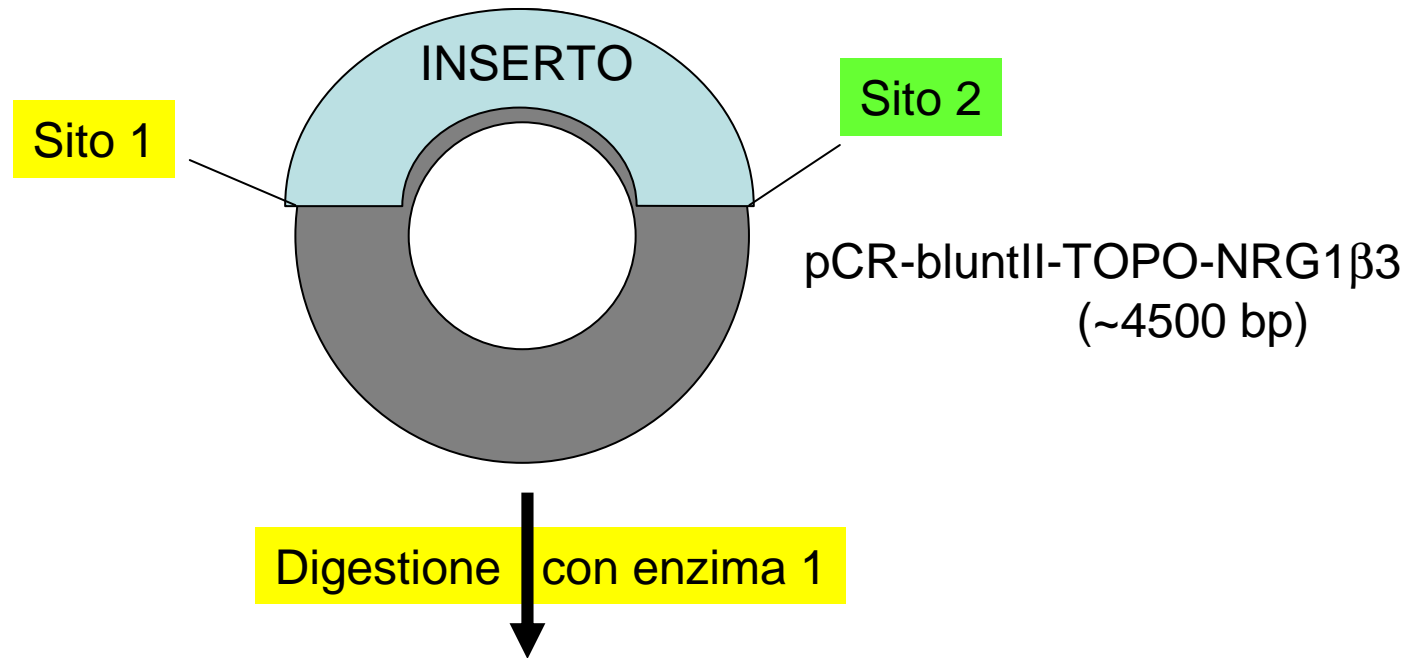
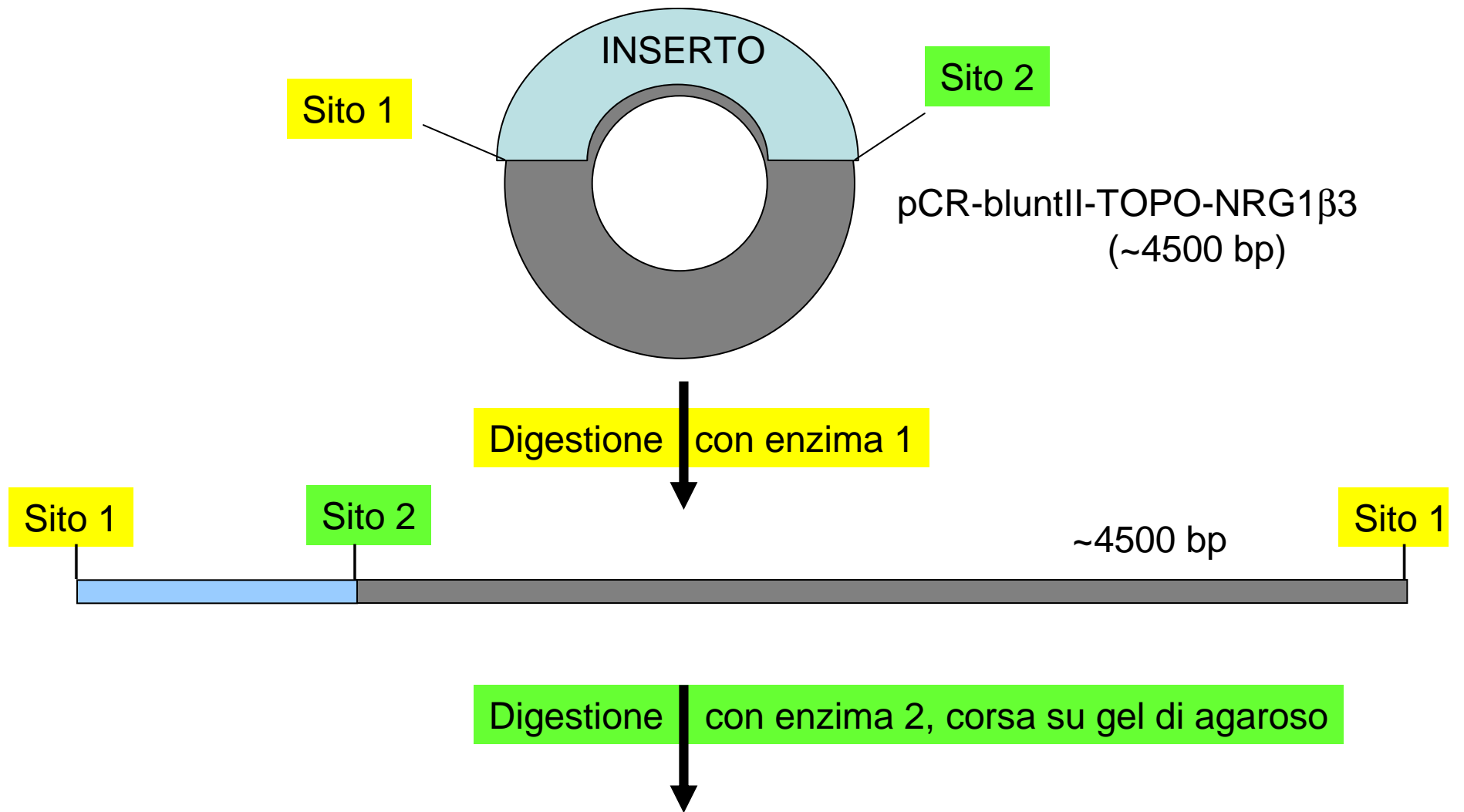
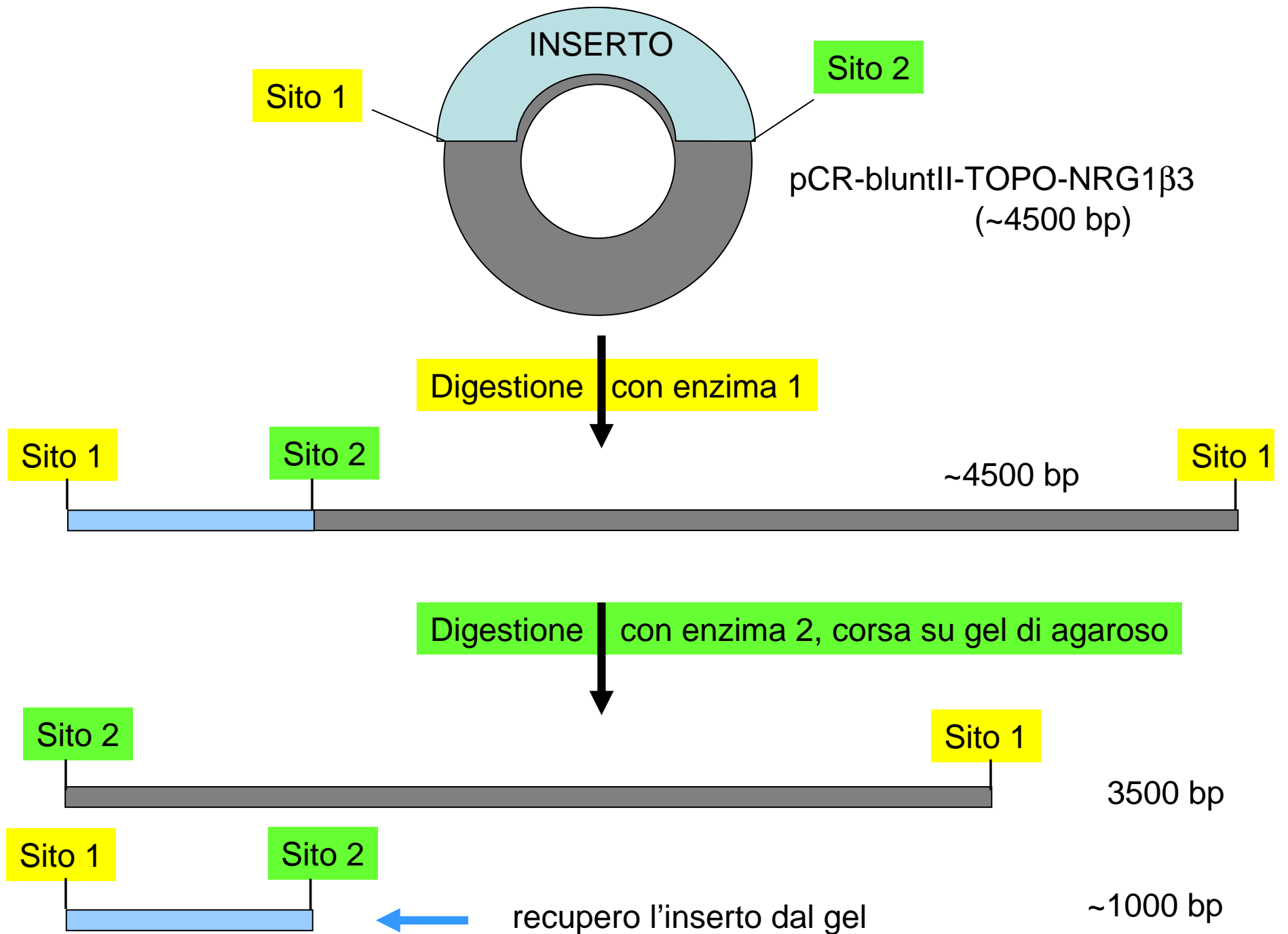
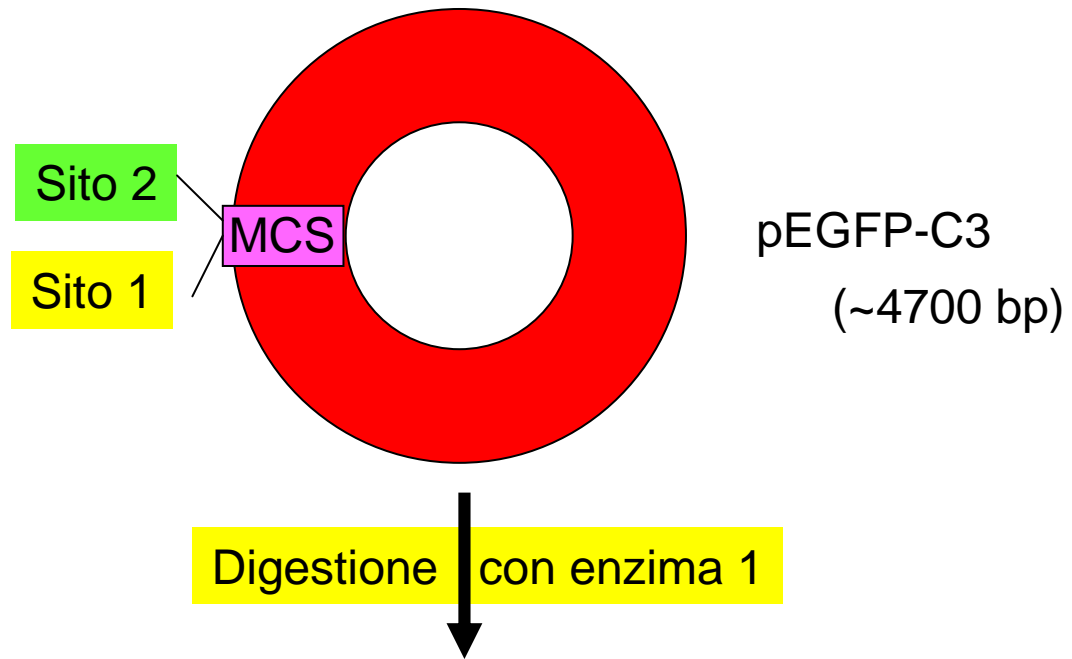


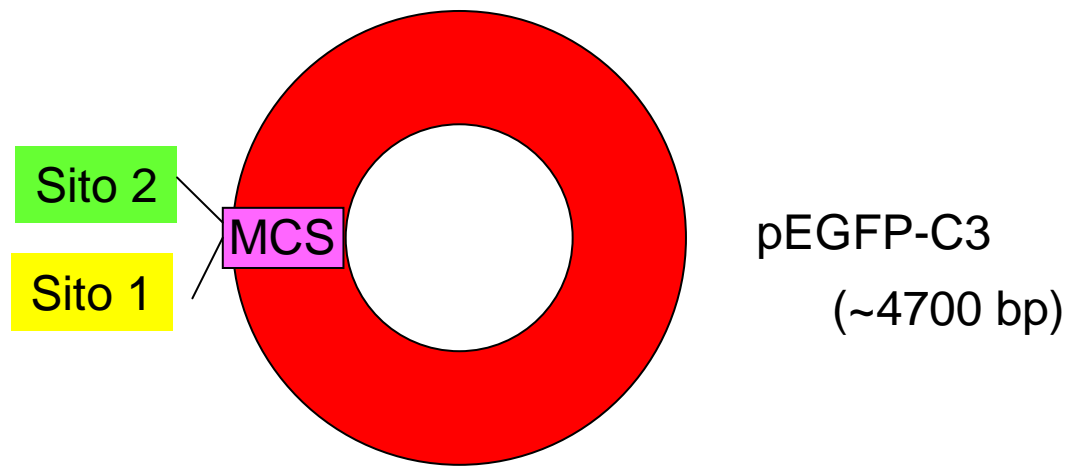
Nello scorso incontro avete subclonato la NRG1 da pCR-BLUNT-TOPO a pEGFP-C3 sfruttando i siti di restrizione che avete messo alle estremità dei vostri primer.



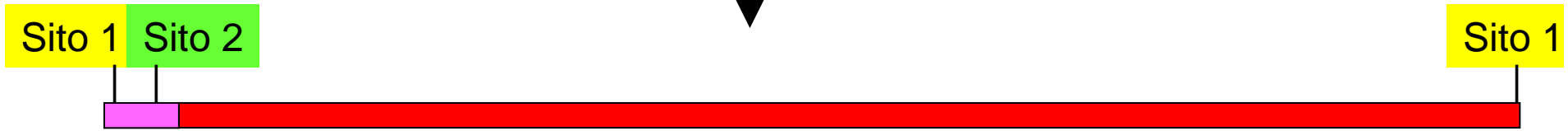




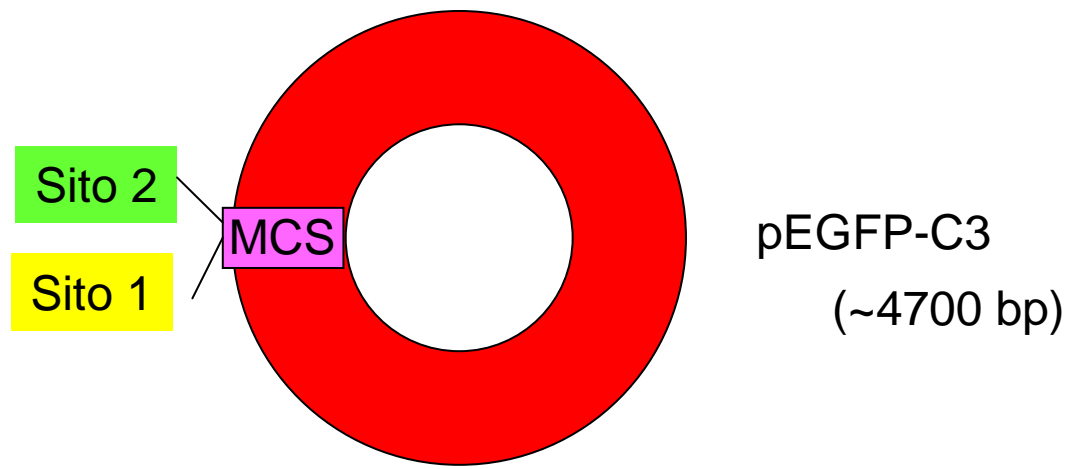




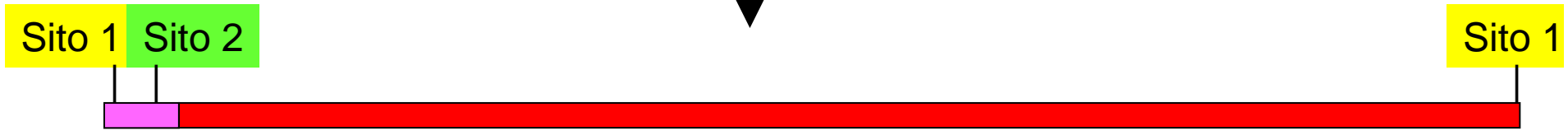
Digestione con enzima 1



Digestione con enzima 2, corsa su gel di agaroso



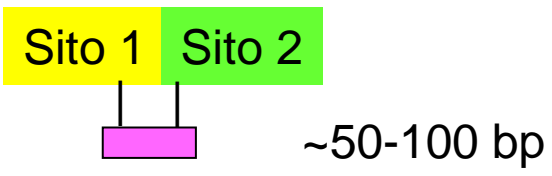
Digestione con enzima 1

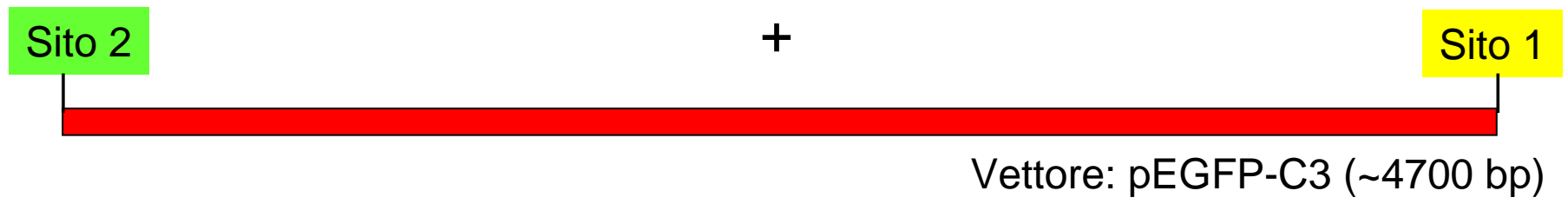
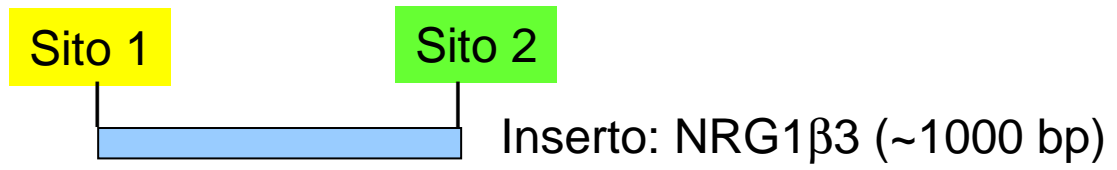


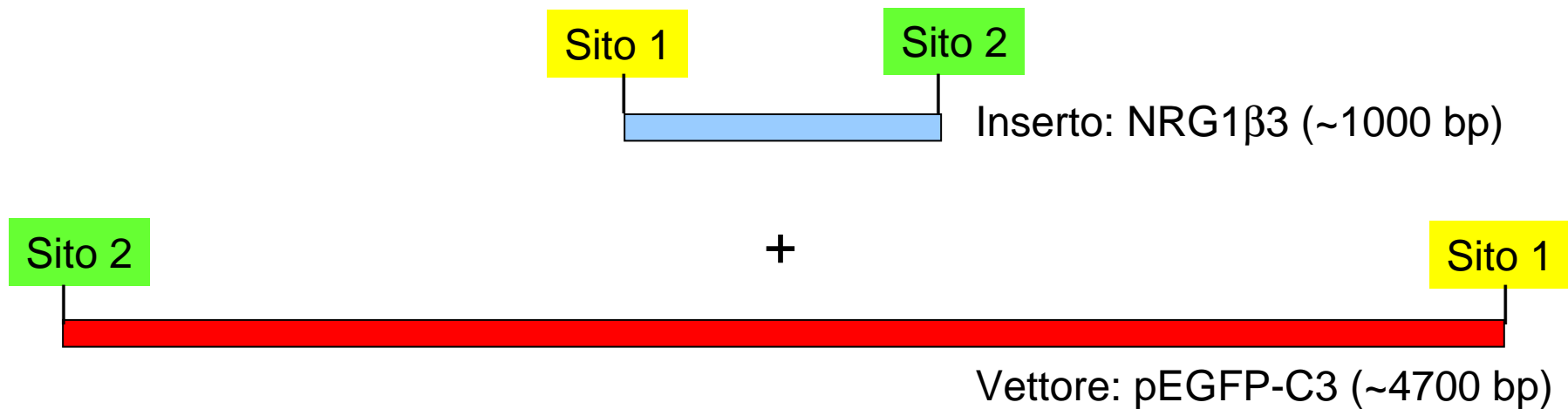
Digestione con enzima 2, corsa su gel di agaroso



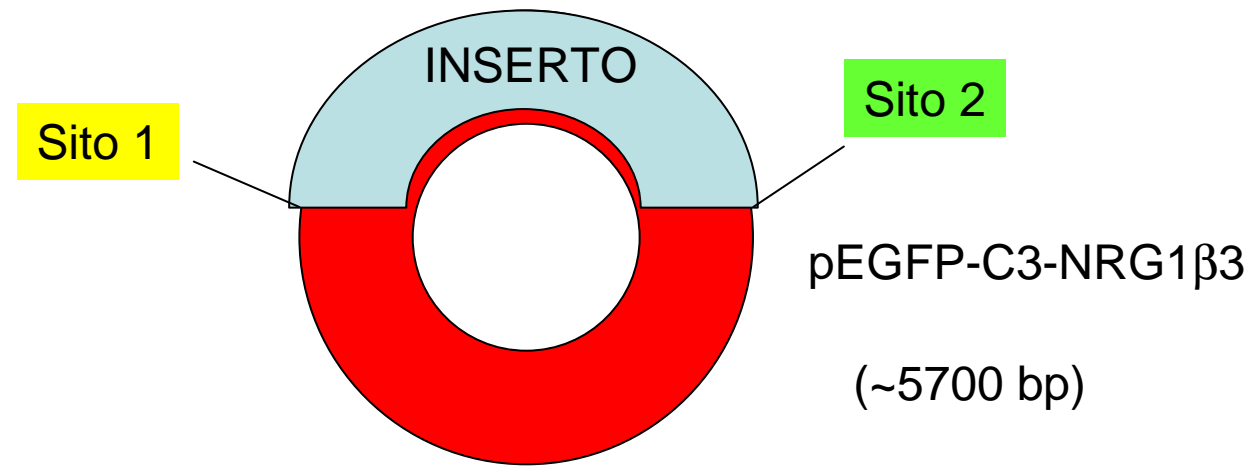
recupero il vettore dal gel (~4700 bp)







LIGASI

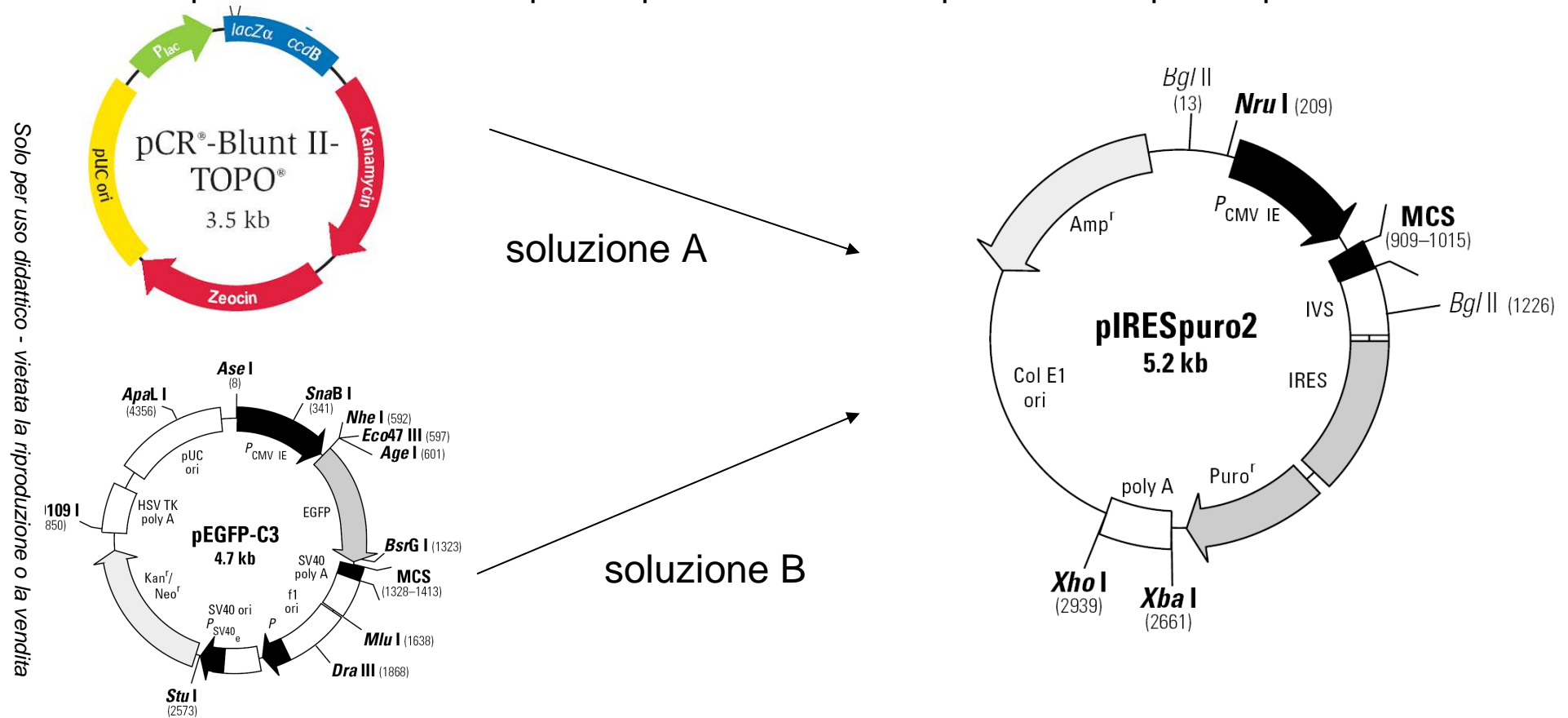


PROGETTO DETTAGLIATO BIOTECNOLOGIE CELLULARI

- 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 antisenso

- procedete col suclonaggio della NRG1-typelll-beta 3 dal vettore pCR-Blunt II-TOPO a pIRES-puro2 o dal vettore pEGFP-C3 a pIRES-puro2

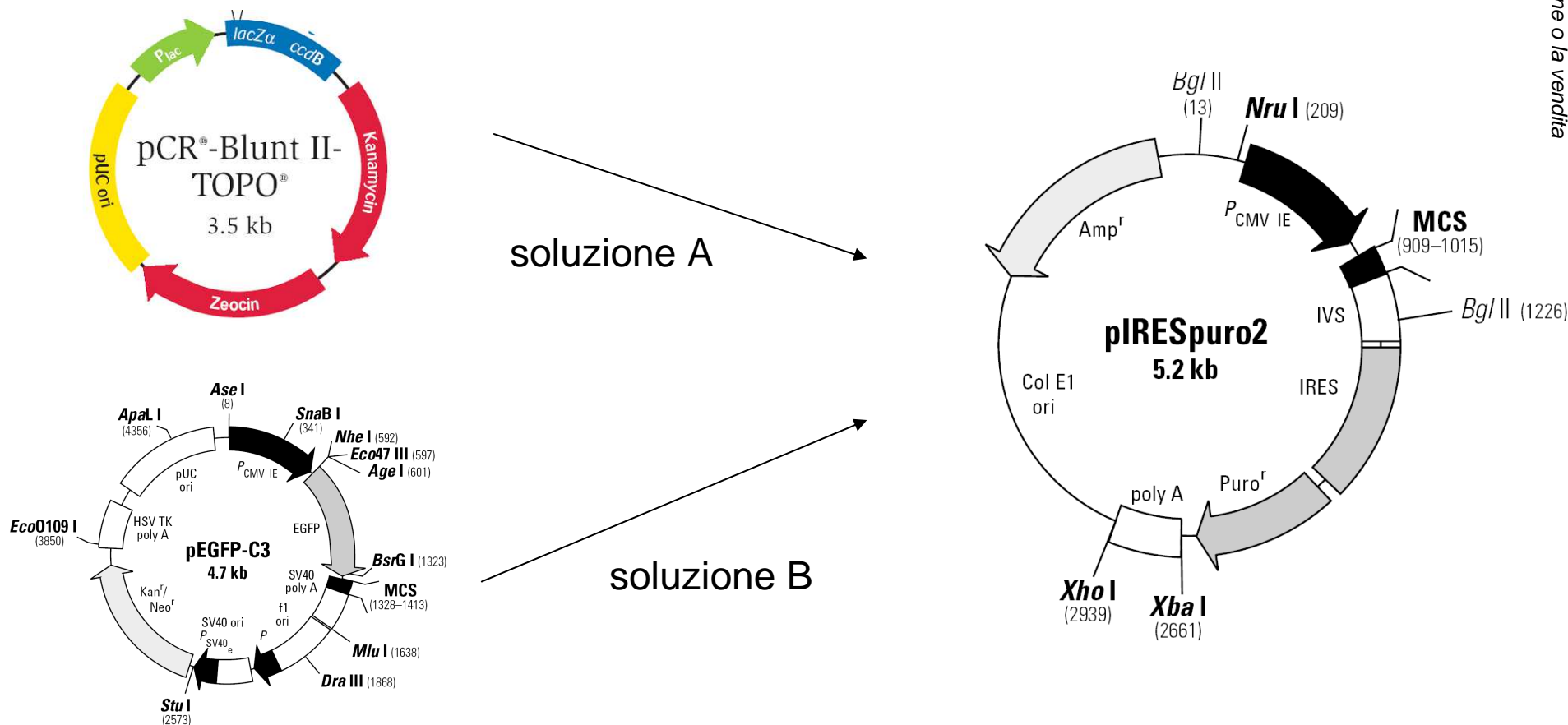


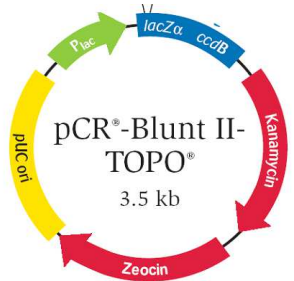
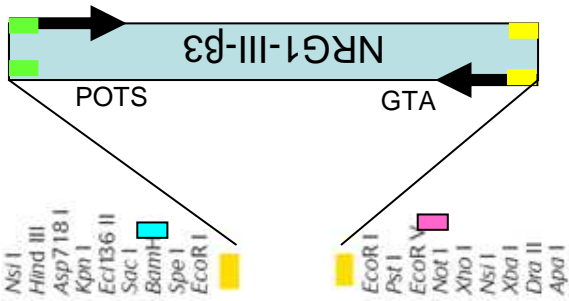
Dovete subclonare il cDNA codificante la NRG1 nel vettore pIRES-PURO2, che vi consente di ottenere cloni stabili esprimenti la proteina d'interesse mediante trasfezione stabile e selezione dei cloni resistenti alla puromicina.

Dovete identificare due siti di restrizione che vi consentano, nel modo meno complicato possibile, di recuperare il cDNA che codifica per la NRG1 dal vettore pCR-bluntII topo (o dal vettore pEGFP-C3) e subclonarlo nel vettore pIRES-PURO2.

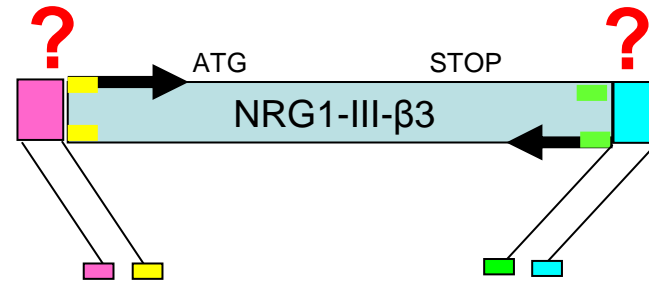
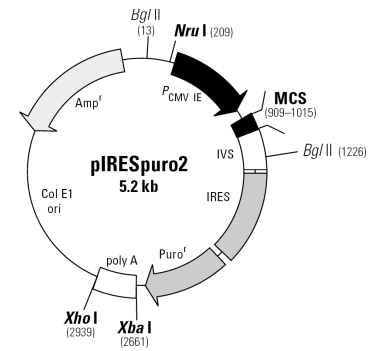
- se volete partire dal vettore originale, potete costruire su NEB cutter la mappa che vi attendete per pCR-bluntII-TOPO-NRG1: **unite i vari pezzi di sequenza (vettore e inserto) in un unico file di testo e poi li inserite in NEB cutter, segnalando che si tratta di DNA circolare e non lineare**

- Ricordatevi che l'inserto è invertito!! Dovrete inserire nel vettore la sequenza "revertita e complementare"!

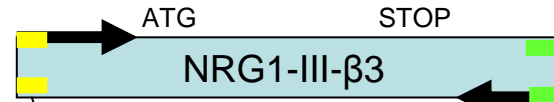
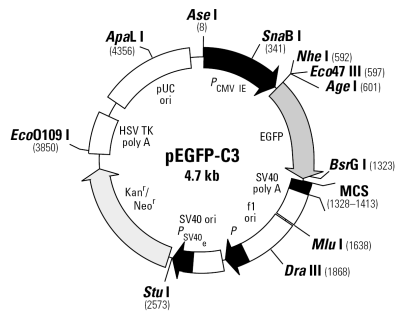




soluzione A
scegliete voi quali enzimi
di restrizione usare!



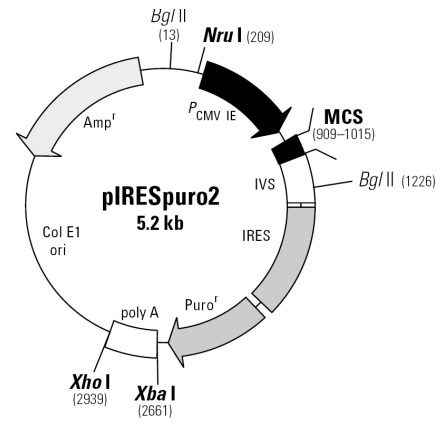
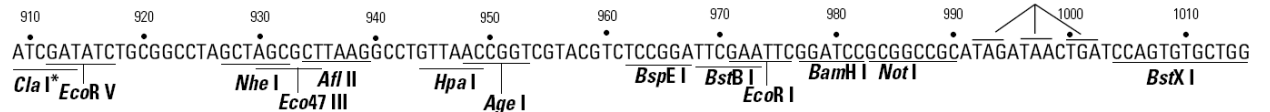
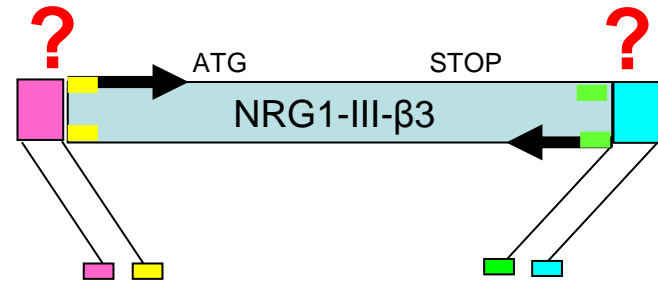
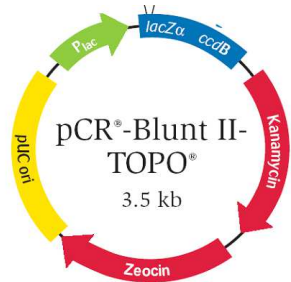
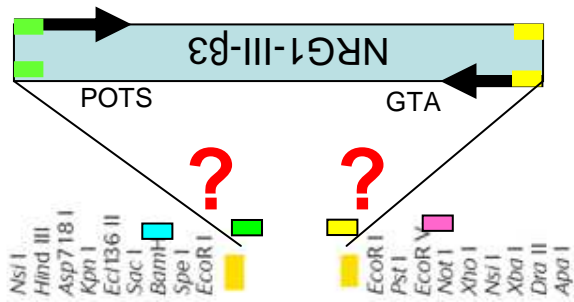
910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010
 ATCGATATCTGCGGCCTAGCTAGCGCTTAAGGCCCTGTTAACCGGTCGTACGTCCTCCGGATTTCGAATTCGGATCCGCGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGG
 Cla I* EcoR V Nhe I Afl II Hpa I Age I BspE I BstB I EcoR I BamH I Not I BstX I



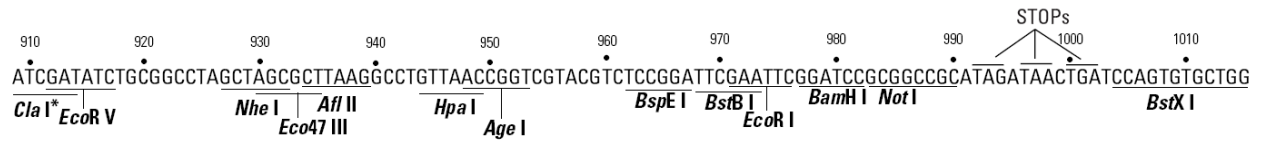
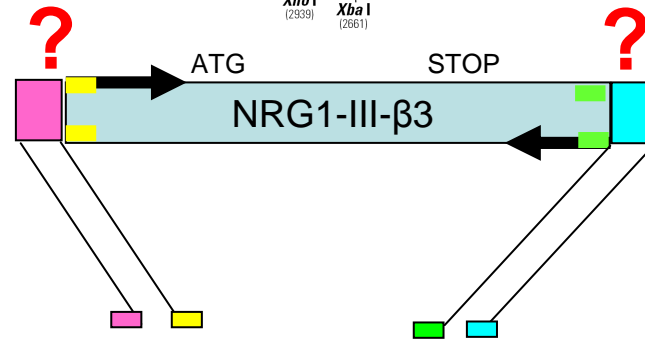
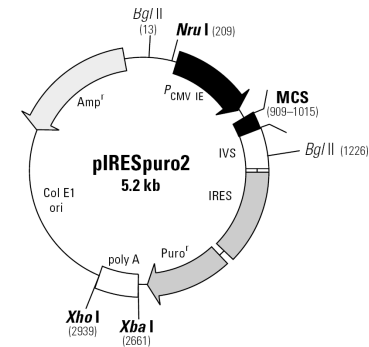
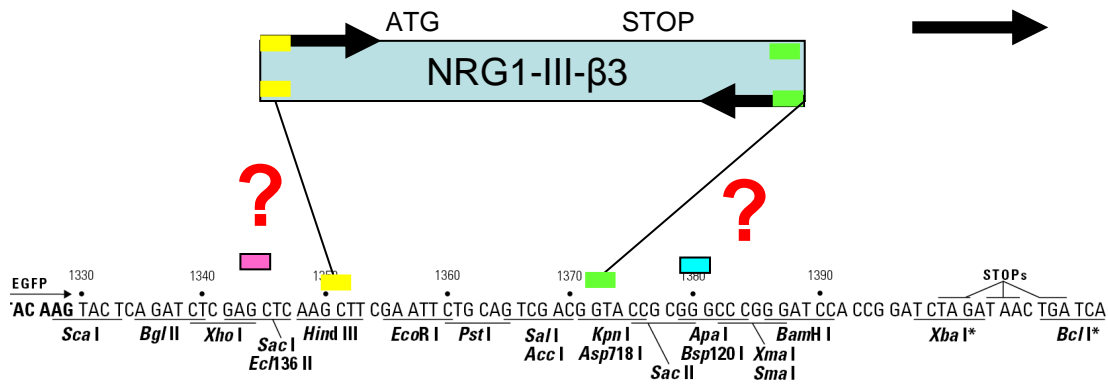
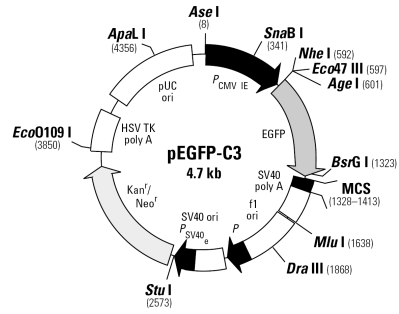
EGFP 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390
 TAC AAG TAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GAT CCA CCG GAT CTA GAT AAC TGA TCA
 Sca I Bgl II Xho I Sac I Hind III EcoR I Pst I Sal I Kpn I Apa I BamH I Xba I* Bcl I*
 Ec1136 II Acc I Asp718 I Bsp120 I Xma I Sma I

soluzione B
scegliete voi quali enzimi
di restrizione usare!

Soluzione A

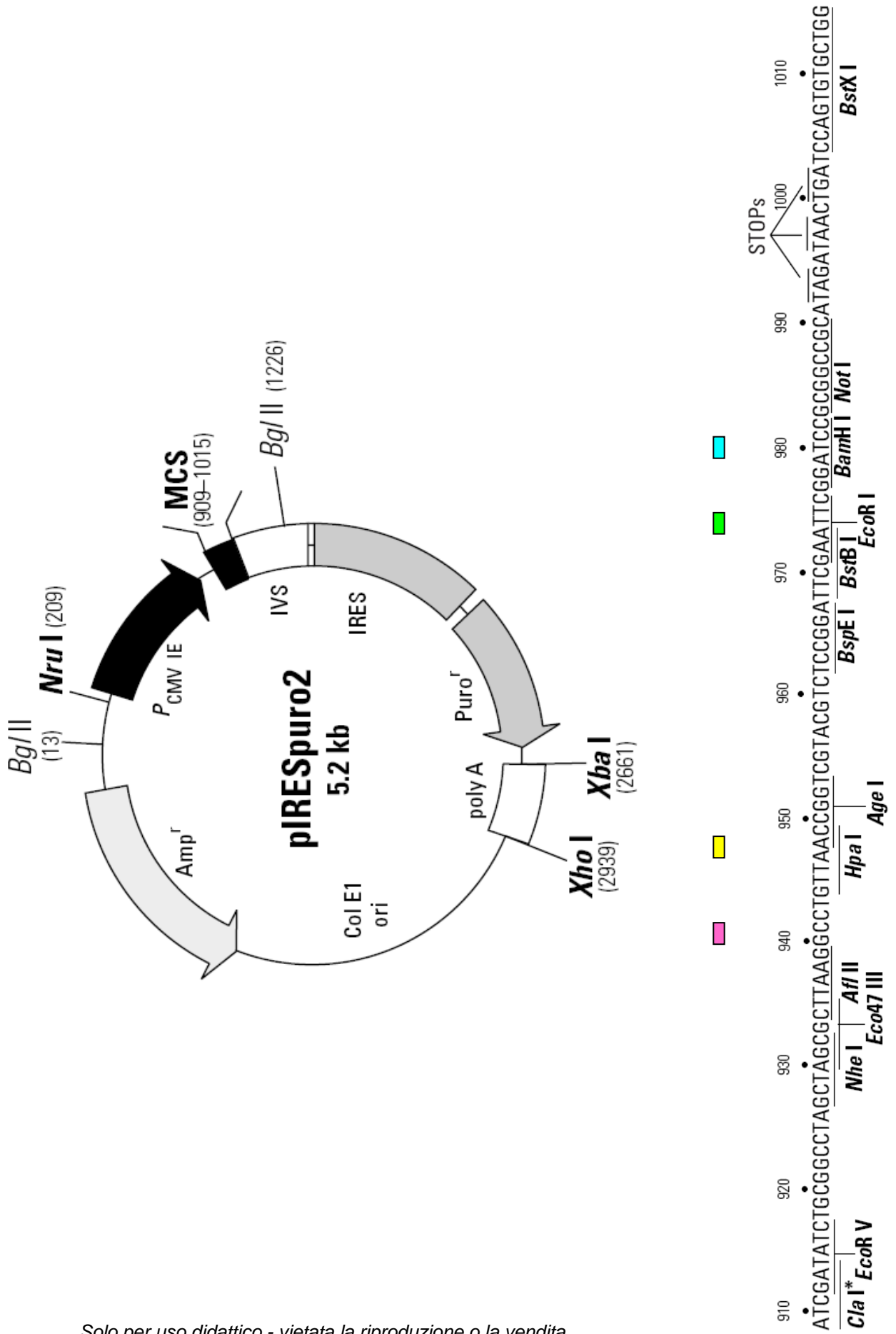


Soluzione B



Solo per uso didatt.

Vettore di espressione per ottenere cloni stabili



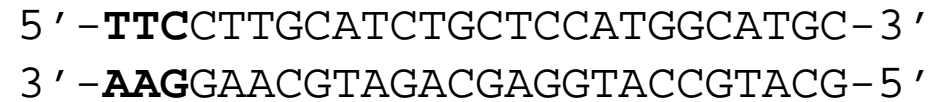
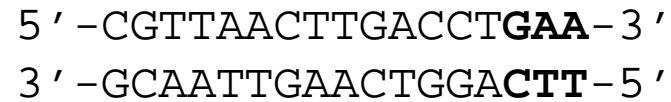
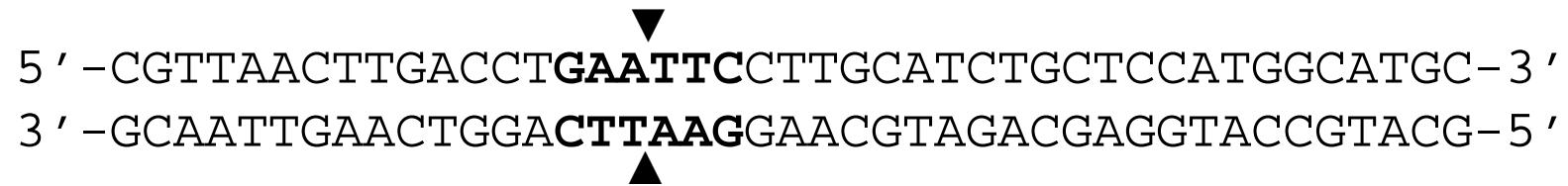
- Potete usare i siti di restrizione che avete inserito voi artificialmente nei due primer utilizzati per l'amplificazione (**giallo** e **verde**) o i siti di restrizione presenti nei *multiple cloning sites* dei vettori da cui partite (**rosa** e **azzurro**).

- Ovviamente, se cambiate enzimi, dovete controllare che i due enzimi **NON** taglino dentro il vostro inserto.

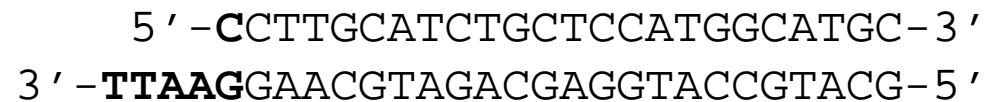
- Esistono enzimi di restrizione che, pur essendo diversi, producono estremità **compatibili**. Potete quindi utilizzare enzimi diversi per recuperare l'inserto e subclonarlo nel vettore di espressione, purché le estremità prodotte siano **compatibili**.

- Se non trovate due enzimi adatti, potete ricorrere alla **BLUNTIZZAZIONE**. In questo caso il vostro inserto potrà essere clonato senso o antisenso, ed allora dovrete progettare una digestione di controllo per verificare l'orientamento dell'inserto.

SITO GIA' BLUNT



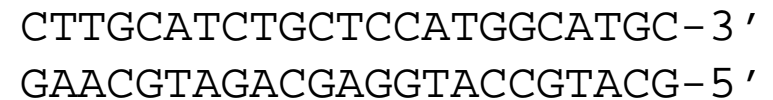
BLUNTIZZAZIONE DI TIPO I



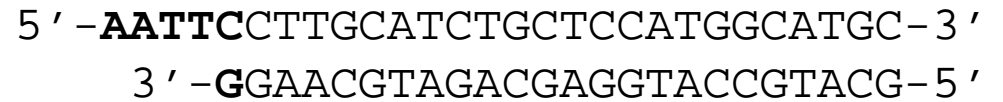
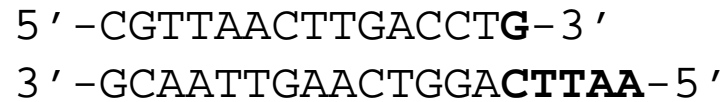
Quale enzima utilizzo?
Che estremità ottengo?



?



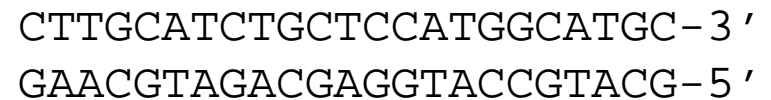
BLUNTIZZAZIONE DI TIPO II



Quale enzima utilizzo?
Che estremità ottengo?



?



- 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 LB con antibiotico
- il mattino successivo estraete il DNA (miniprep)

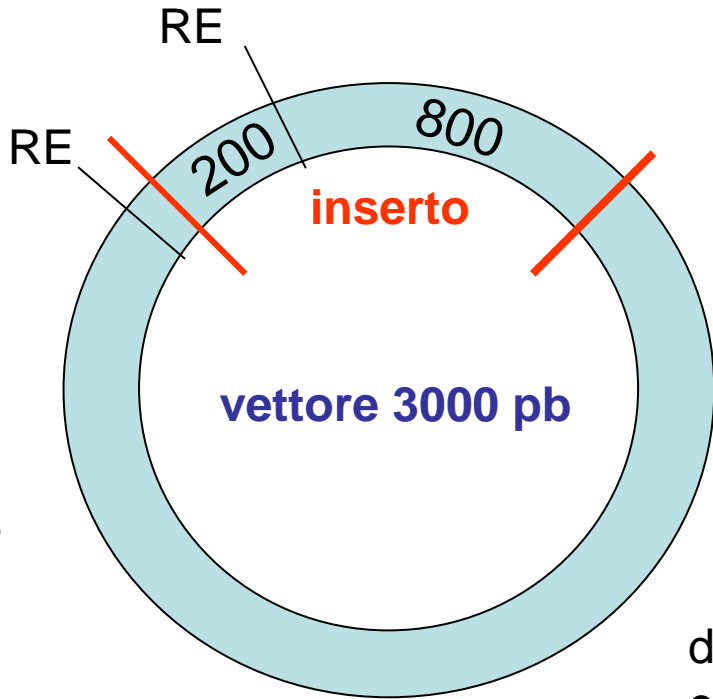
- **come fate a verificare che l'inserto sia entrato?**
- **come fate a verificarne l'orientamento?**

- progettate una digestione con un enzima di restrizione che consenta di verificare la correttezza dell'orientamento dell'inserto nel nuovo vettore

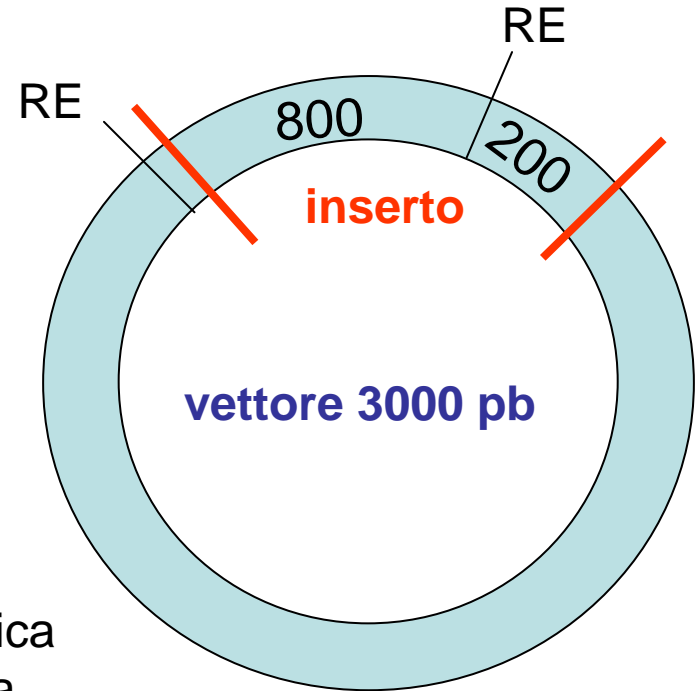
- quanto pesano le bande che vi attendete se il costrutto è orientato correttamente?
- quanto pesano le bande che vi attendete se il costrutto è orientato al contrario?

- con NEB cutter, costruite la mappa che vi attendete per pIRES-puro-NRG1 con l'inserto orientato correttamente (e anche invertito, se la reazione di ligasi presenta le due estremità uguali): **unite i vari pezzi di sequenza in un unico file di testo e poi inseriteli in NEB cutter, segnalando che si tratta di DNA circolare e non lineare**

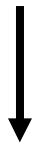
- nel caso progettiate un clonaggio BLUNT o con un unico enzima di restrizione ad entrambe le estremità, identificate un enzima di restrizione (RE) che vi consenta di verificare la correttezza dell'orientamento dell'inserto nel nuovo vettore, calcolando i pesi delle bande attese nei due casi.



SENSO



ANTISENSO



digestione enzimatica
corsa elettroforetica



Esempio di digestioni di controllo su minipreps per subclonare la NRG1

1-6: in pEGFP-C3

7-13: in pIRES-puro

MW

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

