

## 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-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 (15 dicembre 2014)**

**NB** Per ogni sub-clonaggio dovete allestire il protocollo delle reazioni di digestione per il recupero di inserto e vettore e descrivere le digestioni enzimatiche che consentono di verificare il corretto orientamento dell'inserto, con previsione del peso delle bande attese in caso di clonaggio senso o antisense.

**Importante:** per consentirmi di verificare la correttezza del vostro progetto, scrivete le sequenze dei primers, evidenziate il sito di restrizione aggiunto, evidenziate sulla sequenza la posizione dei primers che avete disegnato e dimostrate di aver verificato l'assenza di strutture secondarie o dimeri.

Es: 5' -CGT TAACTTG ACC**ATGTGCATCTAG**CTCCATGGCATGC-3'  
3' -GCAATTGAACTGGT**TACACGTAGATC**GAGGTACCGTACG-5'

5' -**CGT TAACTTG ACCATGTGCATCTAG**CTCCATGGCATGC-3'  
3' -GCAATTGAACTGGTACACGTAGATCGAG**GTACCGTACG**-5'

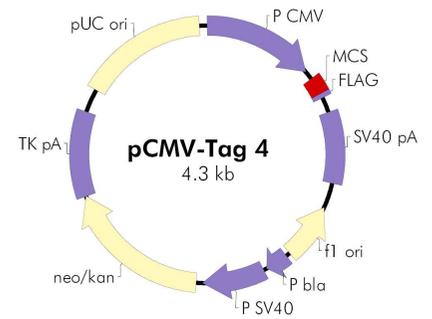
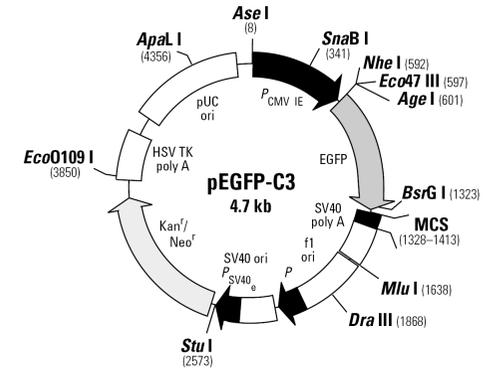
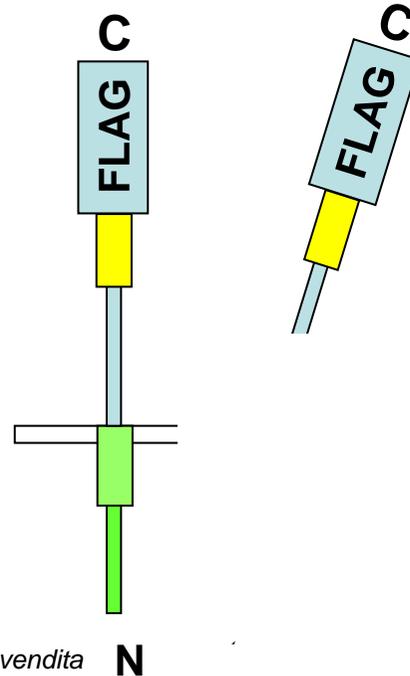
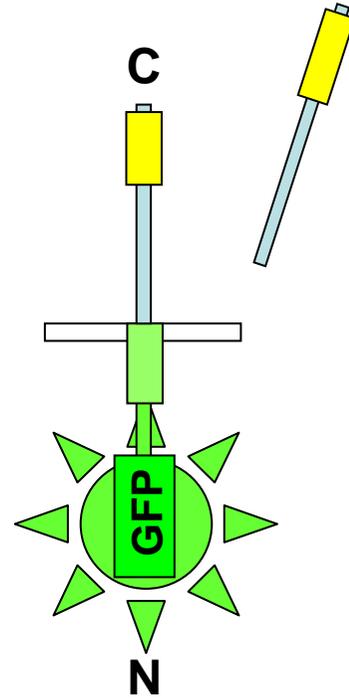
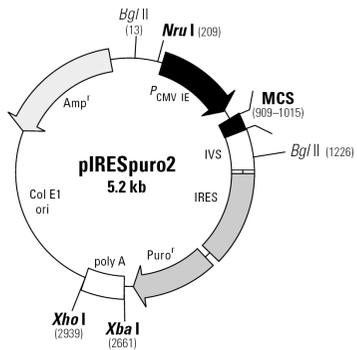
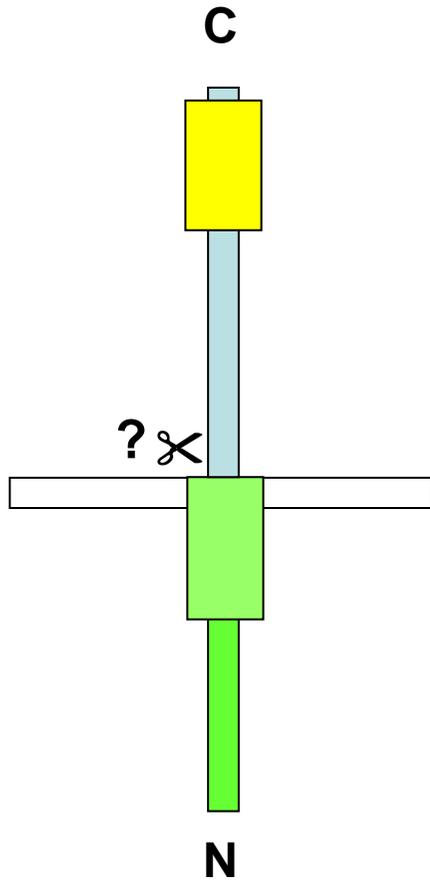
**Primer senso:** 5' -**CGT TAACTTG**-3'  
**Primer antisenso:** 5' -**GCATGCCATG**-3'

aggiungo il sito **HindIII**  $\begin{matrix} 5' - \underline{\text{AAGCTT}} - 3' \\ 3' - \underline{\text{TTCGAA}} - 5' \end{matrix}$  al 5' del primer senso

aggiungo il sito **PstI**  $\begin{matrix} 5' - \underline{\text{CTGCAG}} - 3' \\ 3' - \underline{\text{GACGTC}} - 5' \end{matrix}$  al 5' del primer antisenso

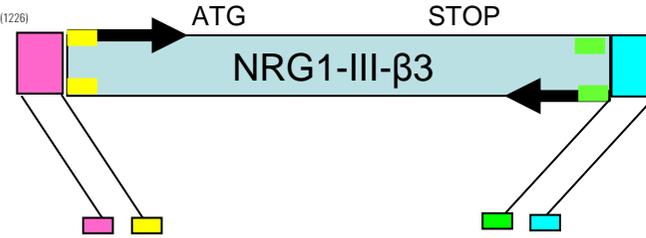
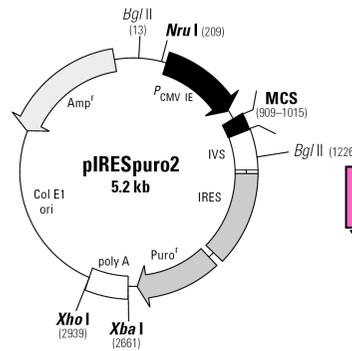
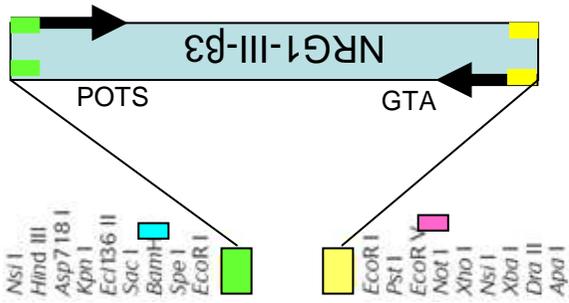
**Primer senso:** 5' -**AAGCTTCGT TAACTTG**-3'  
**Primer antisenso:** 5' -**CTGCAG**G**GCATGCCATG**-3'

5' -**AAGCTTCGT TAACTTG ACCATGTGCATCTAG**CTCCATGGCATGC**CCTGCAG**-3'  
3' -**TTCGAAGCAATTGAACTGGTACACGTAGATCGAG**GTACCGTACG**G**GACGTC****-5'

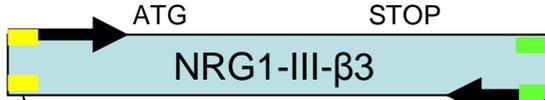
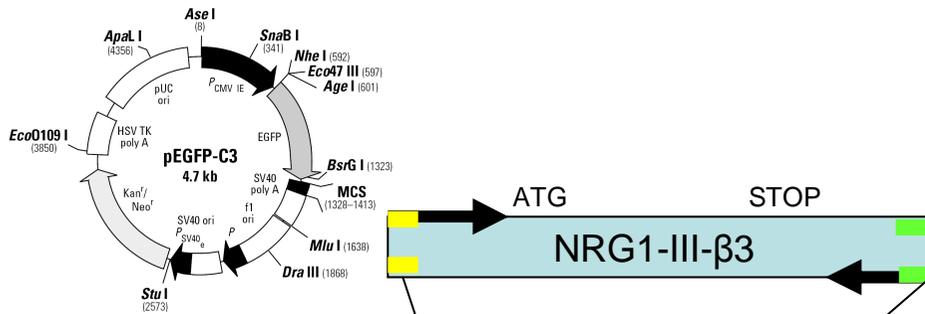


Solo per uso didattico - vietata la riproduzione o la vendita

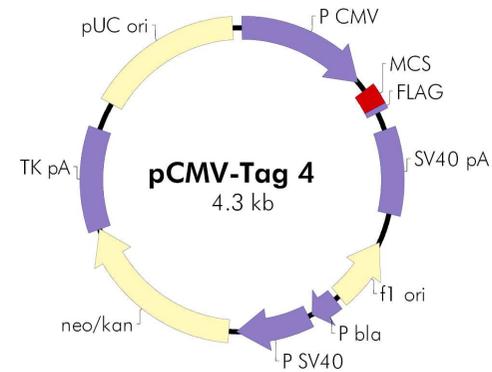




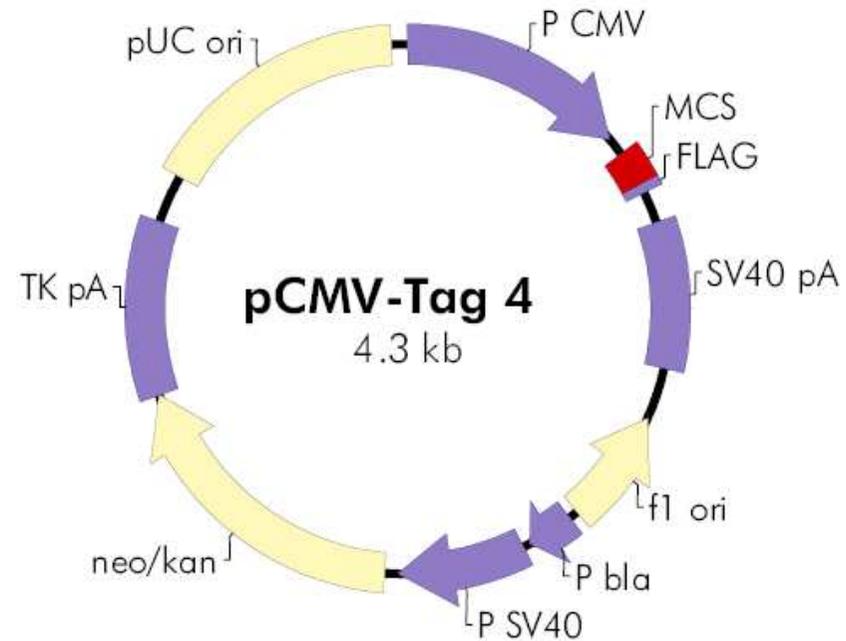
910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010  
 ATCGATATCTGCGGCCTAGCTAGCGCITTAAGGCGCTGTTAACCGGTCGTACGTCCTCCGGATTTCGAATTCGGATCCGCGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGG  
 Cla I\* EcoR V Nhe I Afl II Hpa I Age I BspE I BstB I EcoR I BamH I Not I BstX I



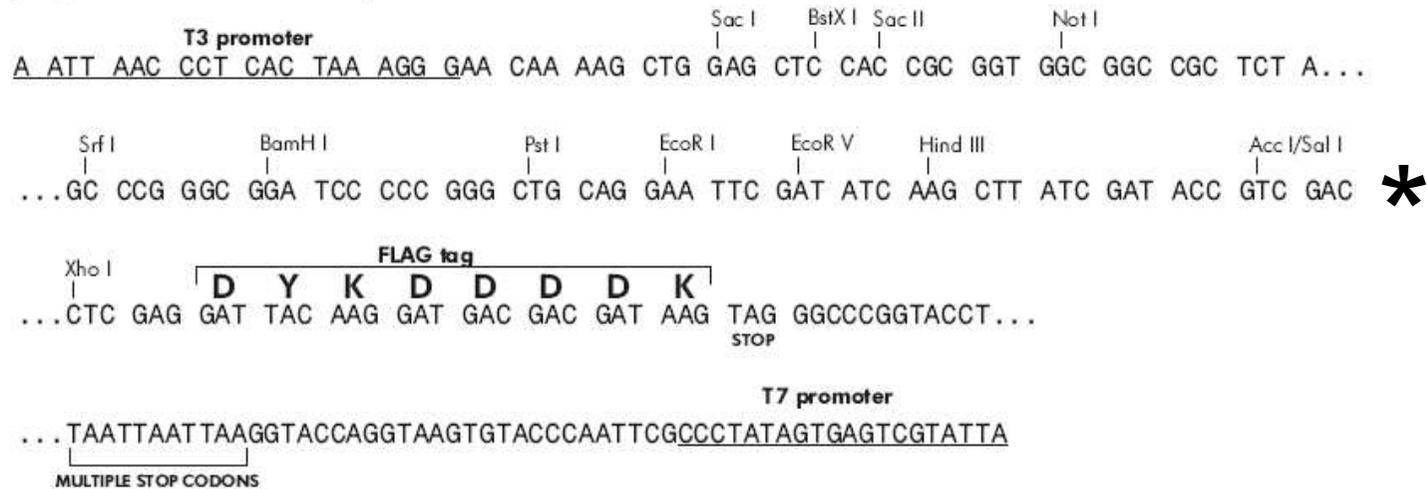
EGFP 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390  
 TAC AAG TAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GAT CCA CCG GAT CTA GAT AAC TGA TCA  
 Sca I Bgl III Xho I Sac I EcoR I Pst I Sal I Kpn I Acc I Asp718 I Apa I Bsp120 I Xma I Sma I Xba I\* Bcl I\*



# pCMV-Tag 4A

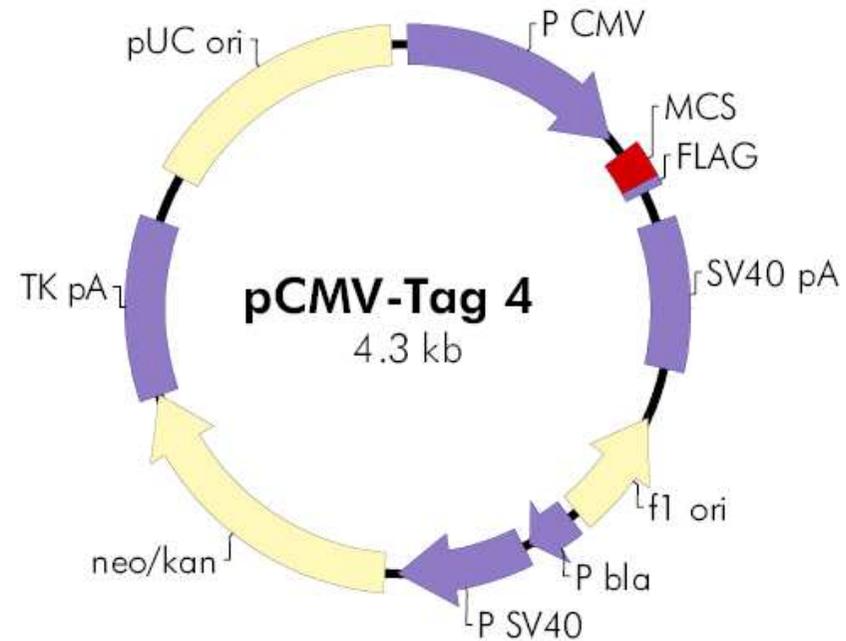


## pCMV-Tag 4 Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620–839)

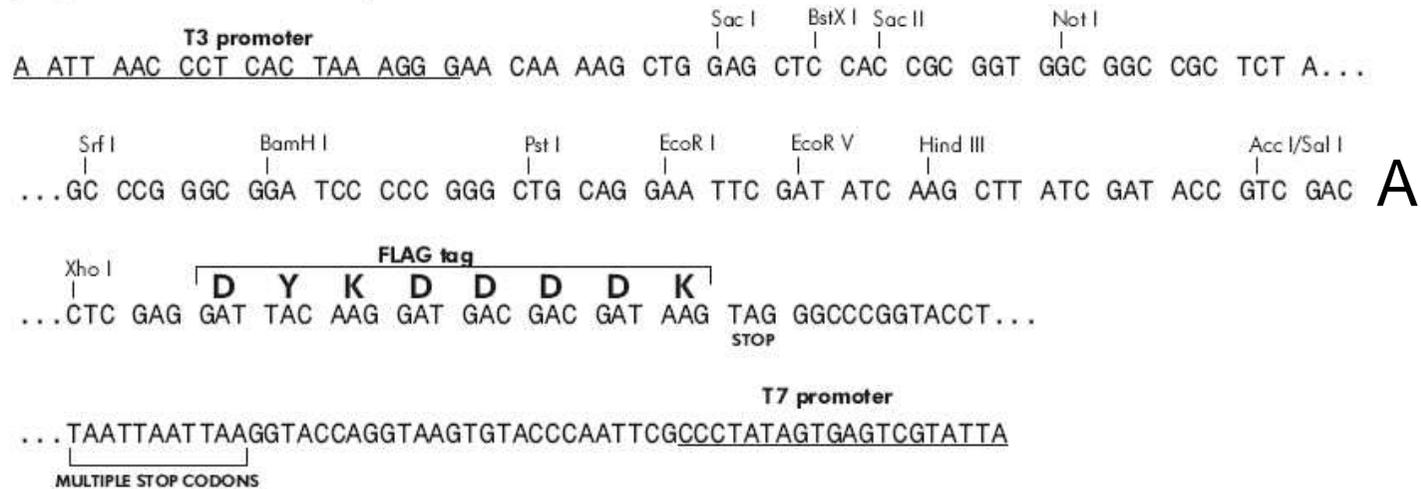


\* In pCMV-Tag 4A, no bases inserted; in pCMV-Tag 4B, A inserted; in pCMV-Tag 4C, AA inserted

# pCMV-Tag 4B

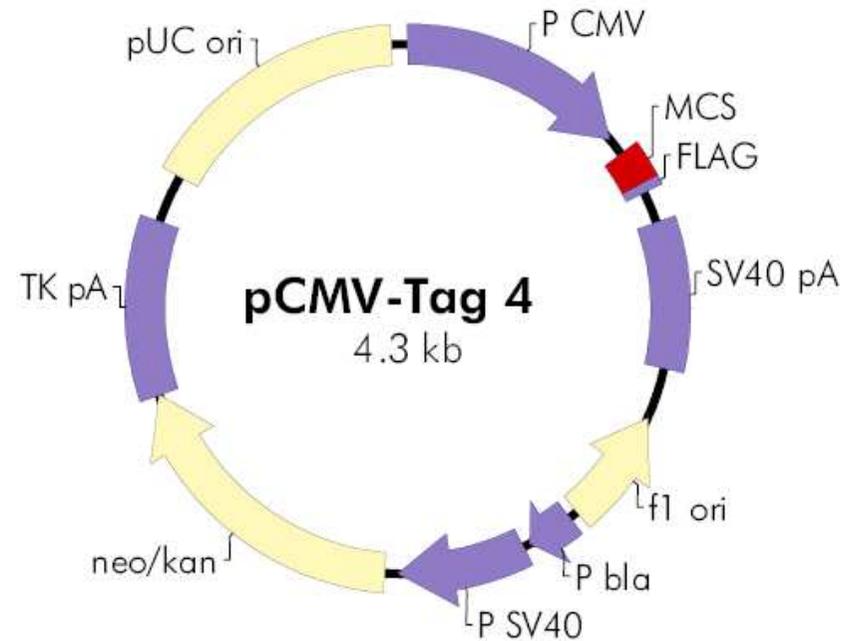


## pCMV-Tag 4 Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620–839)



\* In pCMV-Tag 4A, no bases inserted; in pCMV-Tag 4B, A inserted; in pCMV-Tag 4C, AA inserted

# pCMV-Tag 4C



## pCMV-Tag 4 Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620–839)

**T3 promoter**

A ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGT GGC GGC CGC TCT A...

Sac I BstXI Sac II Not I

...GC CCG GGC GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC **AA**

Srf I BamHI Pst I EcoRI EcoRV Hind III AccI/Sal I

**FLAG tag**

...CTC GAG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAG GGCCCGGTACCT...  
STOP

**T7 promoter**

...TAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

MULTIPLE STOP CODONS

\* In pCMV-Tag 4A, no bases inserted; in pCMV-Tag 4B, A inserted; in pCMV-Tag 4C, AA inserted

\* trovate una strategia di clonaggio per subclonare la NRG1-IIIbeta3 dal vettore pIRES-puro2 o dal vettore pCR-bluntlltopo o dal vettore pEGFP-C3 al vettore pCMV-Tag4, identificando

- quali siti di restrizione dovete usare per recuperare l'inserto?

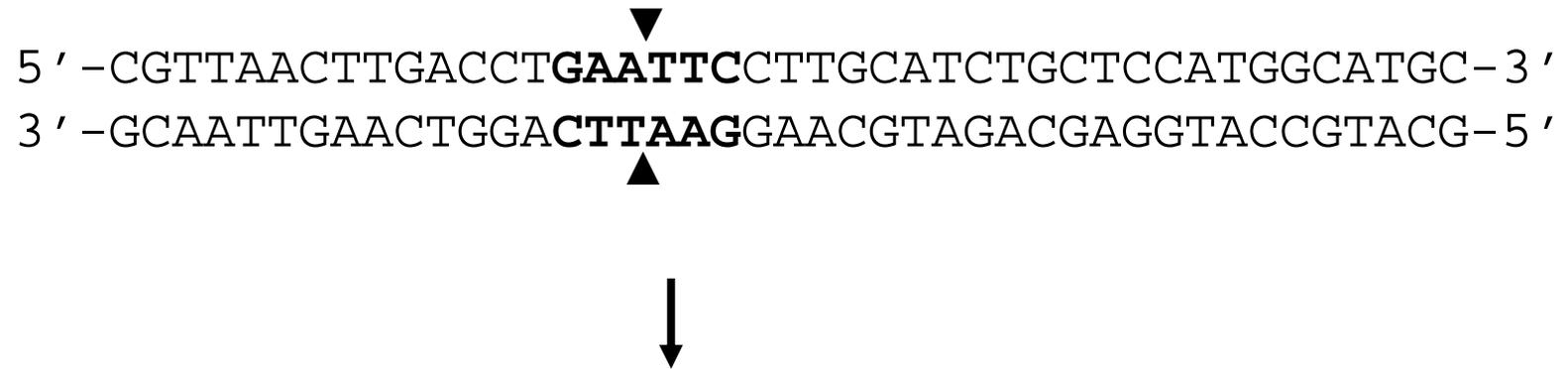
- quale dei tre plasmidi (4A, 4B o 4C) dovete usare per mantenere il frame fra la NRG1 e il FLAG?

**-> traducete la proteina che ottenete dopo il clonaggio: se l'avete messa correttamente in frame otterrete la NRG1 seguita dal FLAG: DYKDDDDK**

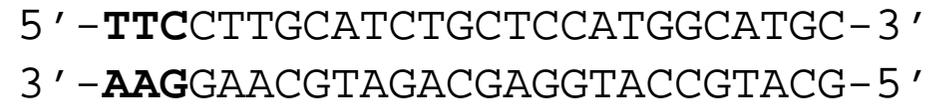
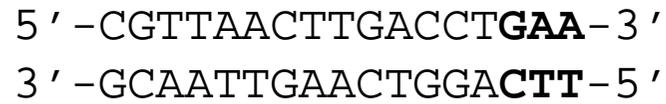
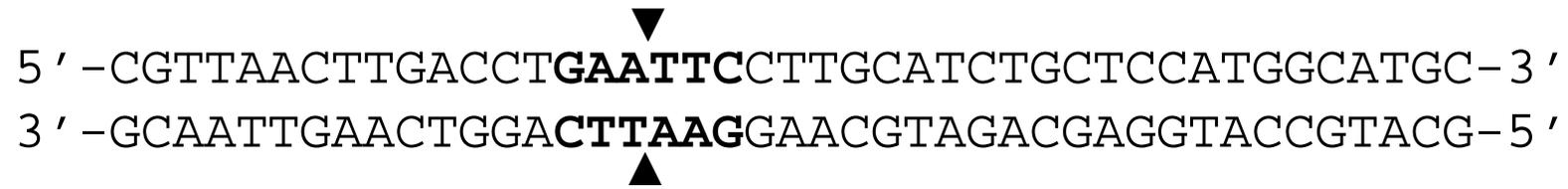
- se utilizzando il plasmide 4A la proteina NRG1 **NON** vi viene in frame con il FLAG, provate gli altri due plasmidi, 4B e 4C, aggiungendo nel *multiple cloning site*, dove c'è l'asterisco, una A (plasmide 4B) o due A (AA, plasmide 4C).

- 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.
- **importante!** Poiché la proteina che clonate deve essere *in frame* con il flag dovete essere in grado di prevedere come saranno le estremità blunt che otterrete in seguito a bluntizzazione, per poter scegliere fra pCMV-Tag4 A, B o C.

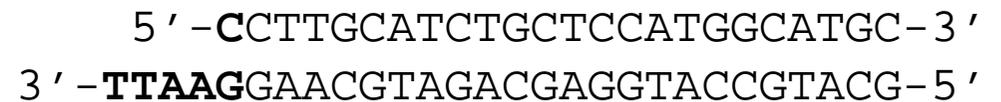
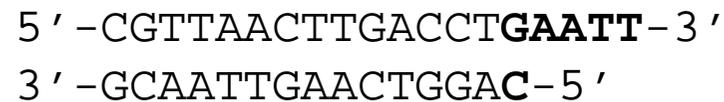
Es: SITO GIA' BLUNT



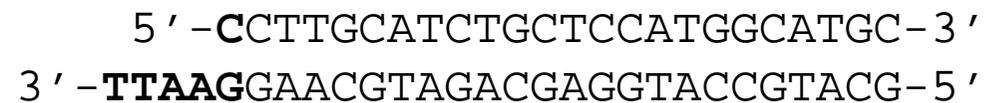
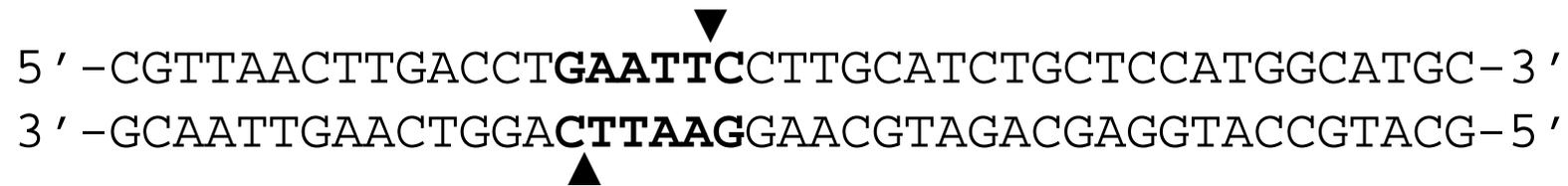
Es: SITO GIA' BLUNT



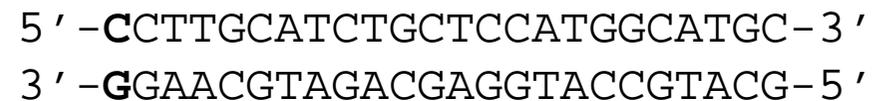
## Es: BLUNTIZZAZIONE DI TIPO I (3' PROTRUDING)



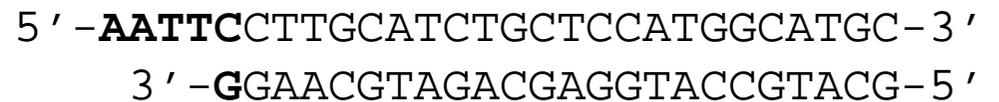
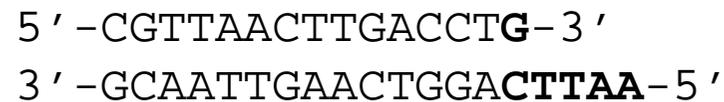
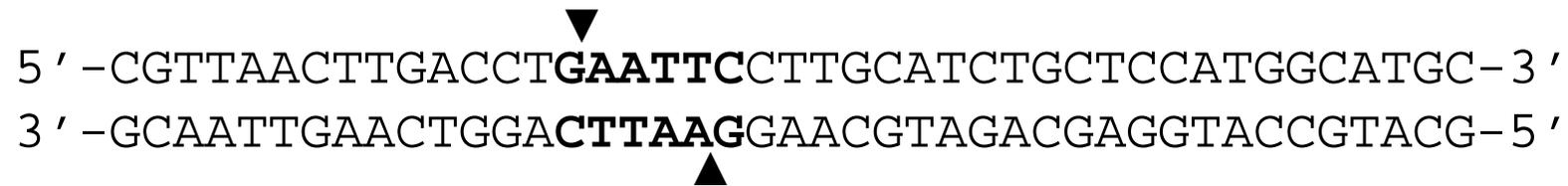
## Es: BLUNTIZZAZIONE DI TIPO I (3' PROTRUDING)



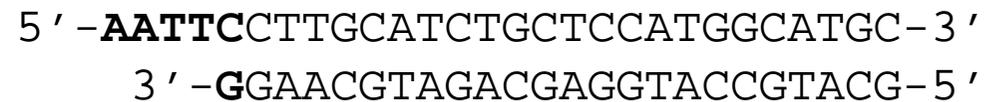
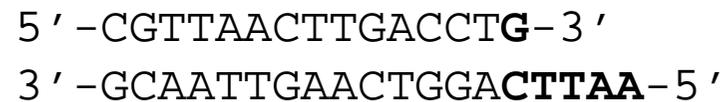
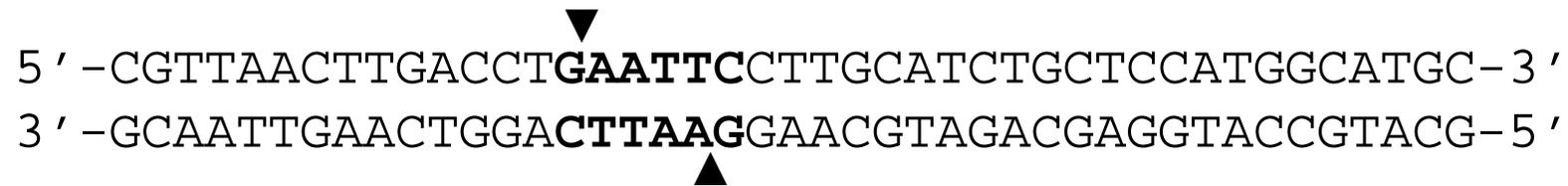
3'-DNA esonucleasi



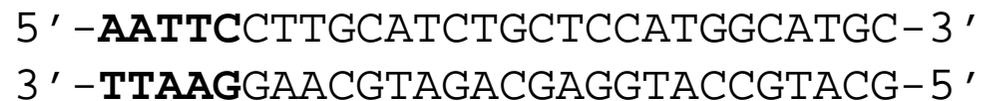
## Es: BLUNTIZZAZIONE DI TIPO I (5' PROTRUDING)



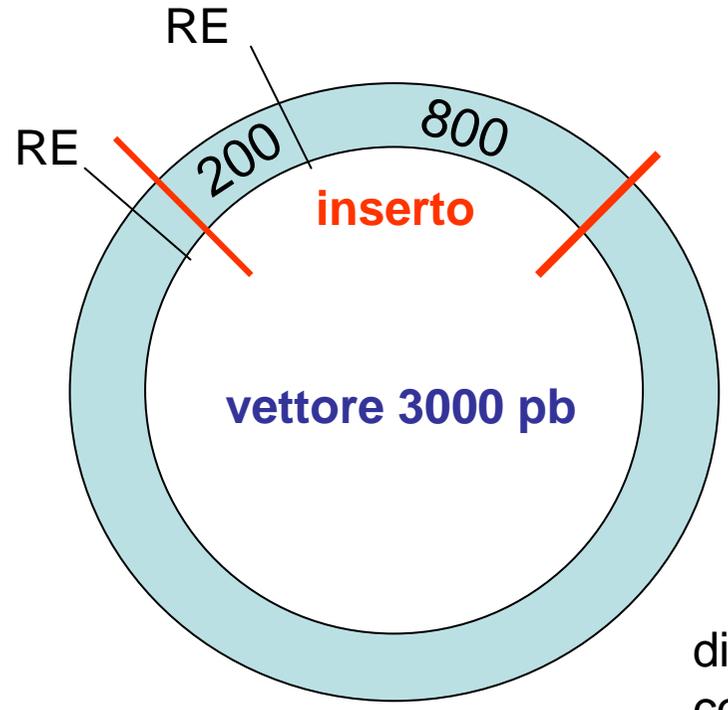
## Es: BLUNTIZZAZIONE DI TIPO I (5' PROTRUDING)



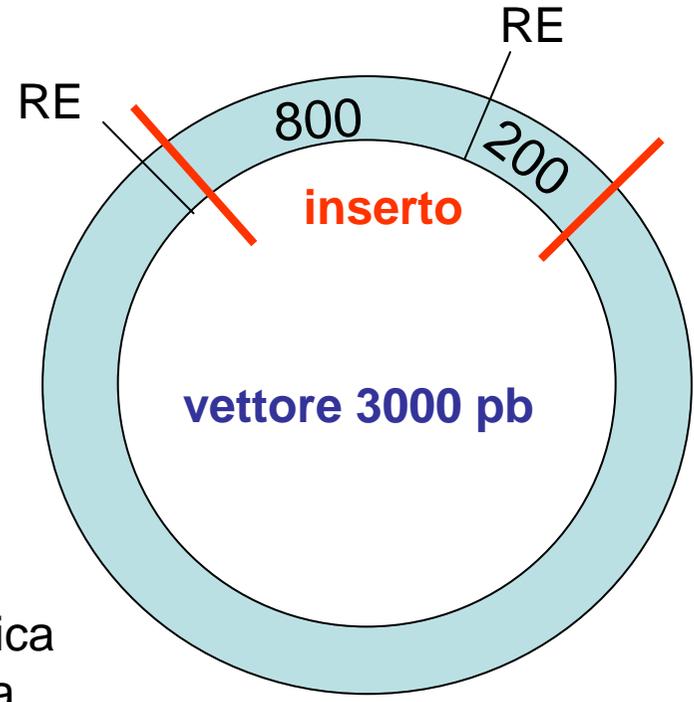
DNA polimerasi (klenow)



- 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



**SENSO**



**ANTISENSO**



digestione enzimatica  
corsa elettroforetica

