

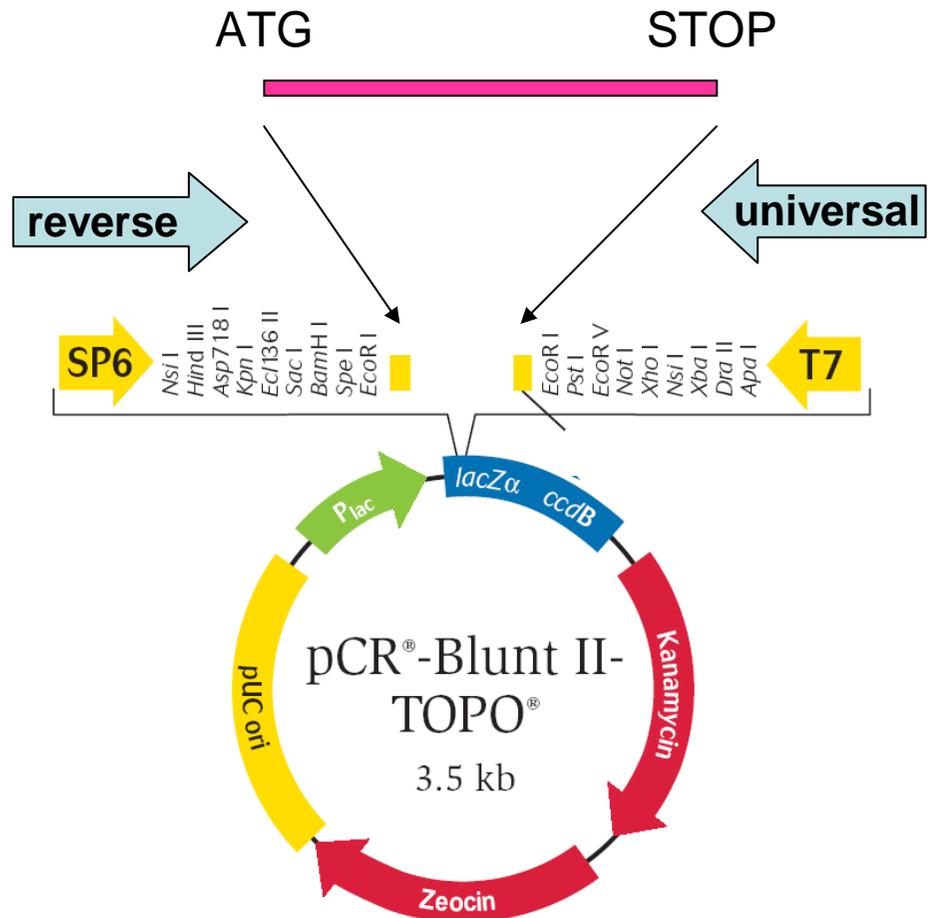
PROGETTO DETTAGLIATO BIOTECNOLOGIE CELLULARI

- 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 (17 novembre 2014)**
- 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

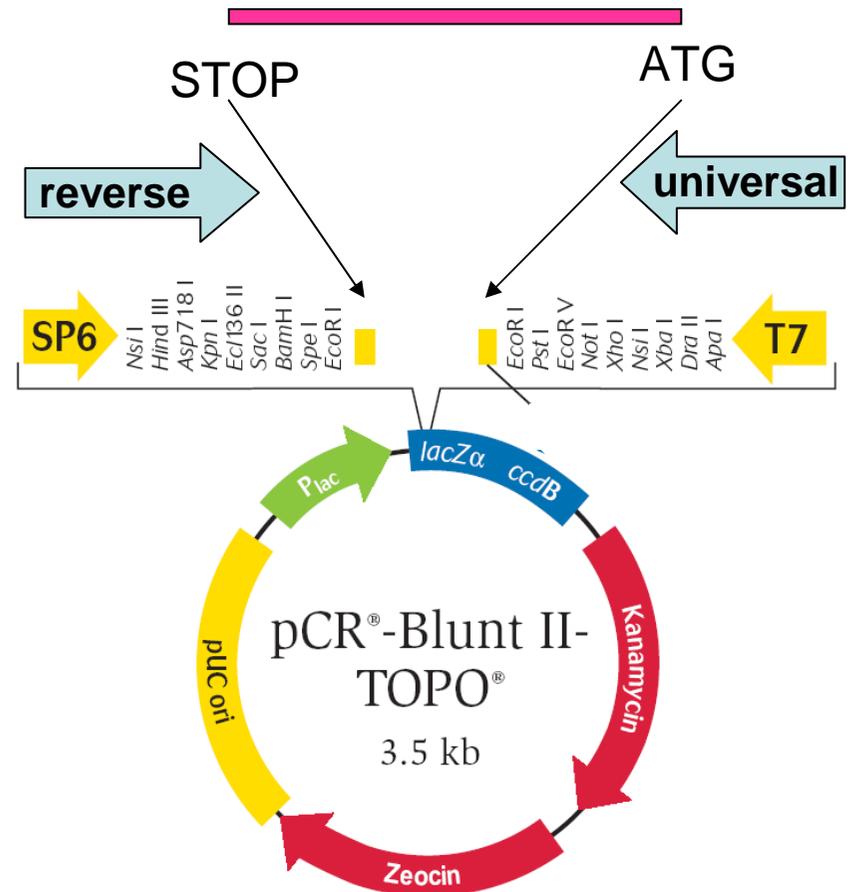
SENSO

5' - **ATG**CGTACCTTTAACTCG**TAG** - 3'
 3' - TACGCATGGAAATTGAGCATC - 5'



ANTISENSO

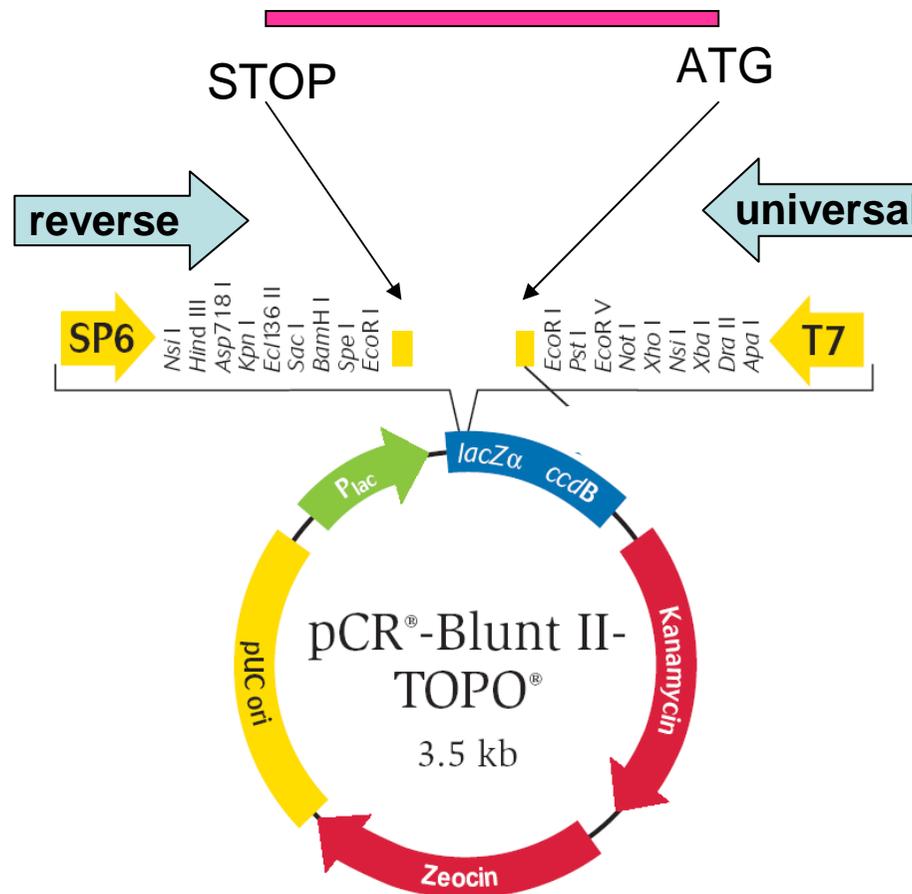
5' - CTACGAGTTAAAGGTACGCAT - 3'
 3' - **GAT**GCTGAATTTCCATGCG**GTA** - 5'

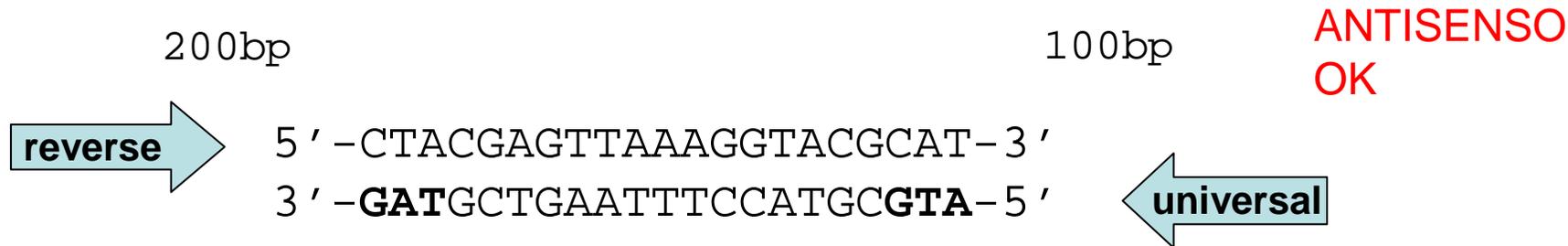


ANTISENSO



5' - CTACGAGTTAAAGGTACGCAT - 3'
3' - **GATGCTGAATTTCCATGCGTA** - 5'



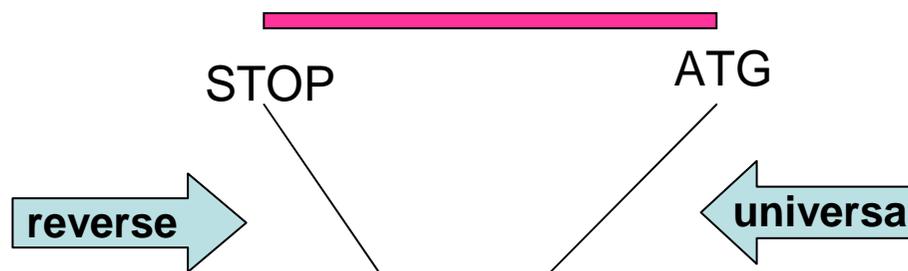


REVERSE: NNNNNNNCTACGAGTTAAAGGTACGCATNNNNNNN
 UNIVERSAL: NNNNNNN**ATGCGTACCTTTAACTCGTAG**NNNNNNN

BLAST:

Query: 1 **ATGCGTACCTTTAACTCGTAG** 21
 |||
 Subjt Reverse: 221 **ATGCGTACCTTTAACTCGTAG** 201

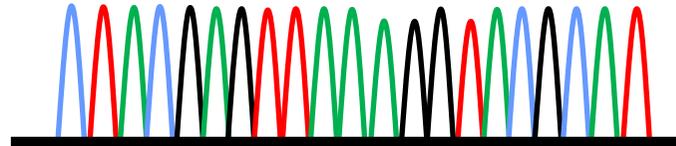
Query: 1 **ATGCGTACCTTTAACTCGTAG** 21
 |||
 Subjt Universal: 101 **ATGCGTACCTTTAACTCGTAG** 121



ANTISENSE
OK

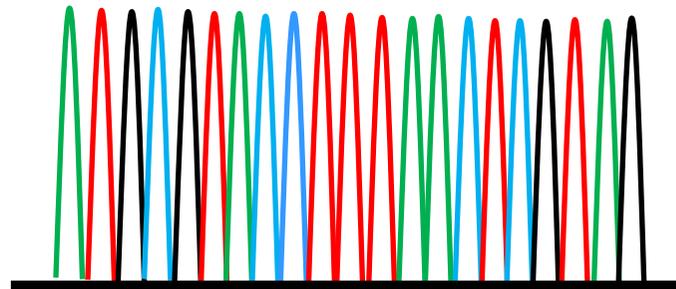
REVERSE :

NNNNNNNNCTACGAGTTAAAGGTACGCATNNNNNNNN



UNIVERSAL :

NNNNNNNNATGCGTACCTTTAACTCGTAGNNNNNNNN



REVERSE :

NNNNNNNNCTACGAGTTAAAGGTACGCATNNNNNNNN

UNIVERSAL :

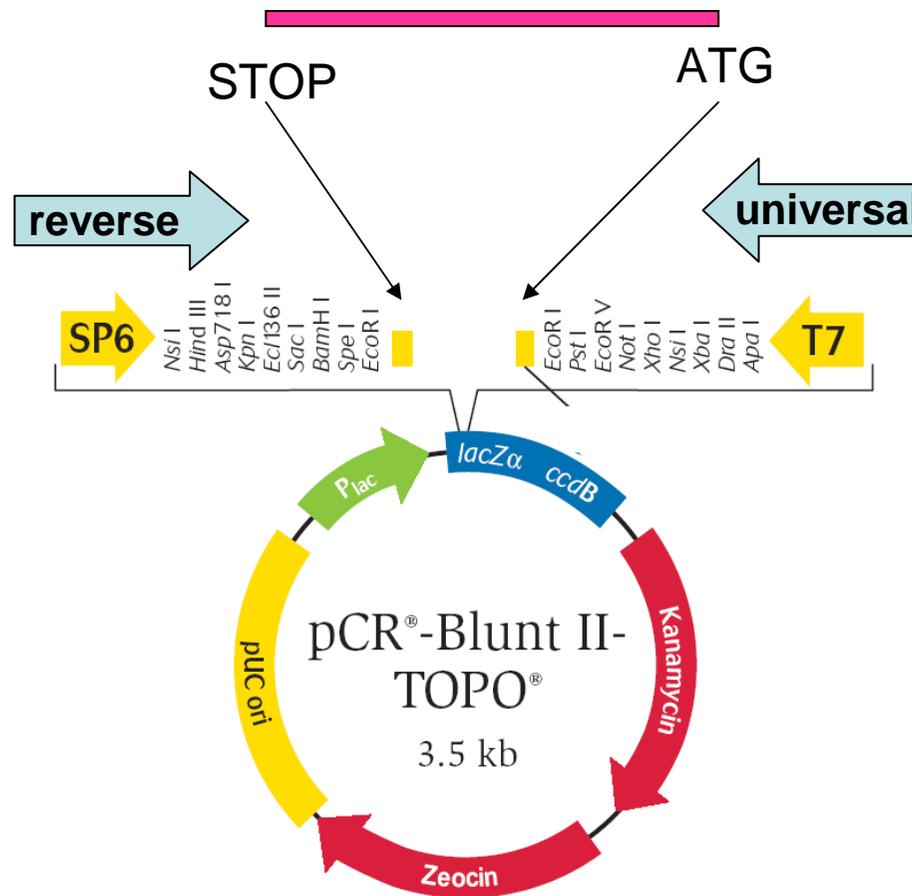
NNNNNNNN**ATGCGTACCTTTAACTCGTAG**NNNNNNNN

C -> T

ANTISENSO
MUTATO



5' - CTACGAGTTAAA**A**GTACGCAT - 3'
3' - **GAT**GCTGAATTT**T**CATGCG**T**A - 5'





REVERSE: NNNNNNNCTACGAGTTAAA**A**GTACGCATNNNNNNN
 UNIVERSAL: NNNNNNN**ATG**CGTAC**T**TTTAACTCG**TAG**NNNNNNN

BLAST:

```

Query:                1  ATGCGTACCTTTAACTCGTAG 21
                       ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Subjct Reverse:      221 ATGCGTACTTTTAACTCGTAG 201

Query:                1  ATGCGTACCTTTAACTCGTAG 21
                       ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Subjct Universal:    101 ATGCGTACTTTTAACTCGTAG 121
  
```

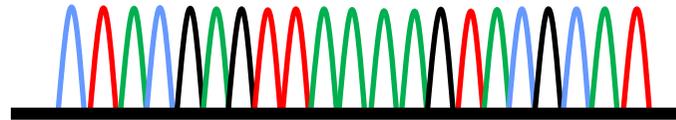
Identifico la posizione della mutazione sulle sequenze Query, Reverse ed Universal:

Query	Reverse	Universal
9	213	109

ANTISENSE
MUTATO

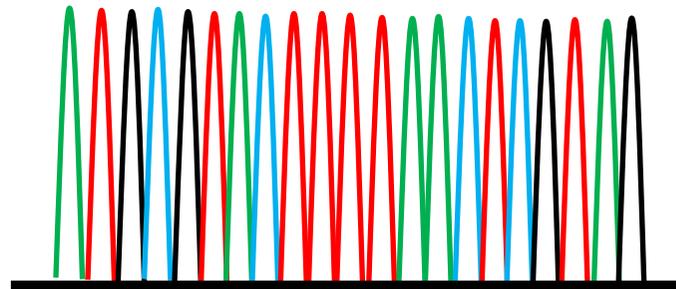
REVERSE :

213
|
NNNNNNNNCTACGAGTTAAAAGTACGCATNNNNNNNN



UNIVERSAL :

109
|
NNNNNNNNATGCGTACTTTTAACTCGTAGNNNNNNNN



REVERSE :

NNNNNNNNCTACGAGTTAAA**A**GTACGCATNNNNNNNN

UNIVERSAL :

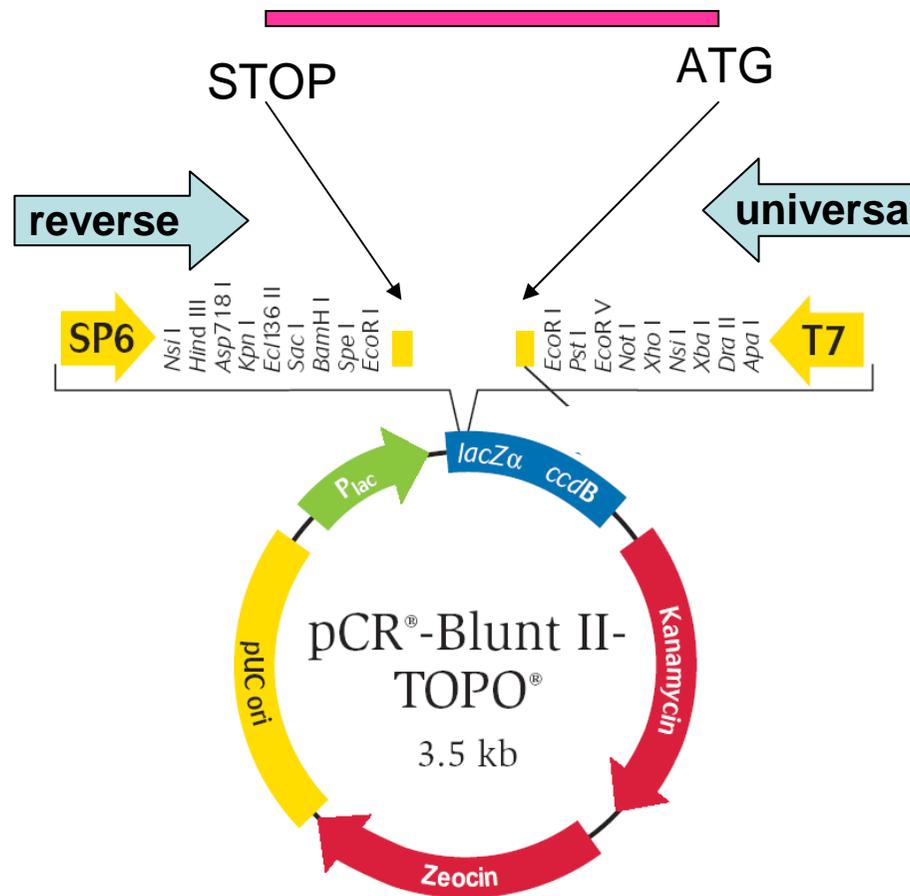
NNNNNNNN**A**TGCGTACT**T**TTTAACTCG**TAG**NNNNNNNN



5' - CTACGAGTTAAAGGTACGCAT - 3'
3' - **GAT**GCTGAATTTCCATGCG**T**A - 5'



ANTISENSO
con ERRORE
di SEQUENZA



213

|

REVERSE :

NNNNNNNNCTACGAGTTAAAAGTACGCATNNNNNNNN



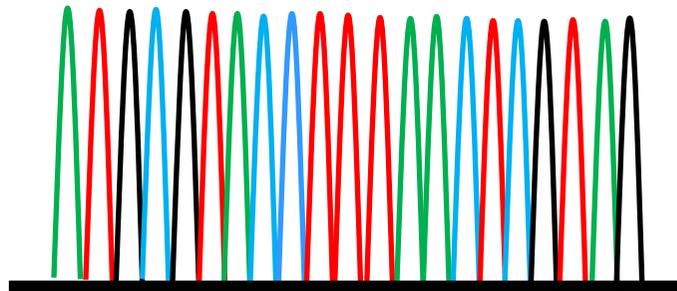
ANTISENSO
con ERRORE
sulla
SEQUENZA
REVERSE

109

|

UNIVERSAL :

NNNNNNNNATGCGTACCTTTAACTCGTAGNNNNNNNN



REVERSE :

NNNNNNNNCTACGAGTTAAAAGTACGCATNNNNNNNN

UNIVERSAL :

NNNNNNNN**ATGCGTACCTTTAACTCGTAG**NNNNNNNN

seq teorica di riferimento (NRG1-III-beta3) Posizione della mutazione sulla sequenza	c posizione sulla sequenza	d posizione sulla sequenza		
seq teorica di riferimento (NRG1-III-beta3) Posizione della mutazione sulla sequenza			g posizione sulla sequenza	h posizione sulla sequenza

24 novembre 2014

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 esprime 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 antisense

Sequenze

primer

1c [reverse](#)
1d [universal](#)

1g [reverse](#)
1h [universal](#)

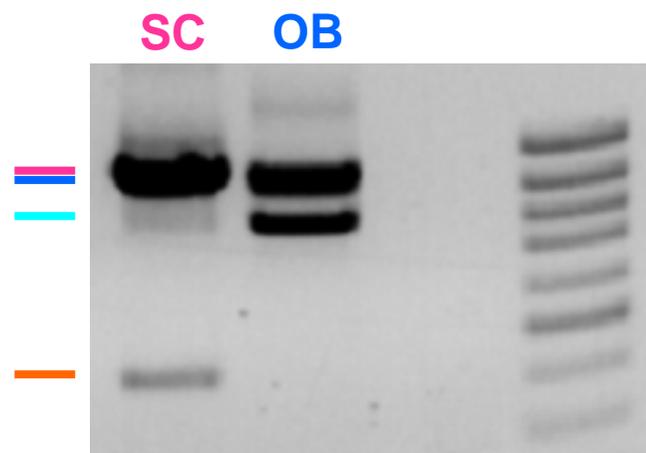
banda alta bulbo olfattivo

banda alta cellule Schwann

Elettroferogrammi

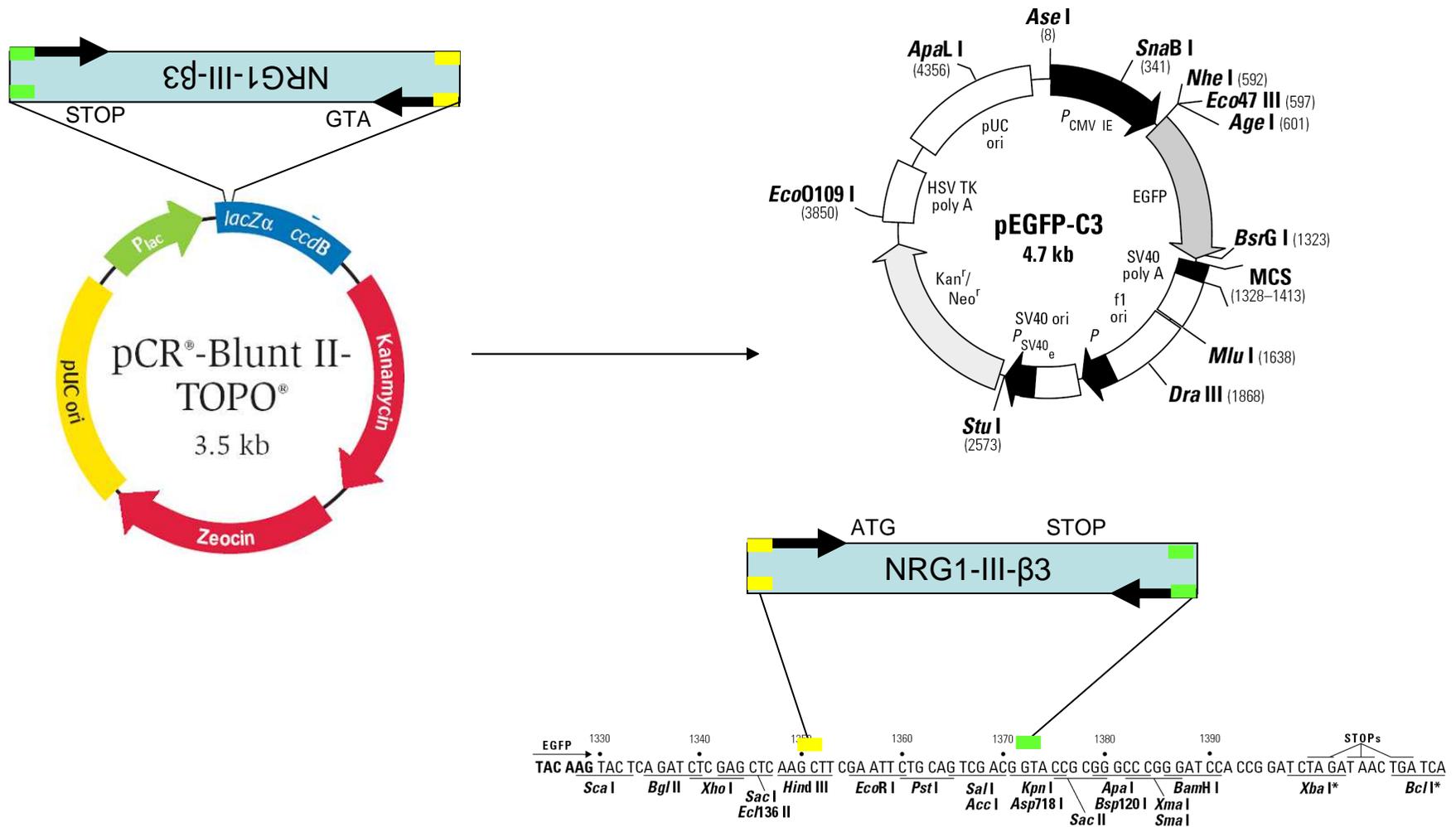
[1c](#)
[1d](#)

[1g](#)
[1h](#)



Scegliete uno dei due cloni positivi che avete sequenziato

sia c/d che g/h sono stati clonati antisenso



Per trasferire l'inserto dal vettore pCR-bluntII TOPO al nuovo vettore dovrete procedere con due digestioni enzimatiche, con l'enzima di restrizione che taglia sul primer a monte (giallo) e con l'enzima di restrizione che taglia sul primer a valle (verde).

per tutti i subclonaggi che dovrete fare:

- tagliate con il primo enzima (verificate su gel che abbia tagliato)
- tagliate con il secondo enzima (verificate su gel che abbia tagliato)

Il DNA del costrutto pCR-BluntII-TOPO-NRG1-III- β 3 è concentrato 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
il DNA del vettore pEGFP-C3 è concentrato 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

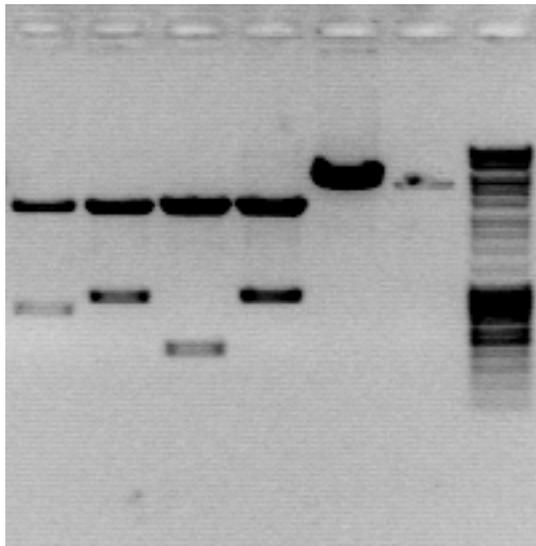
Progettate una reazione di digestione con il primo enzima, per entrambi i plasmidi; verificate, consultando il catalogo del sito NEB on line (o di altre ditte), se il buffer del primo enzima è compatibile con quello del secondo enzima o se il buffer di un enzima non possa essere trasformato (con l'aggiunta di qualche ingrediente) nel buffer dell'altro enzima (altrimenti, è necessario purificare il DNA su colonnina fra le due digestioni).

Se i due buffer sono molto diversi, dopo aver effettuato la digestione col primo enzima controllate (correndo 2 μl su gel di agaroso) che il DNA sia stato effettivamente digerito: dopodiché purificate il DNA caricandolo su colonnina e lo eluite in 50 μl di acqua.

- Progettate le digestioni per spostare l'inserto contenente la NRG1 dal costrutto pCR-BLUNT-NRG1 a pEGFP-C3.

- In seguito progetterete le digestioni per spostare l'inserto nei vettori pIRES-puro, pCMV-Tag4, pAAV-CMV, ed infine l'inserto con FLAG da pCMV-Tag4 a pAAV-MCS.

1 2 3 4 5



Costrutti digeriti con i 2 enzimi di restrizione per prelevare l'inserto e subclonarlo in pEGFP-C3

1=banda bassa OB

2=banda alta OB

3=banda bassa SC

4=banda alta SC

5=vettore pEGFP-C3 digerito con i 2 enzimi di restrizione

- dopo aver digerito i vettori di subclonaggio (pEGFP-C3 e, nei prossimi passaggi, pIRES-puro, pCMV-TAG, pAAV-MCS) con l'enzima/gli enzimi, è consigliabile una reazione di defosforilazione per ridurre il rischio che il vettore si richiuda

- si aggiunge 1 μ l di fosfatasi alcalina

- si lascia agire 30' a 37°C

- si inattiva scaldando 20' a 65°C

- si eliminano le tracce di fosfatasi alcalina con un'estrazione con fenolo cloroformio

- su gel carichiamo le digestioni per recuperare gli inserti e i vettori tagliati e defosforilati (**quanto devono pesare le bande che ritagliamo?**)

- utilizzando un apposito kit recuperiamo le bande di inserti e vettori

- impostiamo una reazione di ligasi; ad esempio:

	LIGASI	CONTROLLO
inserto	15 μ l	-----
vettore	1 μ l	1 μ l
buffer 10x	2 μ l	2 μ l
ligasi	1 μ l	1 μ l
H2O	-----	15 μ
<hr/>		
tot	20 μ l	20 μ l

- trasformazione dei batteri con le due ligasi (ligasi e controllo)
- quale antibiotico dovete utilizzare?
- a quale concentrazione?

- il mattino successivo sono cresciute alcune colonie
- recuperate alcune di loro e le fate crescere tutta la notte in agitazione in 3 ml di terreno con antibiotico
- il mattino successivo estraete il DNA (miniprep)

- **come fate a verificare che l'inserto sia entrato?**
- **dovete verificarne l'orientamento?**

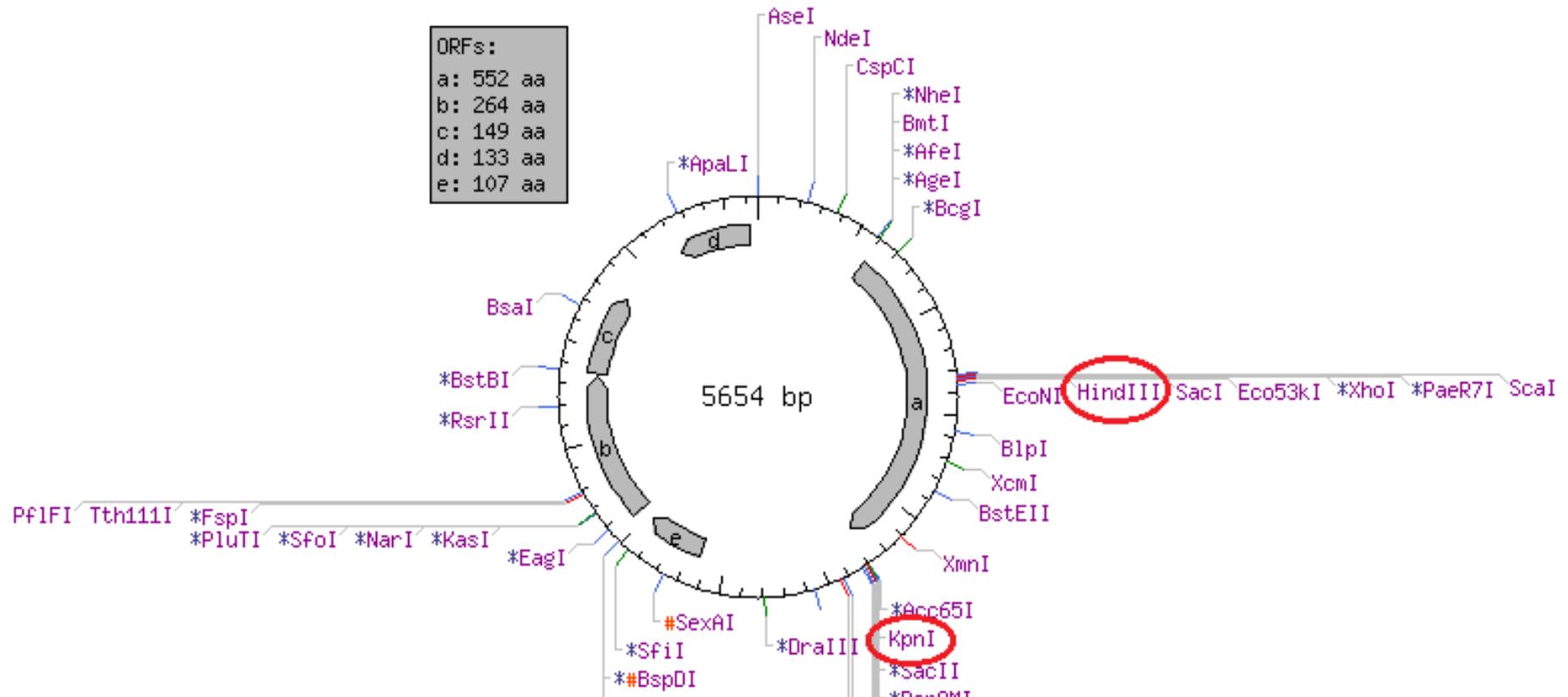
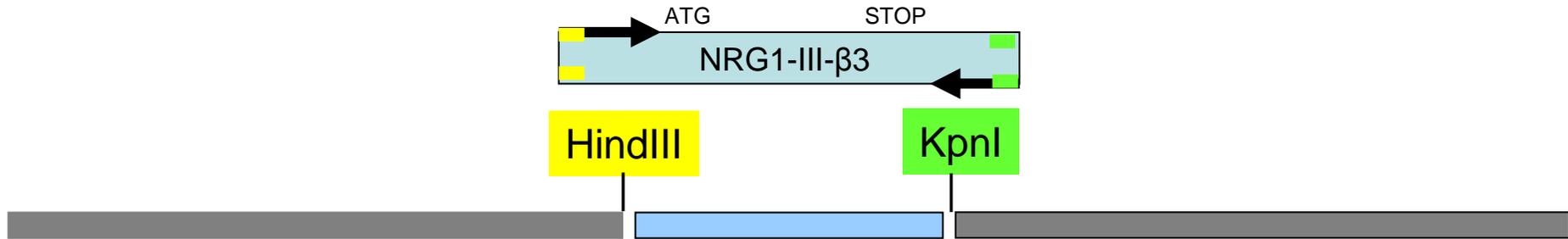
- progettate una digestione di controllo con uno o più enzimi di restrizione che consenta di verificare la presenza dell'inserto nel nuovo vettore

- quanto pesano le bande che otterrete con la digestione di controllo se l'inserto è entrato correttamente?

- con NEB cutter, costruite la mappa che vi attendete per pEGFP-C3-NRG1: **unite i vari pezzi di sequenza (vettore e inserto) in un unico file di testo e poi li inserite in NEB cutter, segnalando che si tratta di DNA circolare e NON lineare**
- eseguite la digestione virtuale di controllo del vostro costrutto

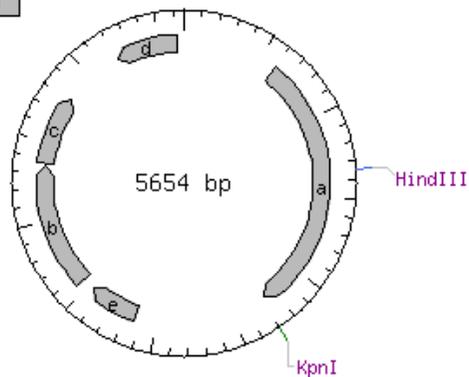
- troverete le sequenze dei vettori nella cartella dedicata al materiale per il corso

Esempio: se sui vostri due primers avete usato come enzimi di restrizione **HindIII** e **KpnI** in un file di testo incollate il vettore pEGFP-C3 fino ad HindIII, poi il vostro prodotto di PCR dal primer a monte al primer a valle, poi il vettore da KpnI in poi (il sito di restrizione dopo la ligasi si ricostituisce, quindi scrivetelo solo una volta)



Su NEB cutter potete effettuare una digestione di controllo eseguendo una “custom digestion”, ossia scegliendo voi quali siti di restrizione utilizzare, ad esempio HindIII e KpnI. Se identificate un unico sito di restrizione che tagliando 2 volte nel costrutto estrae una banda, è meglio, perché potete effettuare una sola digestione anziché 2.

ORFs:
a: 552 aa
b: 264 aa
c: 149 aa
d: 133 aa
e: 107 aa



Custom Digest

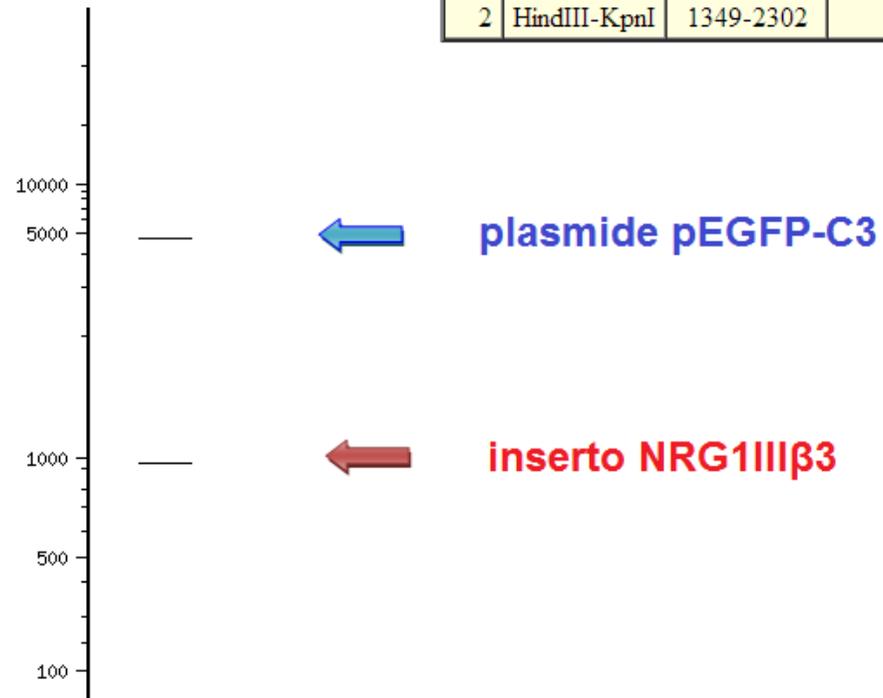
unnamed sequence - digested with: HindIII, KpnI

Gel Type: 0.7% agarose
L= 102 mm OK

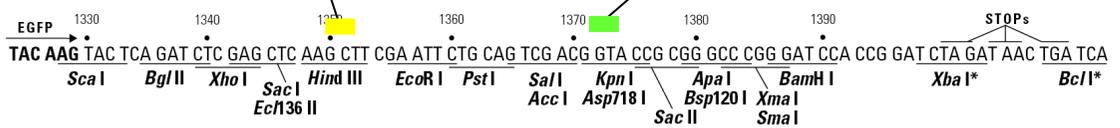
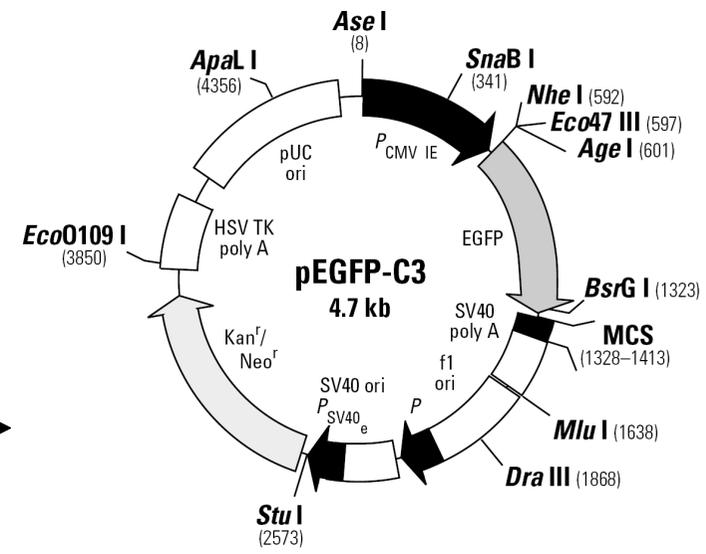
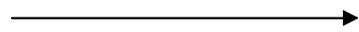
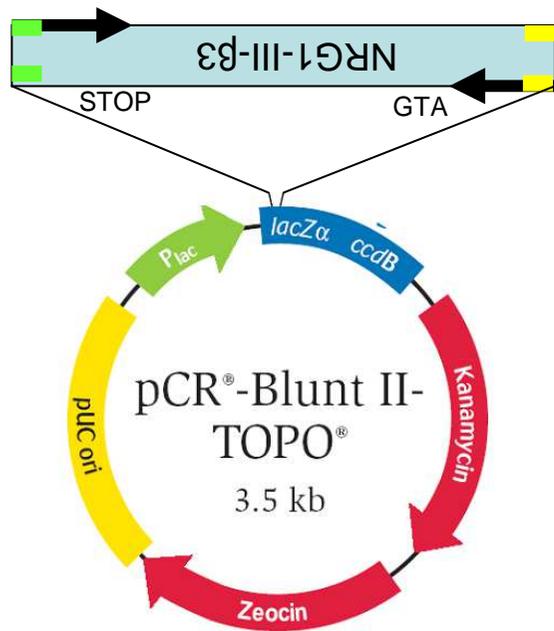
Marker: none

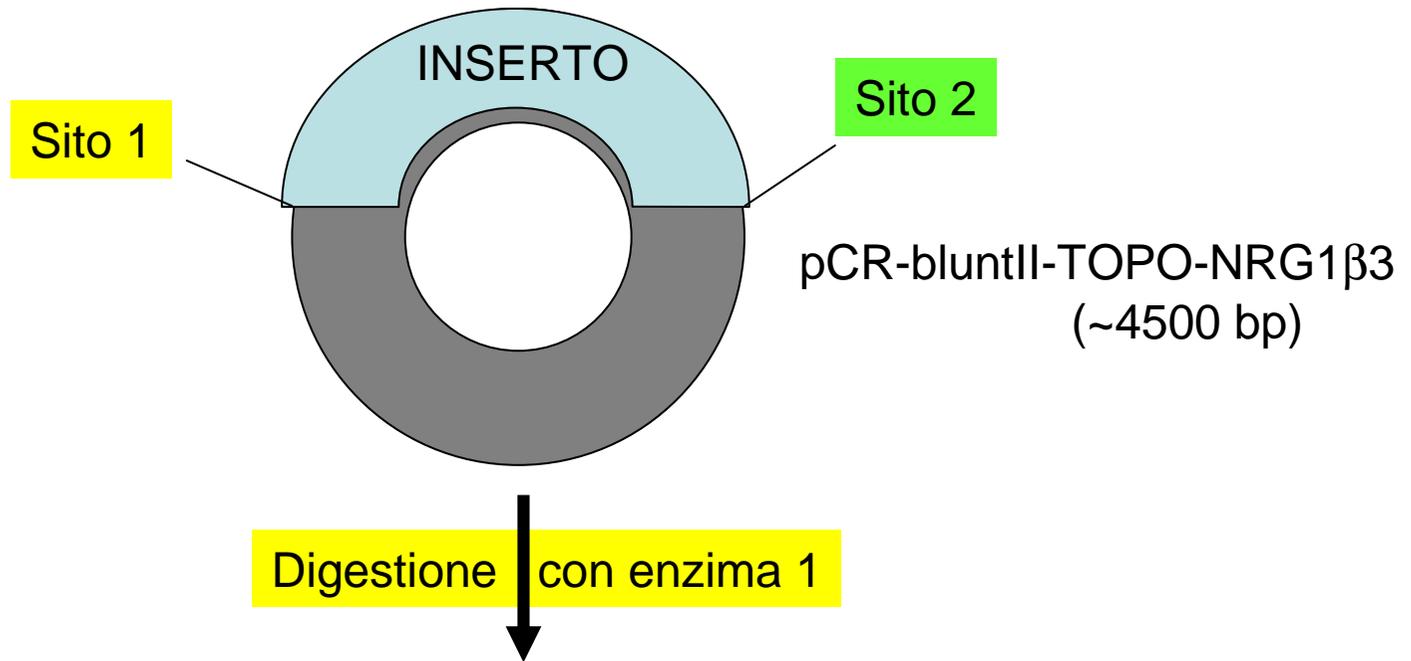
DNA Type: Unmethylated

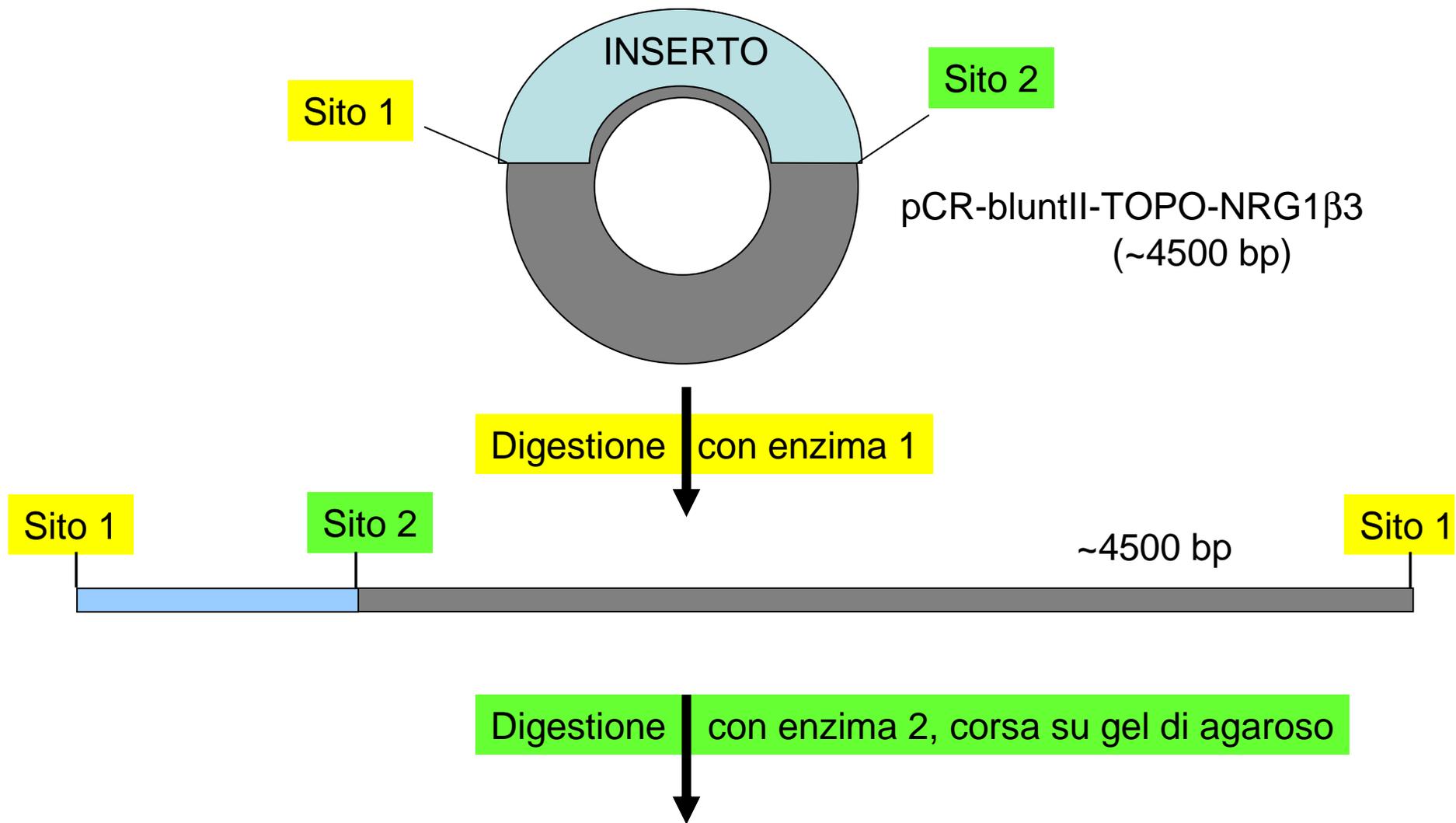
#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	KpnI-HindIII	2303-1348	4700
2	HindIII-KpnI	1349-2302	954

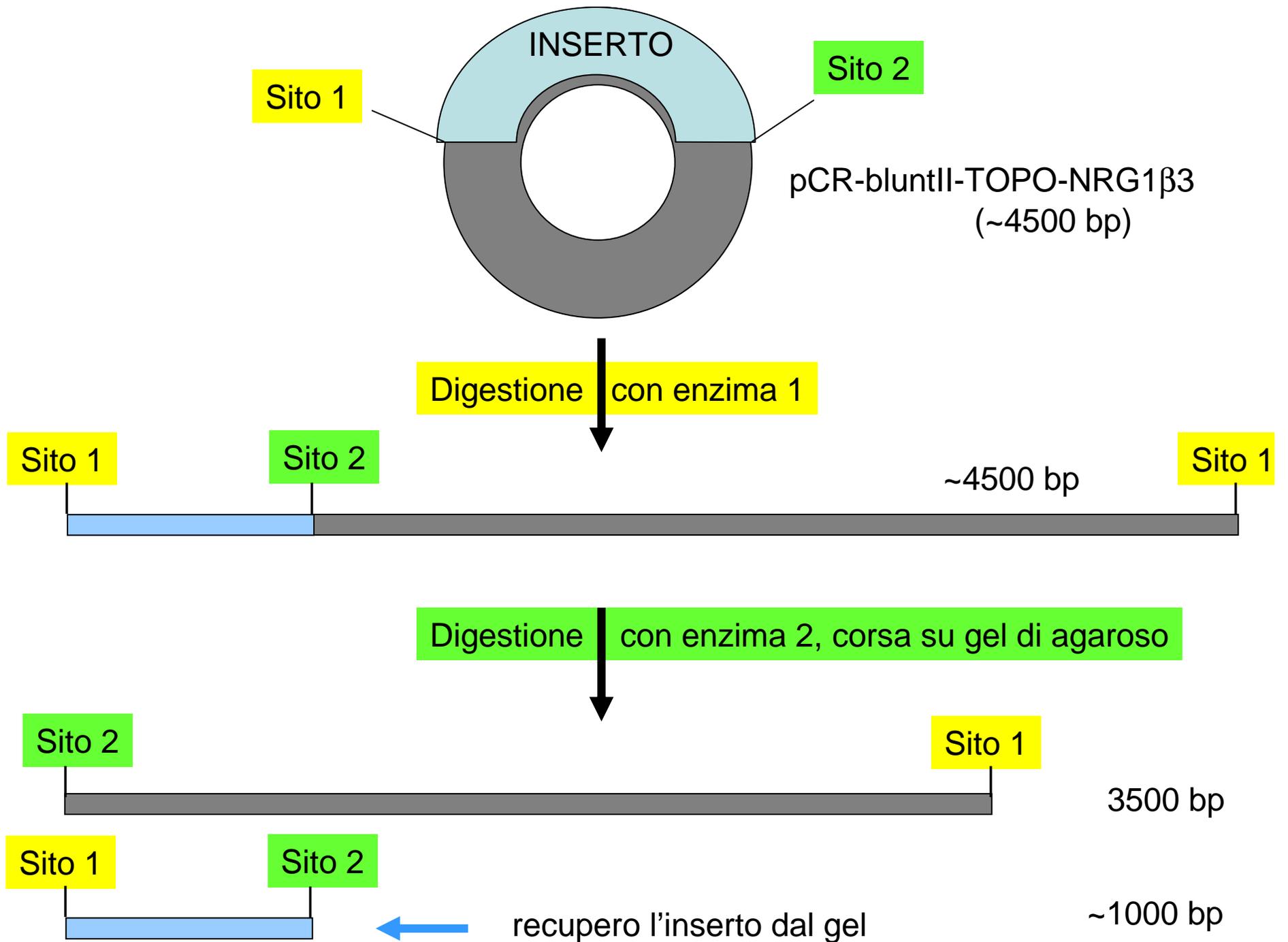


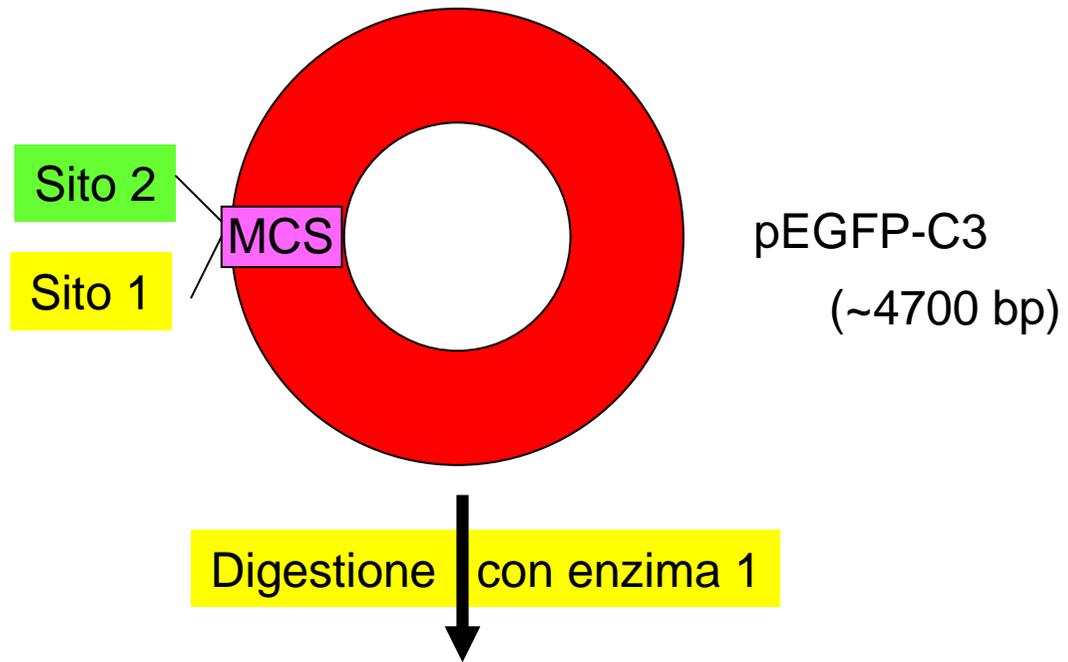
Perché l'open reading frame "a" è lunga 552aa anziché 297aa?

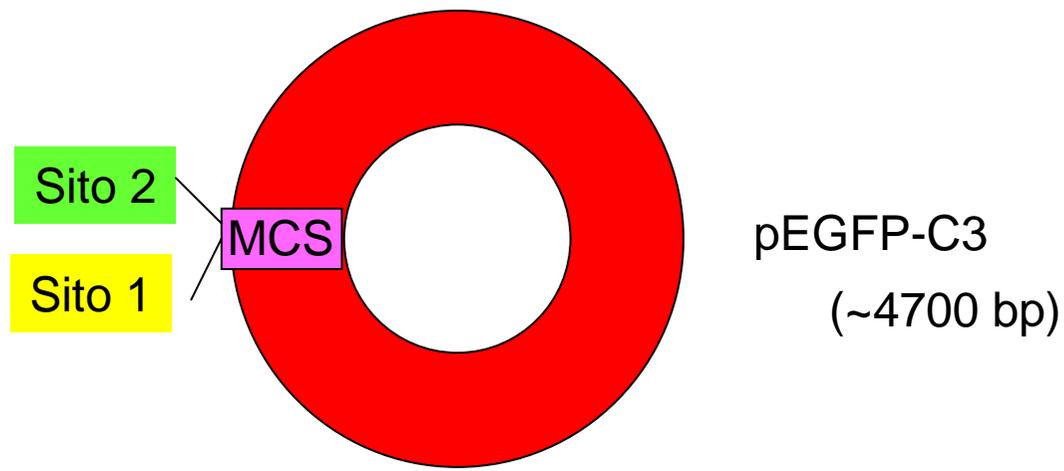






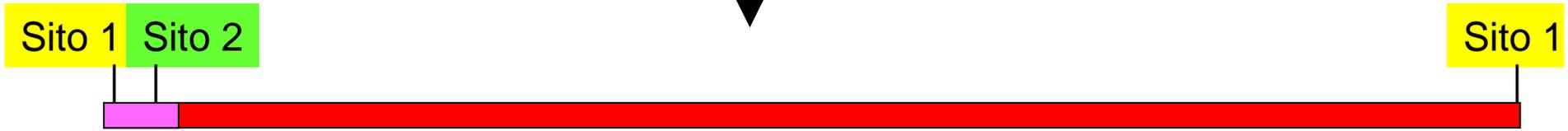






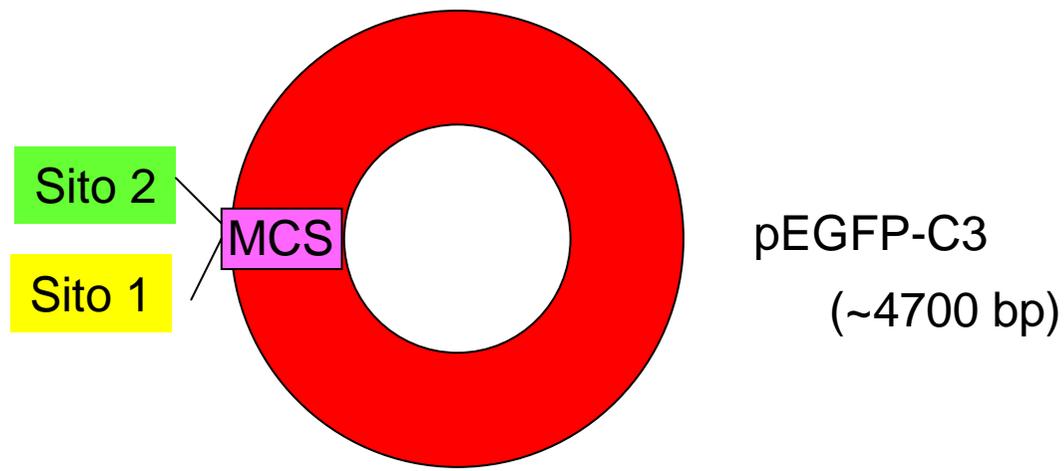
Digestione con enzima 1

A yellow rectangular box containing the text 'Digestione con enzima 1' is positioned above a black arrow pointing downwards.

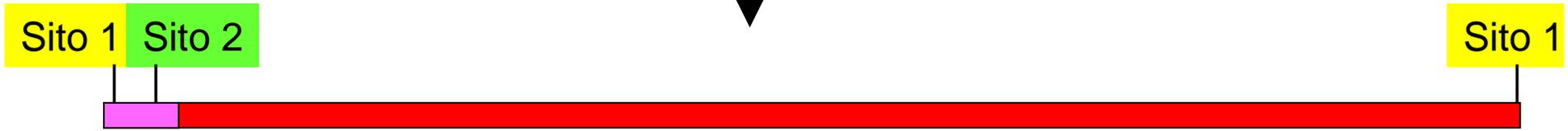


Digestione con enzima 2, corsa su gel di agaroso

A green rectangular box containing the text 'Digestione con enzima 2, corsa su gel di agaroso' is positioned above a black arrow pointing downwards.



Digestione con enzima 1

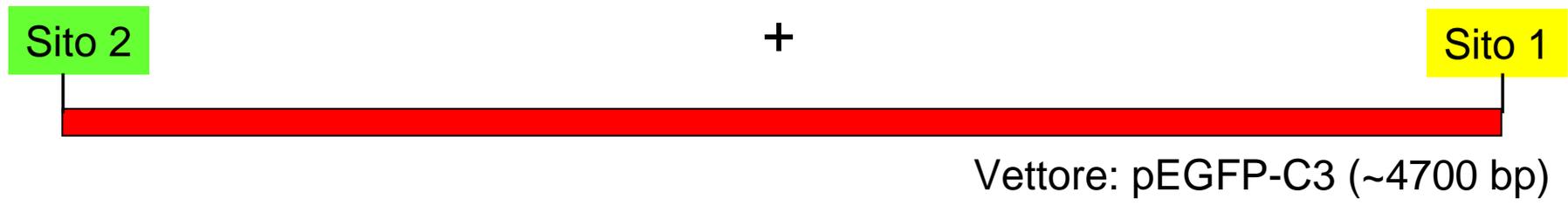


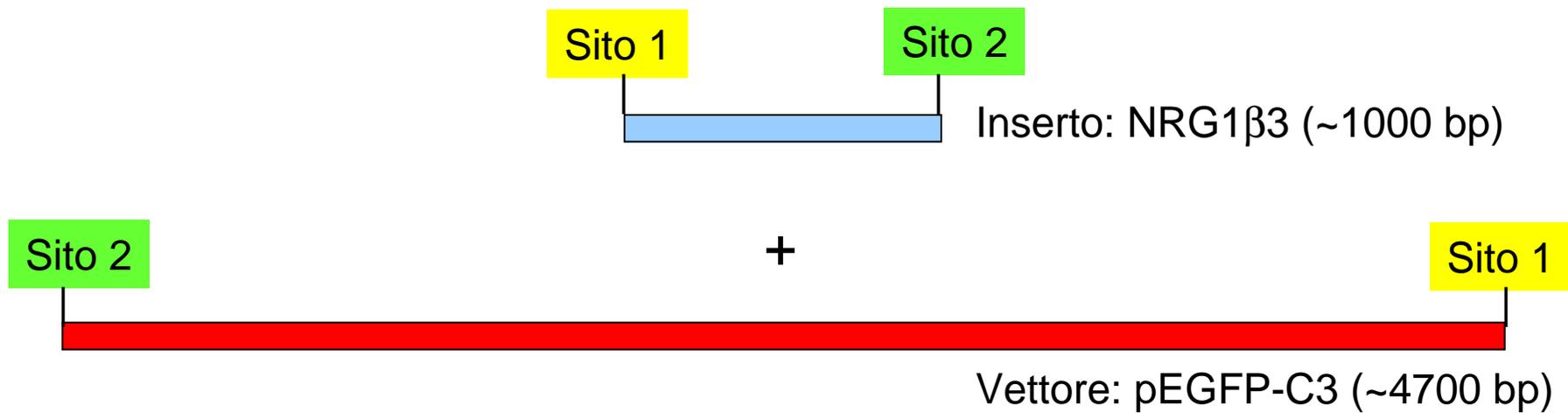
Digestione con enzima 2, corsa su gel di agaroso



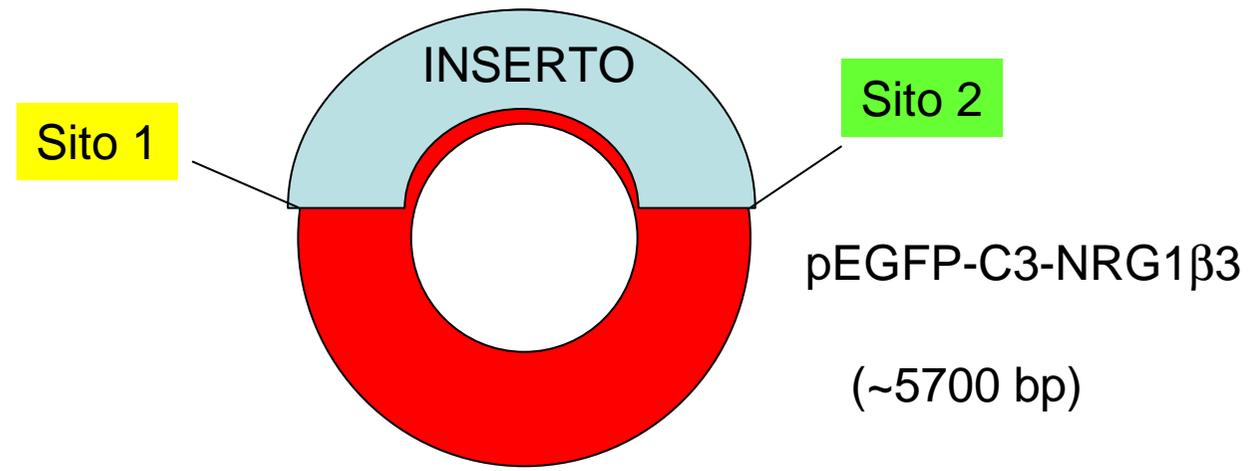
recupero il vettore dal gel (~4700 bp)







LIGASI



I caso: i due enzimi tagliano nello stesso tampone (buffer)

(oppure tagliate le due estremità dell'inserto con lo stesso enzima di restrizione)

Digestione unica (enzima I + enzima II o enzima unico)

pCR-BluntII-TOPO-NRG1-III-β3 (2,5 µg/µl)	µl	-> 20 µg
buffer 10x (quale?)	µl	-> 1x
Enzima I (quale?)	µl	-> 1u/µg
Enzima II (quale?)	µl	-> 1u/µg
BSA 10x (1 µg/µl)	µl	-> 1x (0,1 µg/µl)
H2O		
<hr/>		
totale	50 µl	

si usa una unità di enzima per ogni µg di DNA digerito
il volume dell'enzima non deve mai superare il 10% del volume totale; se è necessario utilizzare molto enzima, si aumenta il volume della reazione di digestione

pEGFP-C3 (1,5 µg/µl)	µl	-> 5 µg
buffer 10x (quale?)	µl	-> 1x
Enzima I (quale?)	µl	-> 1u/µg
Enzima II (quale?)	µl	-> 1u/µg
BSA 10x (1 µg/µl)	µl	-> 1x (0,1 µg/µl)
H2O		
<hr/>		
totale	50 µl	

- dopo aver verificato che gli enzimi/l'enzima abbiano tagliato
- defosforilate il vettore (in questo caso pEGFP-C3)
- fate un gel di agaroso preparativo (in buffer TAE) su cui caricare le due digestioni
- purificate la banda del vettore pEGFP-C3 e dell'inserto NRG1-III- β 3
- correte su gel una piccola aliquota del vettore e dell'inserto per verificare di averli recuperati bene e per quantificarli
- allestite una reazione di ligasi

Il caso: i due enzimi tagliano in tamponi (buffer) molto diversi

I digestione

pCR-BluntII-TOPO-NRG1-III- β 3 (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-> 20 μg
buffer 10x (quale?)	μl	-> 1x
Enzima I (quale?)	μl	-> 1u/ μg
BSA 10x (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-> 1x (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
H2O		
<hr/>		
totale	50 μl	

pEGFP-C3 (1, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-> 5 μg
buffer 10x (quale?)	μl	-> 1x
Enzima I (quale?)	μl	-> 1u/ μg
BSA 10x (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-> 1x (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
H2O		
<hr/>		
totale	50 μl	

Se i due buffer sono molto diversi:

- dopo aver effettuato la digestione col primo enzima controllate (correndo 5 μ l su gel di agaroso) che il DNA sia stato effettivamente digerito
- dopodiché purificate il DNA caricandolo su colonnina
- eluite il DNA purificato in 50 μ l di acqua
- procedete con la seconda digestione

II digestione

pCR-BluntII-TOPO-NRG1-III-β3 (già digerito con enzima I)	μl	
buffer 10x (quale?)	μl	-> 1x
enzima (quale?)	μl	-> 1u/μg
BSA 10x (1 μg/μl)	μl	-> 1x (0,1 μg/μl)
H2O		
<hr/>		
totale	μl	
pEGFP-C3 (già digerito con enzima I)	μl	
buffer 10x (quale?)	μl	-> 1x
enzima (quale?)	μl	-> 1u/μg
BSA 10x (1 μg/μl)	μl	-> 1x (0,1 μg/μl)
H2O		
<hr/>		
totale	μl	

- dopo aver verificato che anche il secondo enzima abbia tagliato
- defosforilate il vettore (in questo caso pEGFP-C3)
- fate un gel di agaroso preparativo (in buffer TAE) su cui caricare le due digestioni
- purificate la banda del vettore pEGFP-C3 e dell'inserto NRG1-III- β 3
- correte su gel 5 μ l del vettore e dell'inserto per verificare di averli recuperati bene e per quantificarli
- allestite una reazione di ligasi

III caso: i due enzimi tagliano in tamponi (buffer) simili

Task: come trasformo un buffer di digestione in un altro?

1X NEBuffer 1:
10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.0 @ 25°C

1X NEBuffer 3:
100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 2:
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 4:
20 mM Tris-acetate
50 mM potassium acetate
10 mM Magnesium Acetate
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

HindIII

1X NEBuffer 2:
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

PstI

1X NEBuffer 3:
100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

HindIII

1X NEBuffer 2:
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

PstI

1X NEBuffer 3:
100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

HindIII

1X NEBuffer 2:
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

PstI

1X NEBuffer 3:
100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

Imposto una digestione con l'enzima HindIII che taglia nel buffer 2

DNA	20 ul
Buffer 2 10x	5 ul
BSA 10x	5 ul
HindIII 20u/ul	1 ul
Water	21 ul
<hr/>	
Tot	50 ul

Verifico che l'enzima abbia tagliato, correndo 5 ul su gel

Digerisco i 45 ul rimasti con l'enzima PstI che taglia nel buffer 3.
Non precipito il DNA, né lo carico su colonna, ma aumento il volume della reazione ed aggiungo altro buffer, NaCl e Tris in modo da trasformare il buffer 2 in buffer 3. Devo aggiungere altro buffer? Provate ad impostare due reazioni di digestione, in una aggiungete il buffer 2, nell'altra il buffer 3.

A) AGGIUNGO BUFFER 2

DNA digerito in buffer 2	45 μ l
Buffer 2 10x	μ l
NaCl 1M	μ l
Tris HCl 1M	μ l
Acqua	μ l
BSA 10x	μ l
Enzima PstI 20u/ul	μ l
<hr/>	
Tot	100 μ l

B) AGGIUNGO BUFFER 3

DNA digerito in buffer 2	45 μ l
Buffer 3 10x	μ l
NaCl 1M	μ l
Tris HCl 1M	μ l
Acqua	μ l
BSA 10x	μ l
Enzima PstI 20u/ul	μ l
<hr/>	
Tot	100 μ l

Provate a farlo entro lunedì 1 dicembre, così lo vediamo insieme a lezione