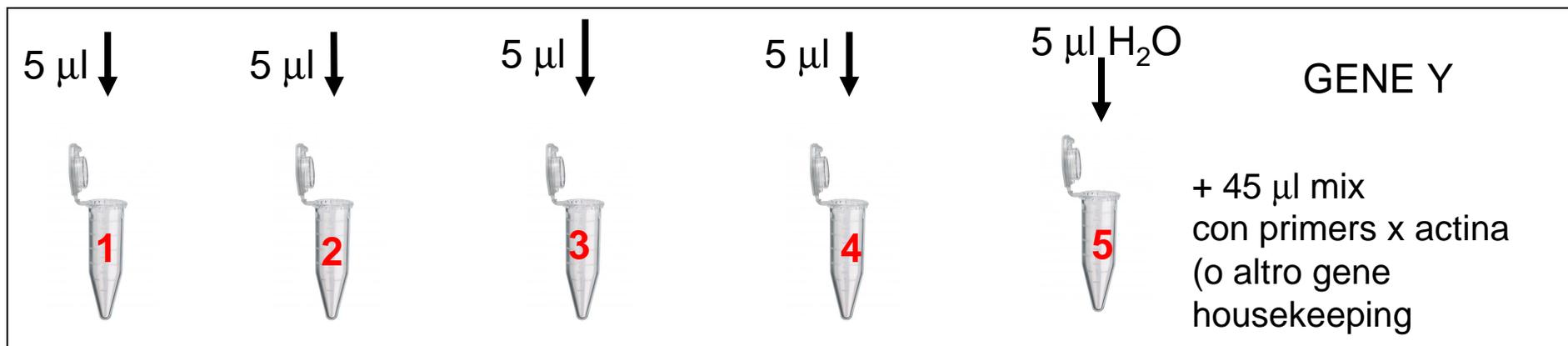
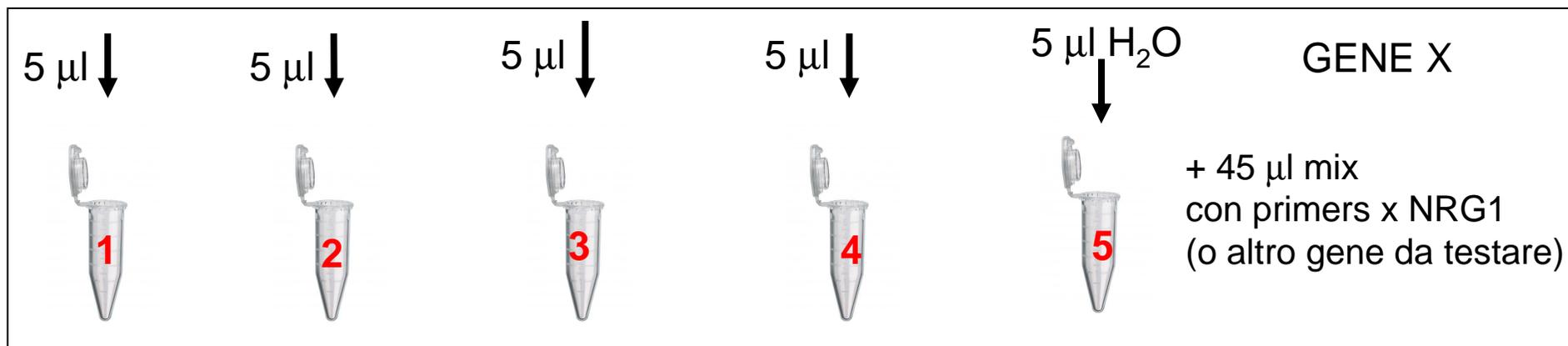
di questi 25µl si prelevano 5 µl e si amplificano mediante PCR



+ 45 µl mix PCR uguali per tutti i campioni

Controllo  
mix PCR

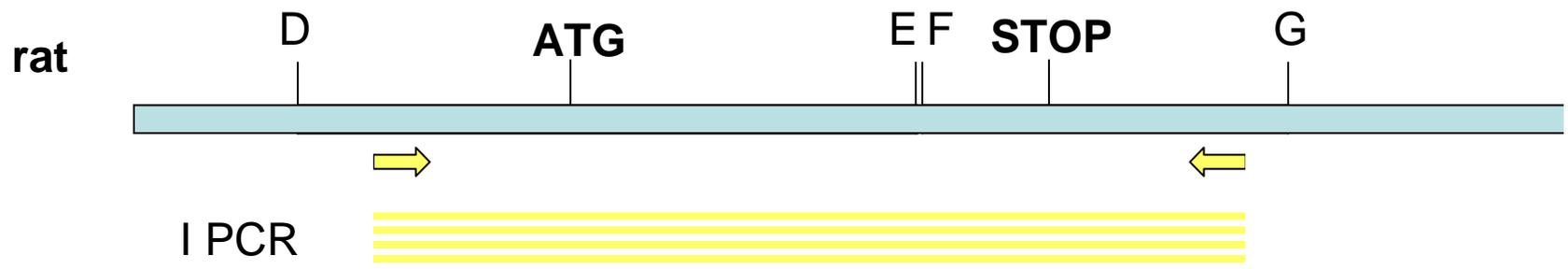
STOCK						MIX x 6	Conc. finale
RT	5 µl #1	5 µl #2	5 µl #3	5 µl #4	—		
H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	5 µl		
5 x buffer Pfu	µl						-> 1x
primer senso 10 µM	µl						-> 200 nM
primer antisenso 10 µM	µl						-> 200 nM
100% glicerolo	µl						-> 5%
10mM dNTPs	µl						-> 200 µM
Taq polimerasi 1u/ul	µl						-> 1u/50µl
H <sub>2</sub> O	µl						
totale	50 µl						



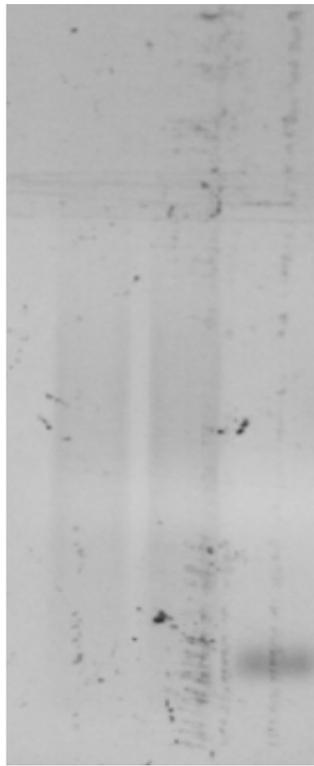
## PROGETTO DETTAGLIATO BIOTECNOLOGIE CELLULARI

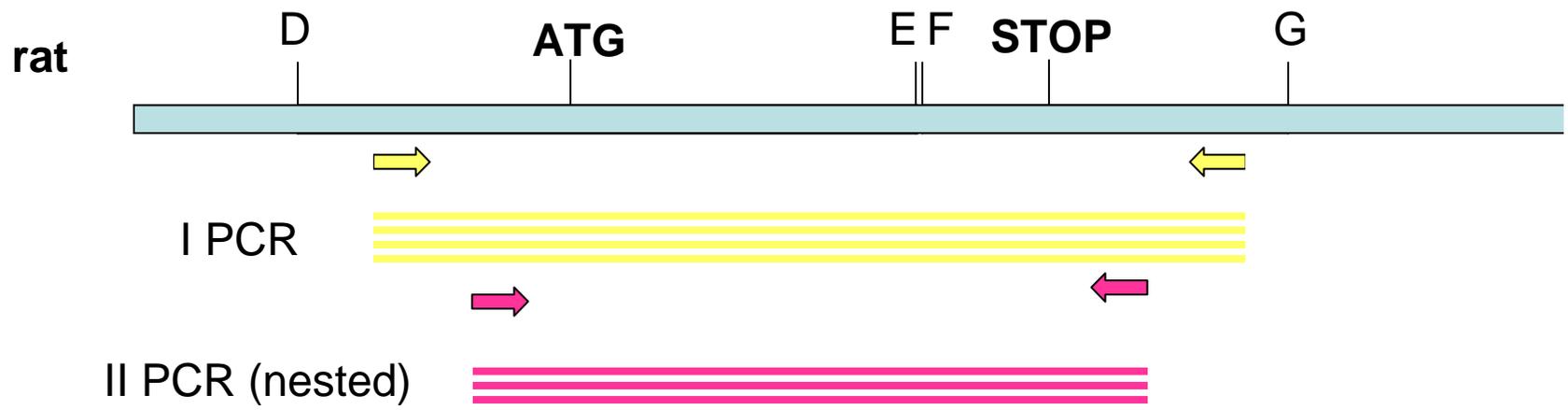
- 1 - Studio delle sequenze presenti in banca dati riguardanti la NRG1-typelll-beta 3
- 2 - Scelta dei primers per amplificare la NRG1-typelll-beta 3 di ratto (tenendo conto del fatto che poi la cloneremo *in frame* in un vettore esprimente la GFP).
- 3 - RT-PCR
- 4 - Clonaggio di NRG1-typelll-beta 3 in vettore pCR-bluntII-TOPO**
- 5 - Sequenziamento**
- 6 - Subclonaggio in vettore di espressione pEGFP-C3 (proteina ibrida NRG-EGFP)
- 7 - Subclonaggio in vettore di espressione pIRES-puro2
- 8 - Subclonaggio in vettore di espressione con coda FLAG per identificazione della proteina
- 9 - Subclonaggio di NRG1-typelll-beta3 in vettore virale adenoassociato pAAV-MCS
- 10 - Subclonaggio di NRG1-typelll-beta3-FLAG in vettore virale adenoassociato pAAV-MCS

NB Per ogni clonaggio e sub-clonaggio studio delle digestioni enzimatiche che consentono di verificare il corretto orientamento dell'inserto, con previsione delle bande attese in caso di clonaggio senso o antisenso

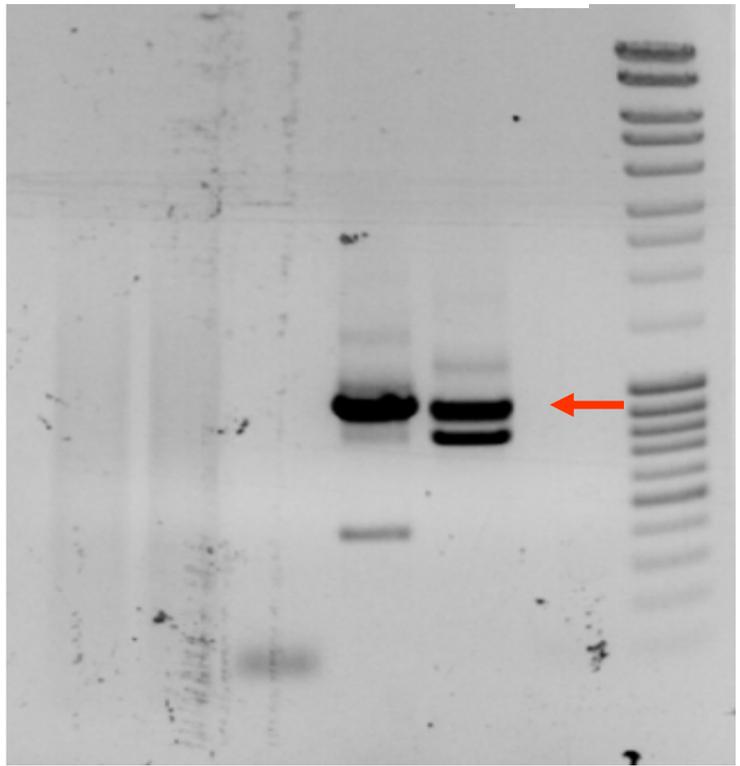


I PCR  
SC OB C

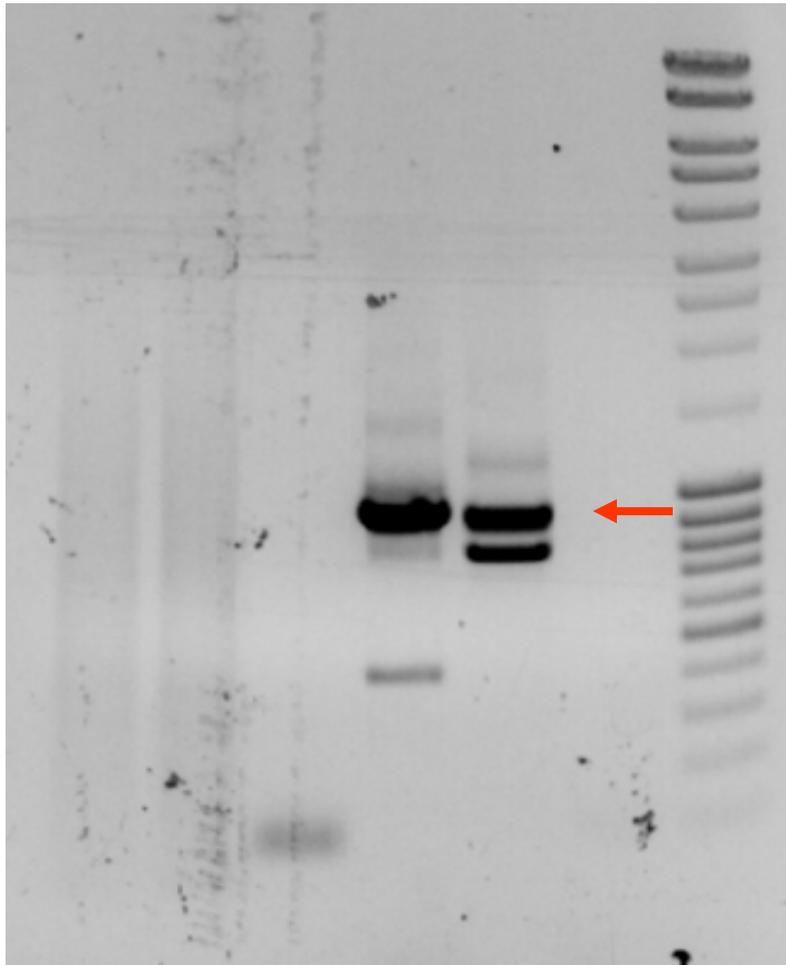




I PCR    Nested PCR  
 SC OB C    SC OB C



I PCR    Nested PCR  
SC OB C    SC OB C



\* ritaglio con una lametta le bande dal gel ed eluisco il DNA con un kit che mi permette di sciogliere l'agaroso

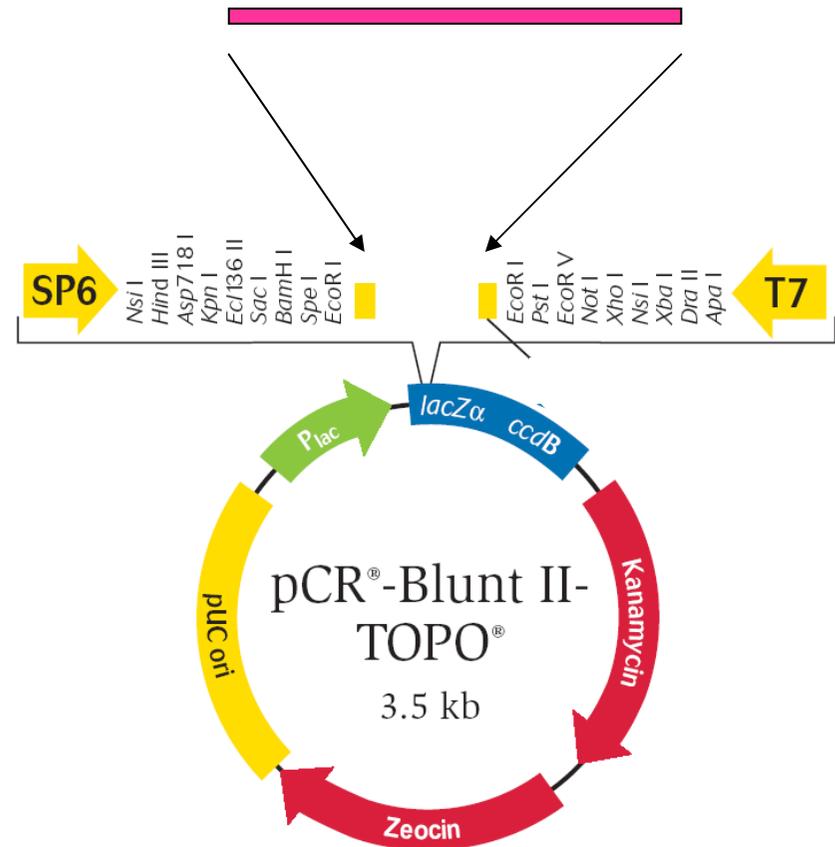
\* utilizzo il DNA ottenuto per la reazione di ligasi

SC=Schwann cells  
OB=olfactory bulb  
C=control (PCR mix)

## LIGASI CONTROLLO

Vettore		
Inserito		
10x ligasi buffer		
Acqua		
Ligasi		
tot	20µl	20µl

2 hours RT oppure over-night 4°C

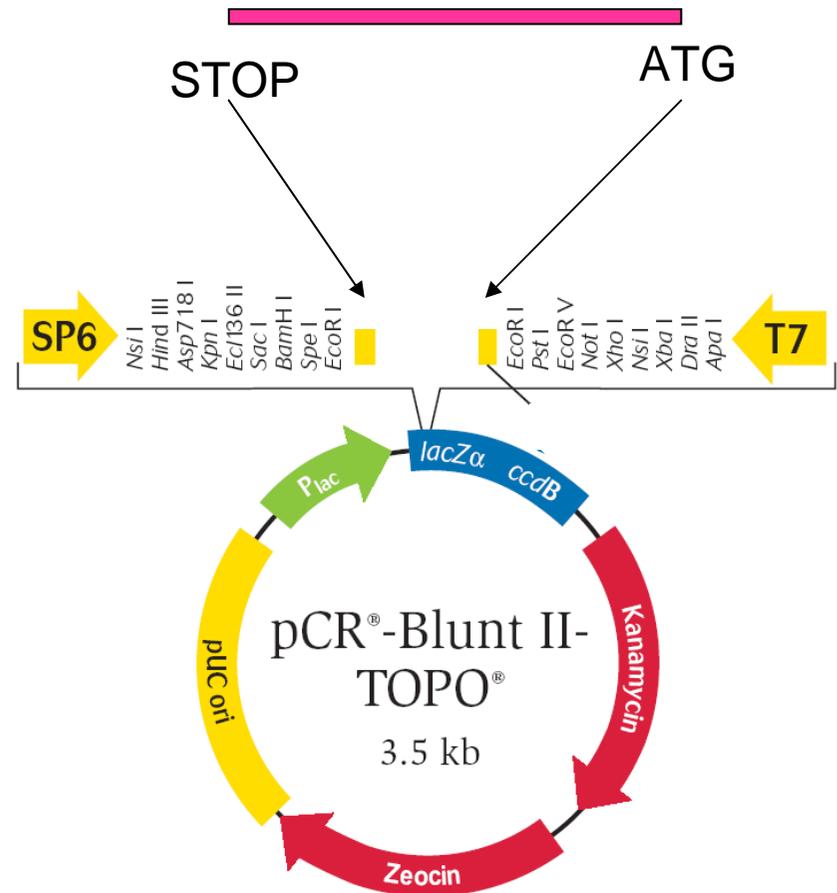
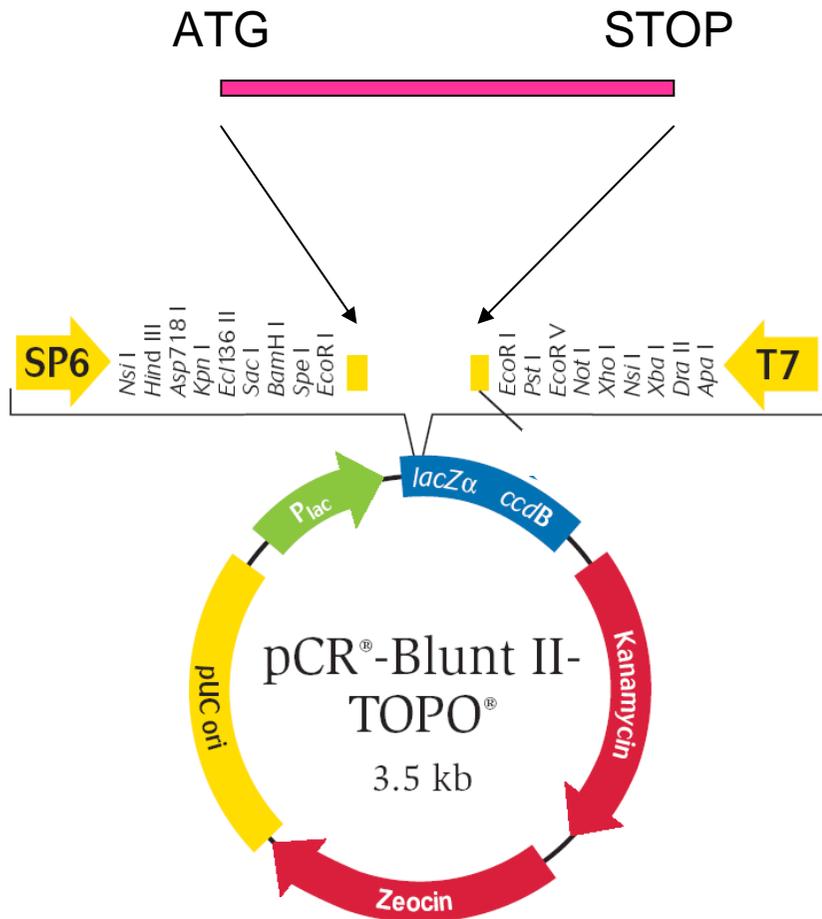


## PASSAGGI DALLA LIGASI ALLA SEQUENZA

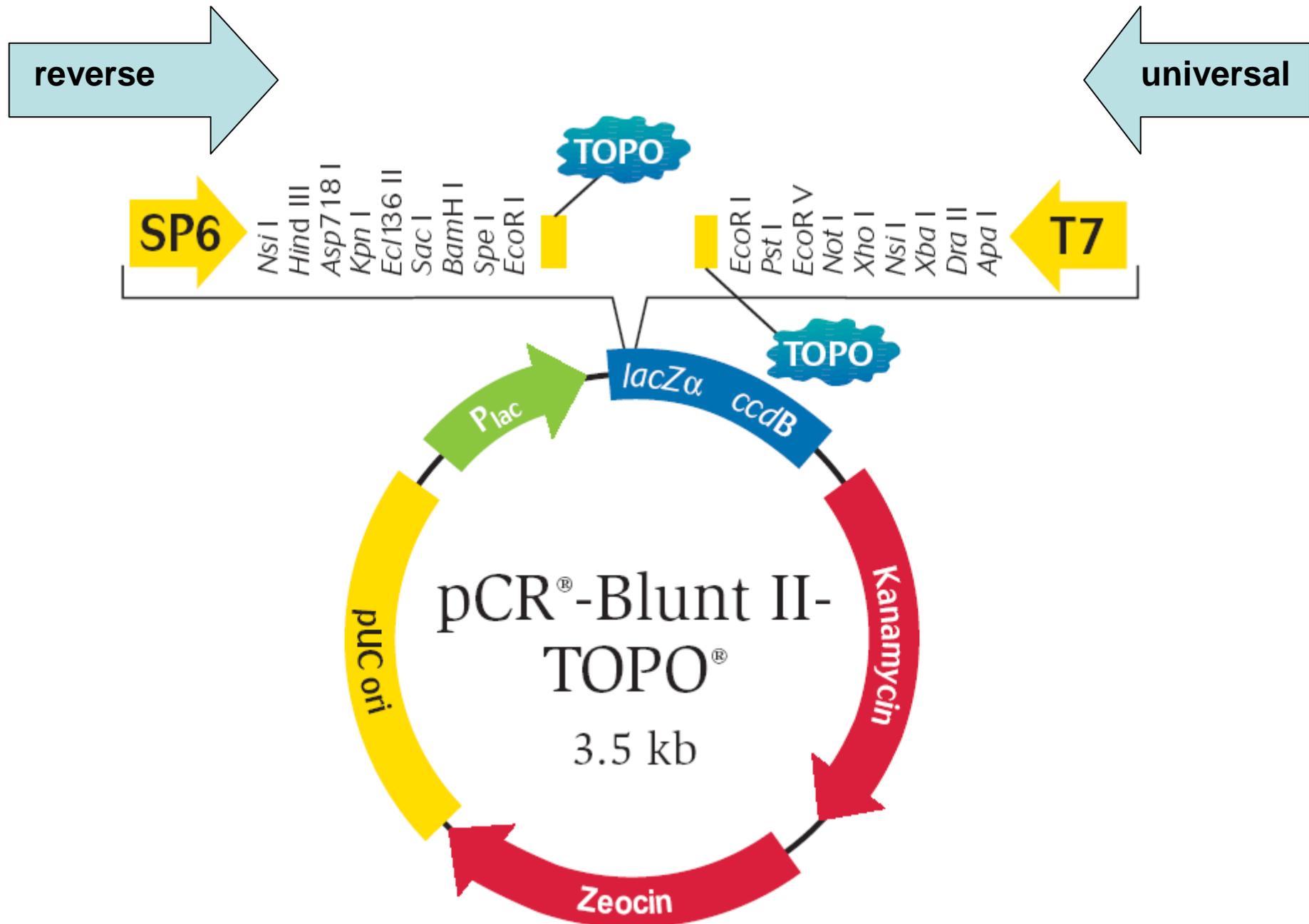
- \* Ligasi
  - \* Trasformazione batteri con la ligasi
  - \* Piastratura batteri su piastre Petri con terreno con antibiotico: quale? quanto?
  - \* Crescita over night a 37°C
  - \* Inoculo colonie cresciute in 3 ml terreno con antibiotico
  - \* Miniprep DNA plasmidico (usando un kit, quale? Quali fasi prevede il protocollo?)
  - \* Digestione di controllo per verificare la presenza dell'inserto: quale enzima di restrizione utilizzo?
  - \* Digestione di controllo per determinare l'orientamento dell'inserto: quale enzima di restrizione utilizzo? Quanto pesano le bande se l'orientamento è "senso"? Quanto se l'orientamento è "antisenso"?
- oppure:
- \* Sequenziamento utilizzando un primer a monte ed uno a valle dell'inserto

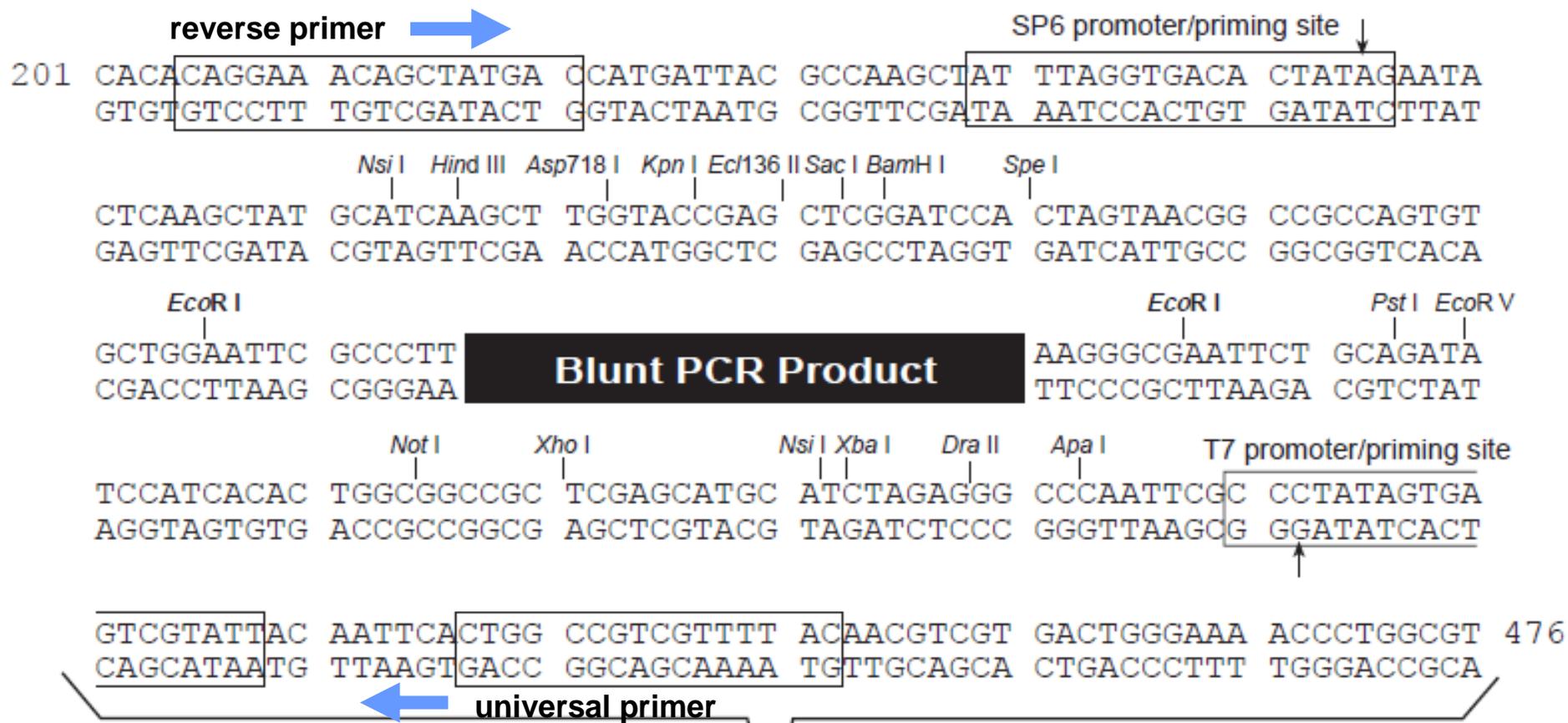
5' - ATG \_\_\_\_\_ TAG - 3'  
 3' - TAC \_\_\_\_\_ ATC - 5'

5' - CTA \_\_\_\_\_ CAT - 3'  
 3' - GAT \_\_\_\_\_ GTA - 5'

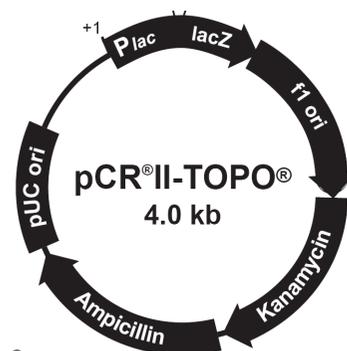


# Sequenze





**reverse primer:**  
 5-CAGGAAACAGCTATGAC-3'



**universal primer:**  
 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

reverse

## SEQUENZE

GCTTATTTG

5-GCTATTTGGCCATTGACCAATTGGCCAATTGAAATTGGCCATTTGGTAA-3'

3-CGATAAACCGGTAACCTGGTTAACCGGTTAACTTTAACCGGTAACCATT-5'

AAACCATT

universal

reverse

GCTTATTTG

CGATAAACCGGTAACCTGGTTAACCGGTTAACTTTAACCGGTAACCATT

GCTATTTGGCCATTGACCAATTGGCCAATTGAAATTGGCCATTTGGTAA

AAACCATT

universal

reverse

## SEQUENZE

GCTTATTTG

5-GCTATTTGGCCATTGACCAATTGGCCAATTGAAATTGGCCATTTGGTAA-3'  
3-CGATAAACCGGTAACCTGGTTAACCGGTTAACTTTAACCGGTA AACCAT T-5'

AAACCAT T

universal

reverse

GCTTATTTG

CGATAAACCGGTAACCTGGTTAACCGGTTAACTTTAACCGGTA AACCAT T

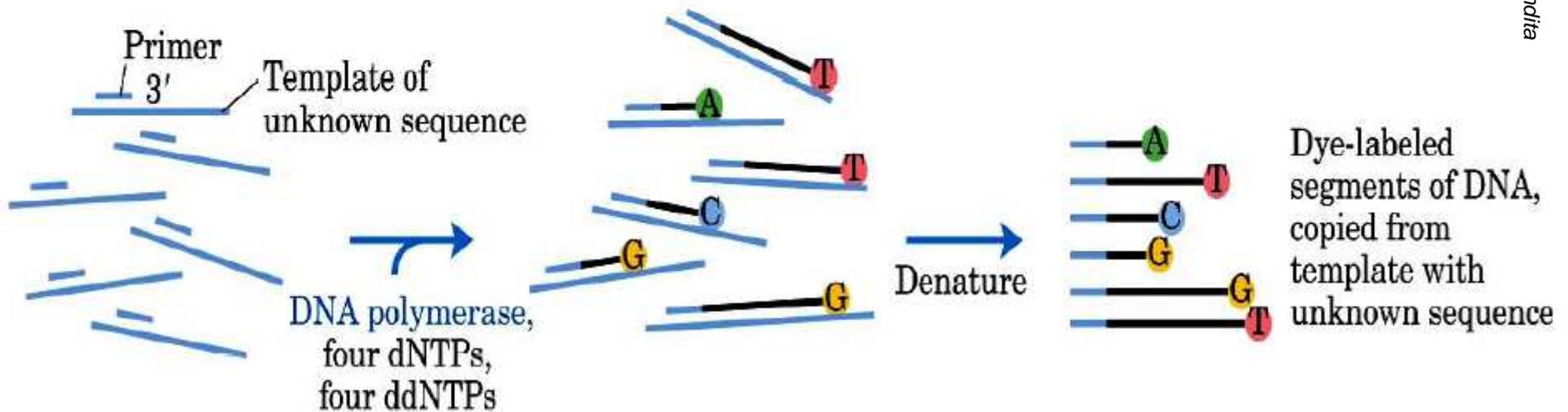
**Provate voi andando su Moodle!**

GCTATTTGGCCATTGACCAATTGGCCAATTGAAATTGGCCATTTGGTAA

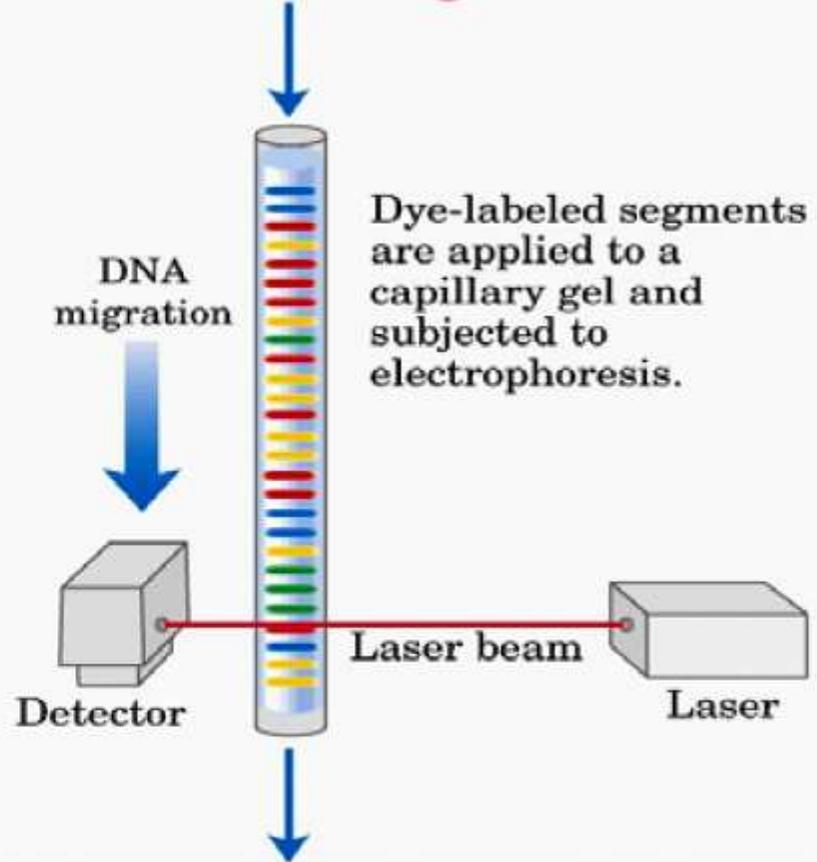
AAACCAT T

universal

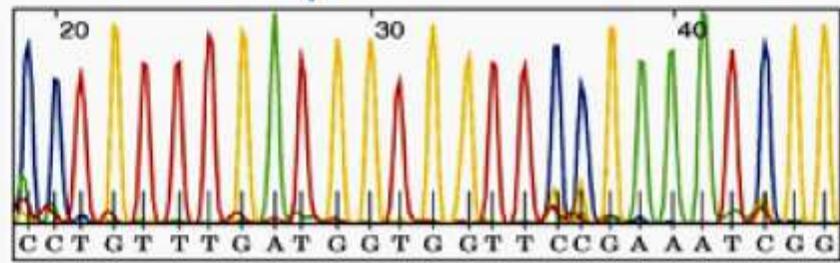
i nucleotidi dideossi-terminatori sono marcati mediante l'aggiunta di un gruppo chimico fluorogeno, diverso per ogni base.



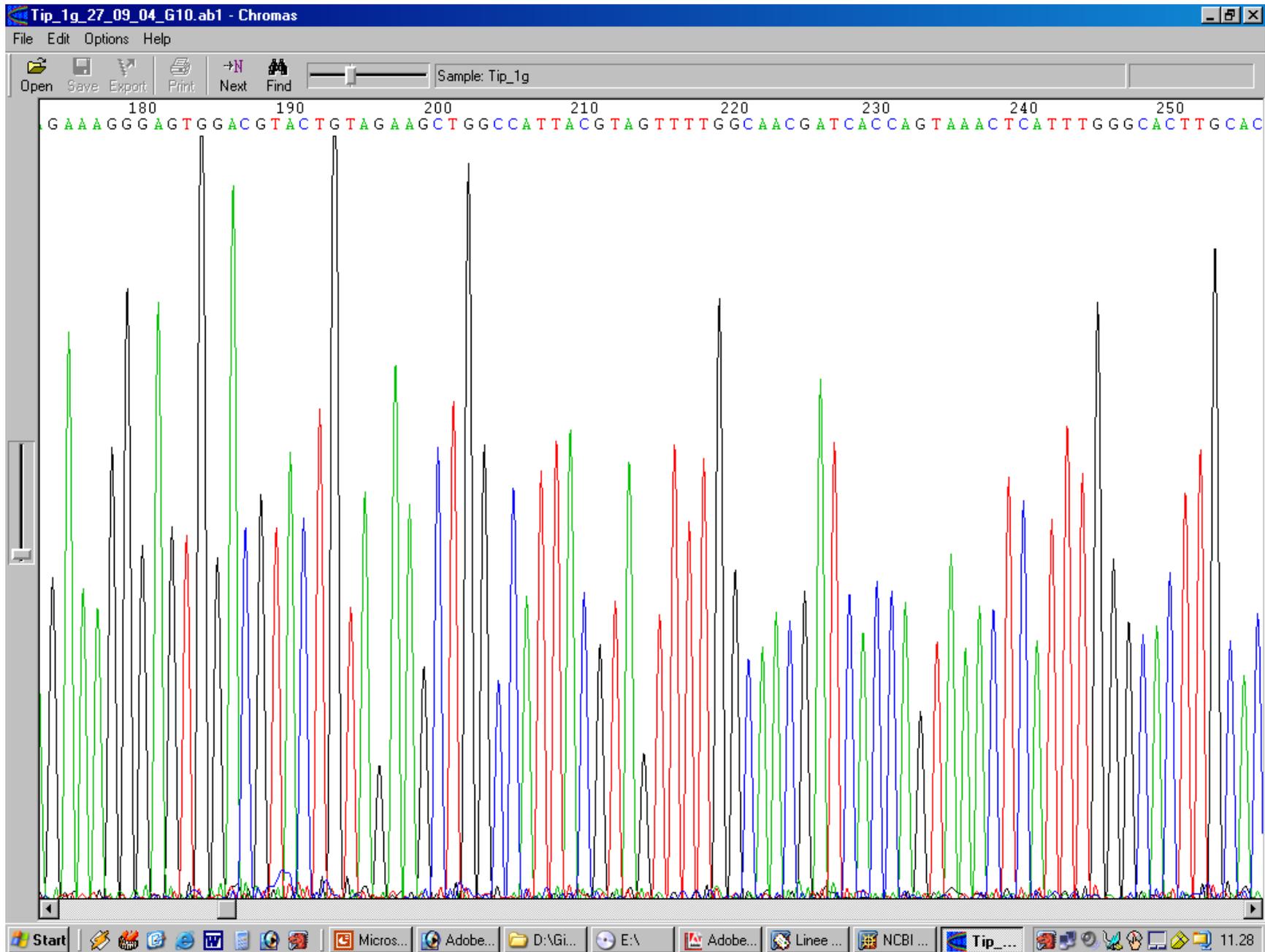
Dye-labeled segments of DNA, copied from template with unknown sequence

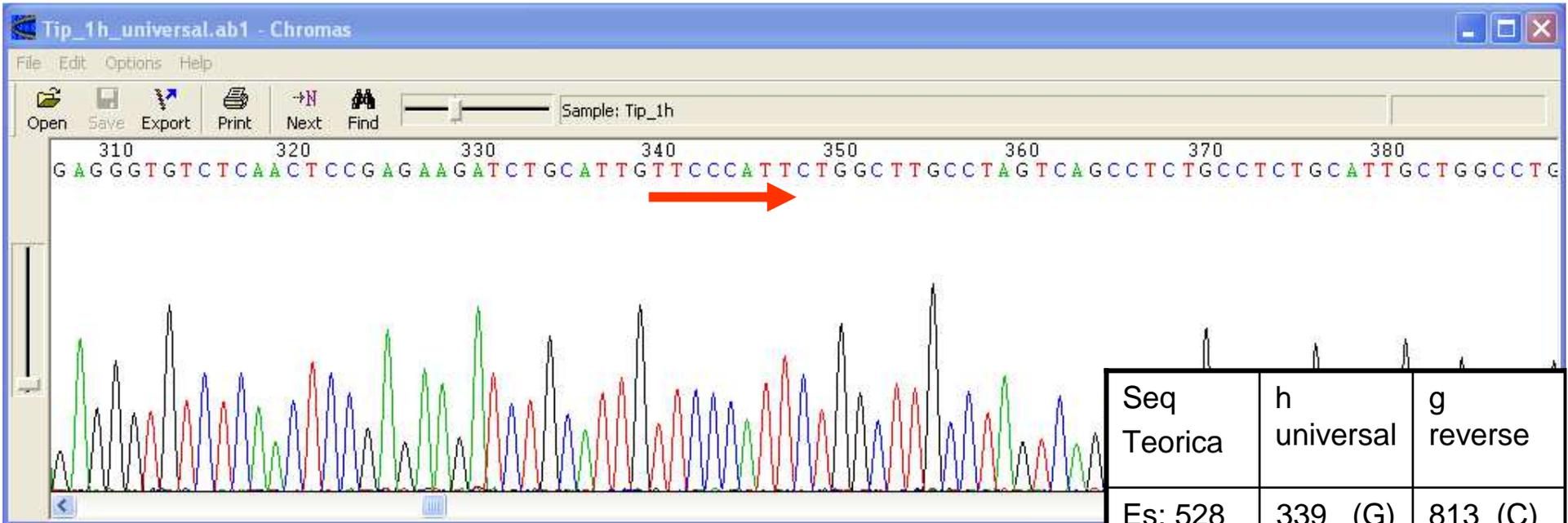


Dye-labeled segments are applied to a capillary gel and subjected to electrophoresis.

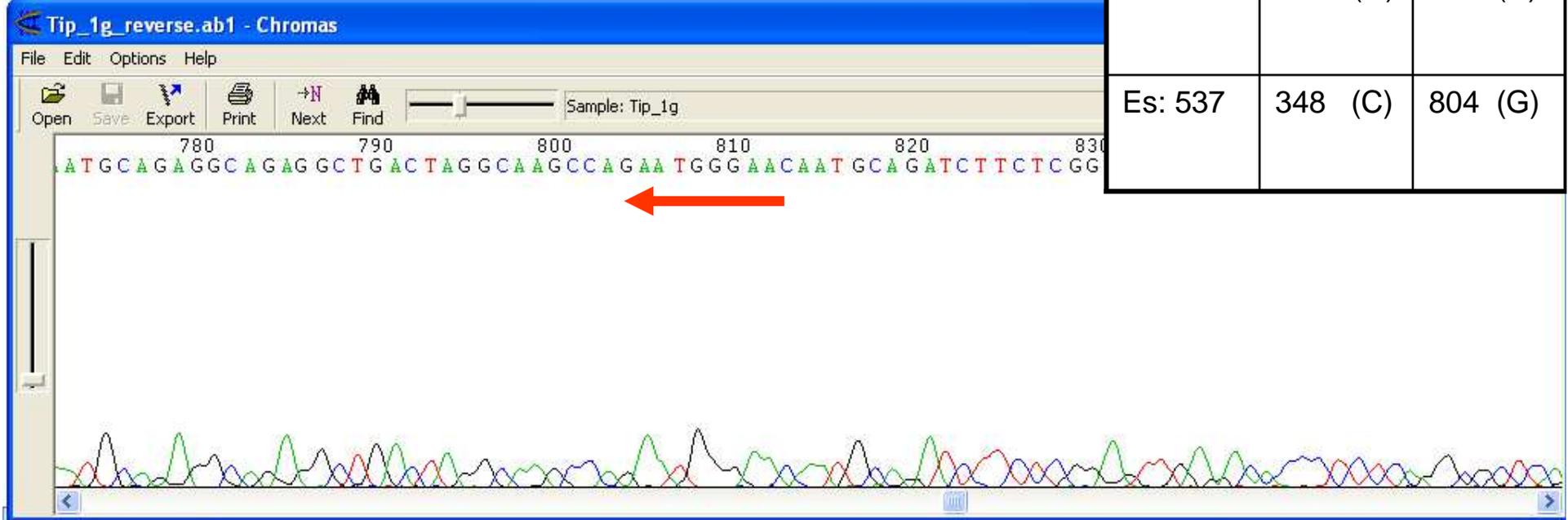


Computer-generated result after bands migrate past detector





Seq Teorica	h universal	g reverse
Es: 528	339 (G)	813 (C)
Es: 537	348 (C)	804 (G)



## Sequenze

# primer

1a reverse  
1b universal

1c reverse  
1d universal

1e reverse  
1f universal

1g reverse  
1h universal

banda bassa bulbo olfattivo

banda alta bulbo olfattivo

banda bassa cellule Schwann

banda alta cellule Schwann

## Elettroferogrammi

1a  
1b

1c  
1d

1e  
1f

1g  
1h



\* analizzate le sequenze delle bande alte per verificare la correttezza del clonaggio, capire l'orientamento dell'inserito ed identificare quale/i bande utilizzare per gli esperimenti successivi

\* A questo scopo potete aprire le sequenze **.seq** con il programma Block Notes, copiarle e confrontarle con la “sequenza teorica di ratto” analizzandole con **align two sequences (bl2seq)**

\* come Query (prima finestra) utilizzate la vostra “sequenza teorica di ratto”

\* come Sbjct (seconda finestra) utilizzate le sequenze .seq che volete analizzare (c,d, g, h)

\* segnatevi le coordinate delle mutazioni sulla sequenza teorica (Query) e sulle sequenze Sbjct in modo da poter confrontare - per ogni mutazione - c, con d con la teorica e g con h con la teorica.



RID=1069926819-23018-68631912901.BLASTQ3, - Mozilla {Build ID: 2003052908}

File Edit View Go Bookmarks Tools Window Help Debug QA

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi

Home Bookmarks mozilla.org Latest Builds METEO CNN It...

```
Query: 333  ttaaaatgtgtaagccttgcaactgatatttgccecaagcatgtgatggaatcggcaccg 392
            |||
Sbjct: 992  ttaaaatgtgtaagccttgcaactgatatttgccecaagcatgtgatggaatcggcaccg 1051

Query: 393  gatccttgatgtctgctcagactgtggattccagtaacattgacaaaatccataaactgca 452
            |||
Sbjct: 1052 gatccttgatgtctgctcagactgtggattccagtaacattgacaaaatccataaactgca 1111

Query: 453  ccaagatcaacgggaatctcatctttctgtcactggcattcatggtgacccttacaatg 512
            |||
Sbjct: 1112 ccaagatcaacgggaatctcatctttctgtcactggcattcatggggacccttacaatg 1171

Query: 513  ctattgacgcatagaccagagaaactgaatgtctttcggacagtcagagaaataacag 572
            |||
Sbjct: 1172 ctattgacgcatagaccagagaaactgaatgtctttcggacagtcagagaaataacag 1231

Query: 573  gtttctgaacatacaatcttggcccccaaatatgacagatttcagtgttttctccaacc 632
            |||
Sbjct: 1232 gtttctgaacatacagacttggcccccaaatatgacagatttcagtgttttctccaacc 1291

Query: 633  ttgtaaccattggaggaagagtcctctacagtggctctcattgcttaccctcaacaac 692
            |||
Sbjct: 1292 ttgtaaccattggaggaagagtcctctacagtggctctcattgcttaccctcaacaac 1351

Query: 693  aaggtatcacttcactacagttccagtc 720
            |||
Sbjct: 1352 aaggtatcacttcactacagttccagtc 1379
```

-polimorfismi?  
-mutazioni?  
-errori durante il sequenziamento?

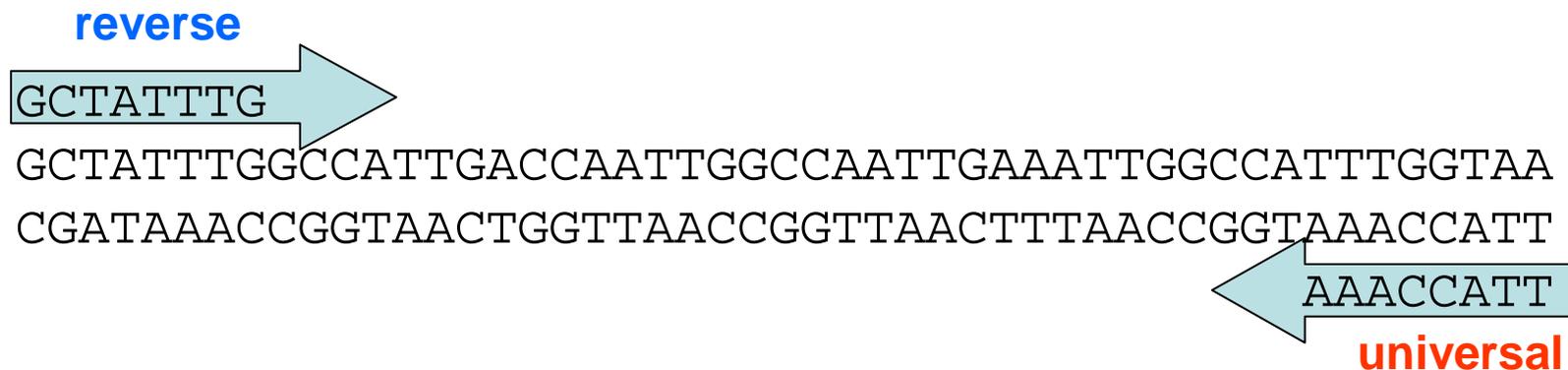
Start | D:\Giovanna\ErbB4sequ... | Microsoft PowerPoint - [...] | NCBI Blast - Mozilla {Buil... | Adobe Photoshop | 10.58 | giovedì

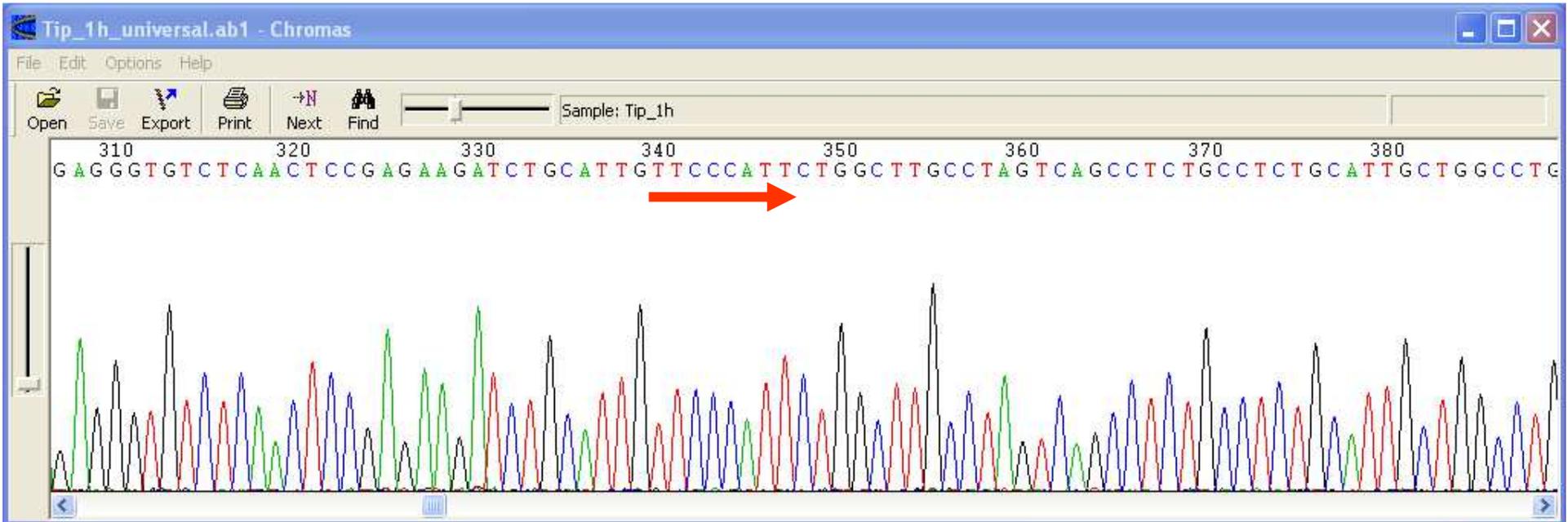
Adobe Reader - [Elenius... | ba.seq - Blocco note | RID=1069926819-23...

Per verificare eventuali diversità di sequenza, puoi andare ad analizzare gli elettroferogrammi **.ab1** utilizzando il programma **Chromas**; in questo modo si identifica il picco corrispondente alla sospetta mutazione e si verifica l'errore

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

**NB** Le sequenze sono tanto più corrette, quanto più vicine al primer; se le regioni ambigue si trovano in regioni con una numerazione elevata (>800), è possibile risolvere l'ambiguità analizzando la sequenza complementare ottenuta con l'altro primer





- confrontate una alla volta le sequenze delle “bande alte” corrispondenti alla NRG1 (c/d e g/h) con la NRG1 “teorica” che avete disegnato
- preparate una tabella con elencate le mutazioni che osservate sulla sequenza senso e su quella antisenso, segnando - per ogni nucleotide mutato - la numerazione sia nella sequenza teorica, sia nella sequenza fornita dal sequenziatore, sia il tipo di mutazione (es: A -> G)
- confrontate le mutazioni trovate nella sequenza senso con quelle trovate nella sequenza antisenso (se una mutazione si trova solo su una delle due sequenze e con una numerazione alta, dunque lontana dal primer, è probabile che sia un errore di sequenziamento e non una vera mutazione: andate sul file del cromatogramma e cercate di capire se il picco che vedete è il nucleotide atteso).
- cercate di capire se uno dei due cloni (c/d o g/h), e quale, è privo di mutazioni (o presenta mutazioni innocue) e dunque è adatto per il clonaggio successivo nel vettore con la GFP