

INGEGNERIA CELLULARE



Alcune definizioni:

DNA ricombinante:

Molecole di DNA prodotte artificialmente e contenenti sequenze provenienti da diversi organismi.

Ingegneria genetica:

Uso di tecniche che utilizzano le tecnologie del DNA ricombinante per produrre molecole e/o organismi con caratteristiche nuove.

Biotechnologie:

Termine che comprende diverse tecnologie che includono ma non sono limitate al DNA ricombinante. Si riferisce a tecnologie applicate per risolvere i problemi fondamentali della biologia.

INGEGNERIA CELLULARE: Branca della Biotechnologie che utilizza sistemi cellulari procariotici ed eucariotici ingegnerizzati (modificati) per la produzione di molecole di importanza biologica o per ripristinare funzioni fisiologiche perse da un organismo

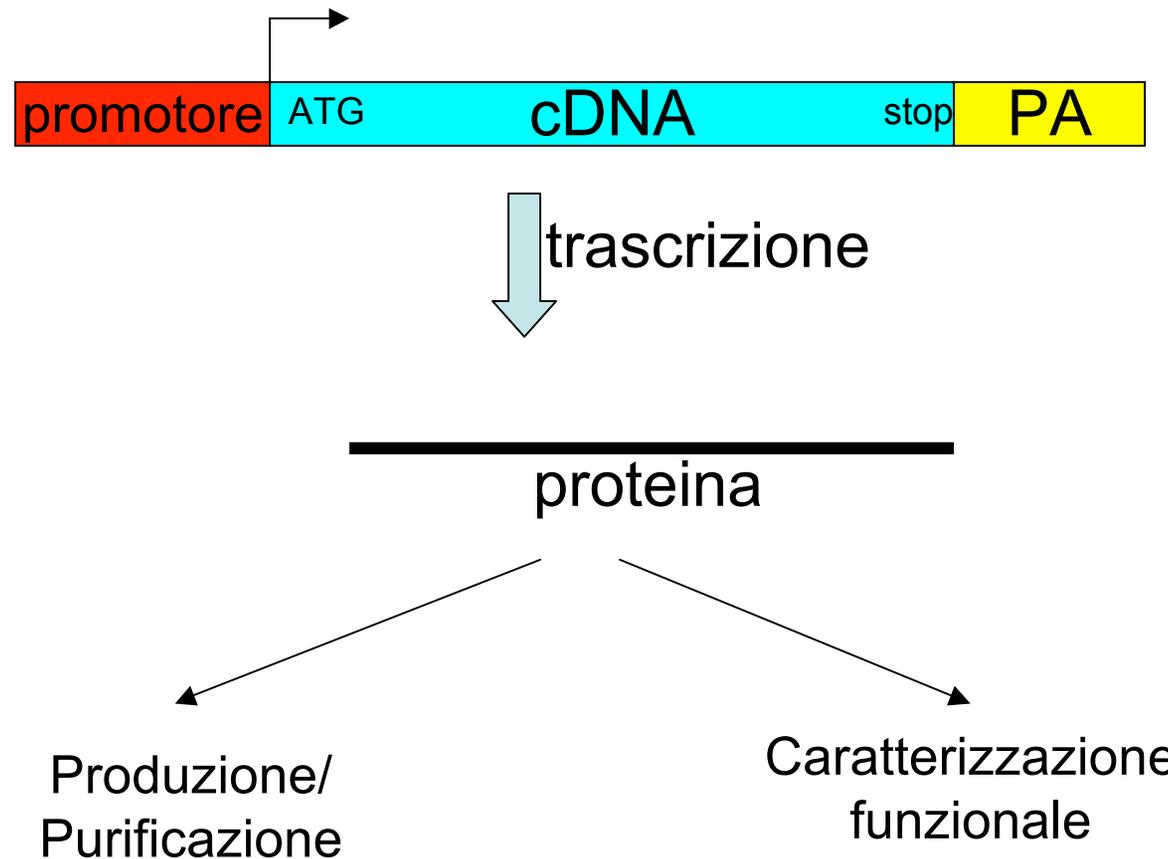
IL DNA RICOMBINANTE NON SERVE SOLO PER STUDIARE I GENI:

PRODUZIONE DI PROTEINE PER MEZZO DELL' INGEGNERIA GENETICA

Applicazioni delle proteine ricombinanti:

- PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO.
- PROTEINE DI INTERESSE COMMERCIALE (ENZIMI).
- PROTEINE DA UTILIZZARE COME ANTIGENI PER LA PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI E MONOCLONALI.
- REAGENTI PER LA RICERCA DI BASE E APPLICATA.

IL DNA CLONATO PUO' VENIRE ESPRESSO IN CELLULE BATTERICHE O EUCARIOTICHE



SISTEMI DI ESPRESSIONE

Procariotici (E.Coli)

Eucariotici:

Saccharomyces Cerevisiae (lievito)

Cellule di insetto (Baculovirus)

Cellule di mammifero in coltura (CHO etc.)

Animali transgenici

Piante transgeniche

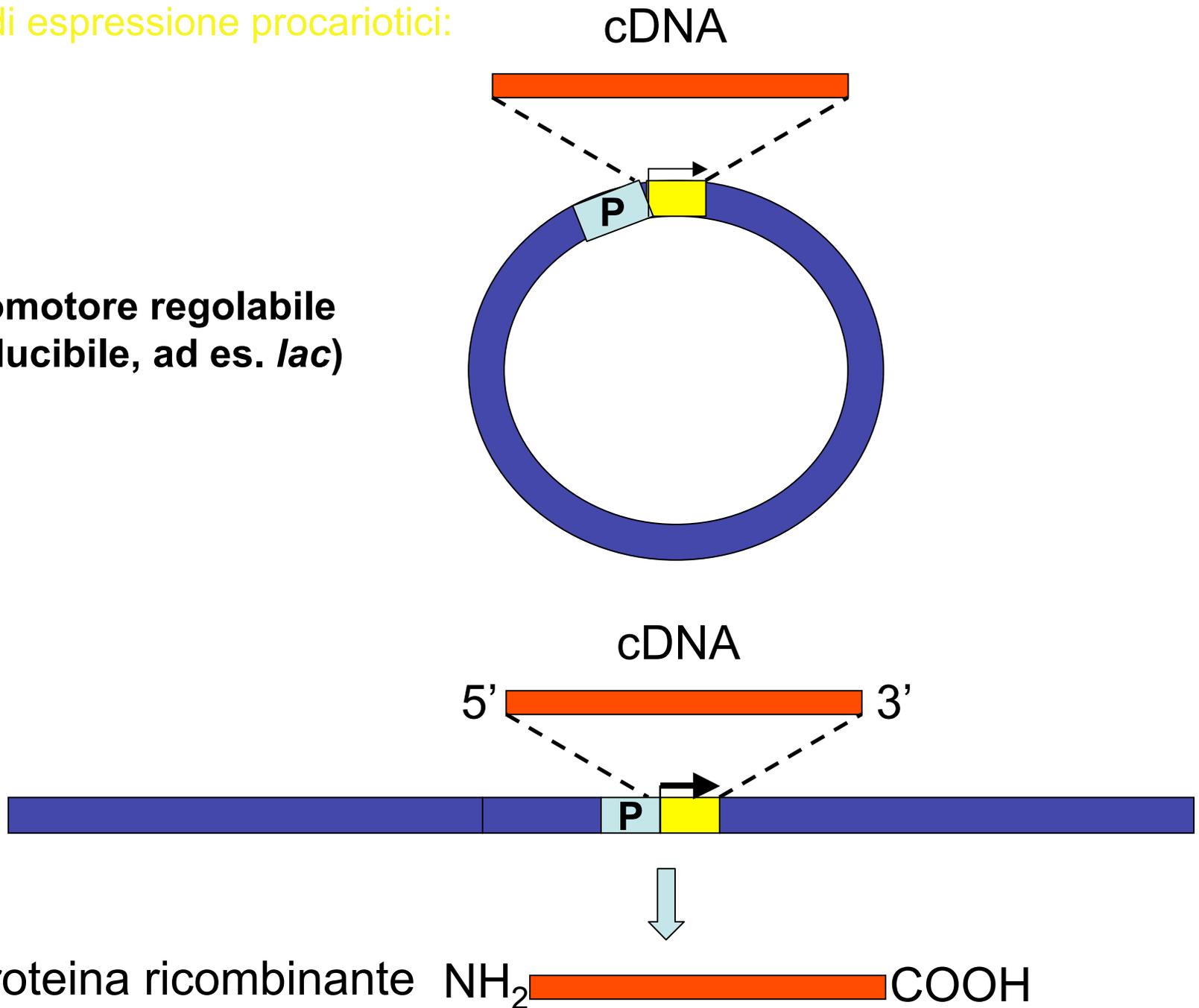
Sistemi di espressione procariotici:

Plasmidi

- **Piccole molecole extracromosomiche circolari (2-3 kb) isolati da cellule batteriche e dotati di capacità di replicazione autonoma ma che non possono integrarsi nel cromosoma batterico.**
- **I plasmidi per le resistenze non sono essenziali per la crescita batterica ma conferiscono resistenza ad antibiotici.**
- **I plasmidi utilizzati per il clonaggio molecolare sono stati creati artificialmente mediante ricombinazione di frammenti provenienti da diversi plasmidi.**
- **I plasmidi contengono siti di clonaggio multipli con diversi siti di restrizioni per endonucleasi.**

Sistemi di espressione procariotici:

Promotore regolabile
(inducibile, ad es. *lac*)

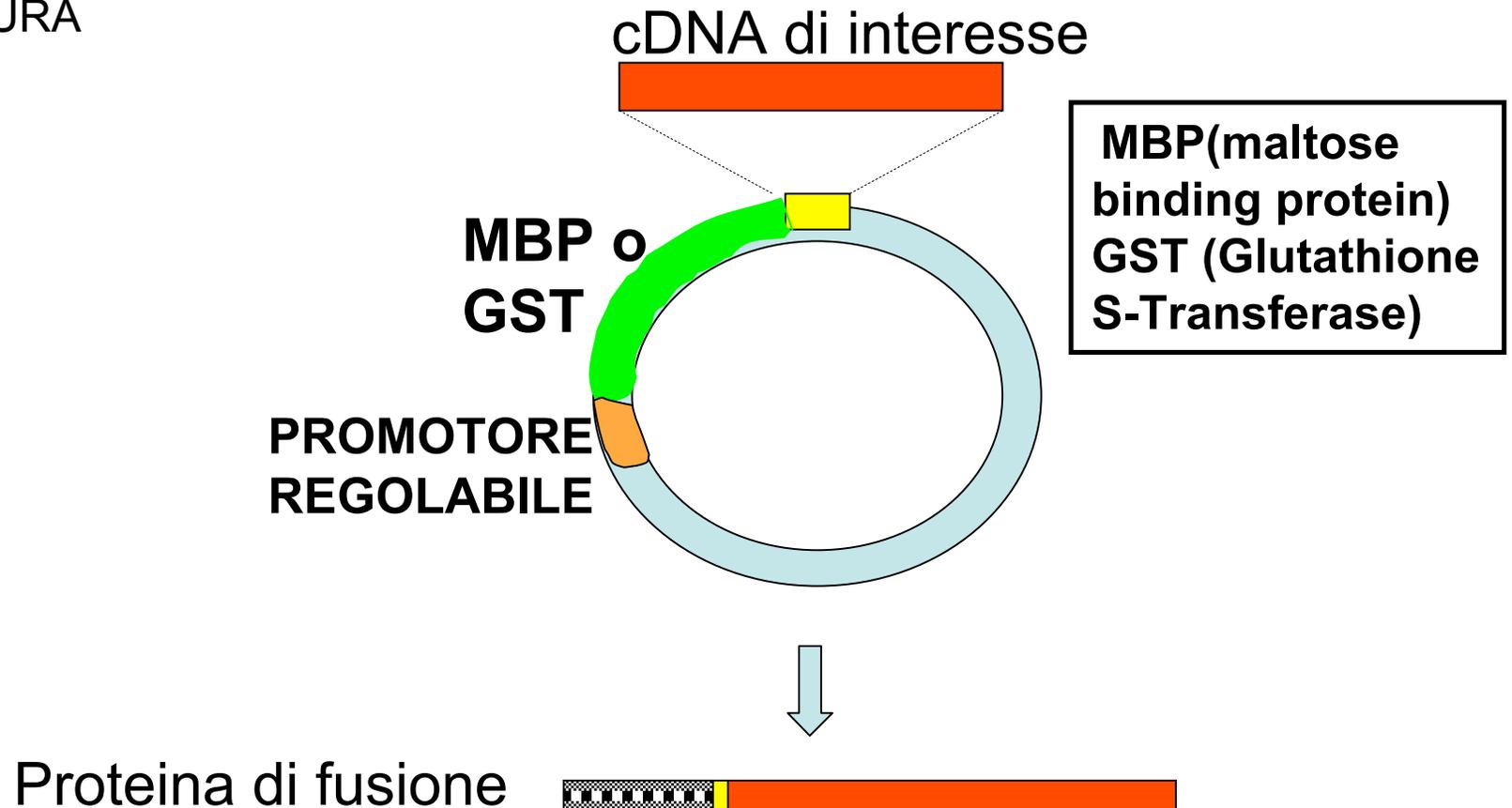


Sistemi di espressione procariotici:

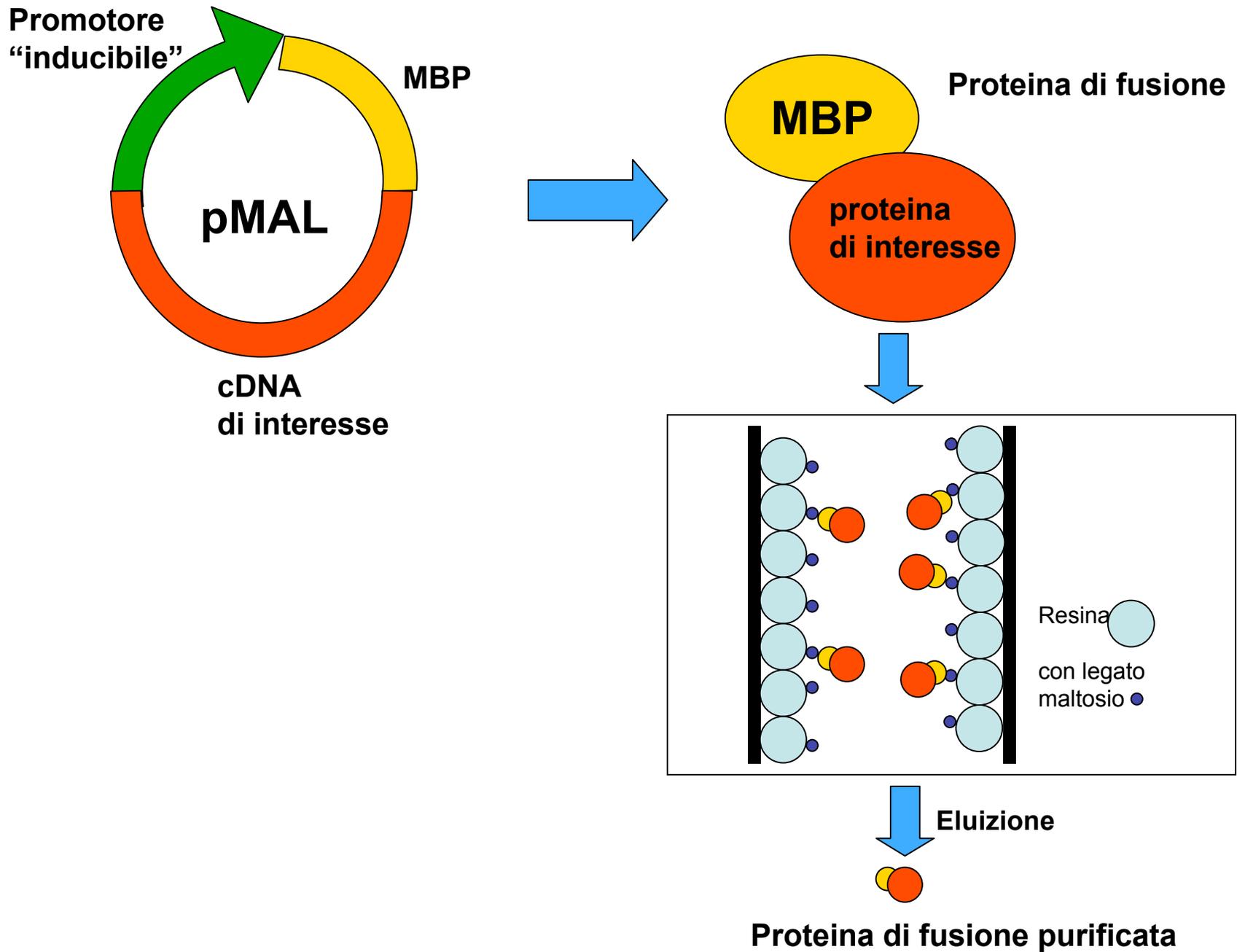
PROTEINE DI FUSIONE

-PER EVITARE DEGRADAZIONE DI PROTEINE ETEROLOGHE E PER PERMETTERNE LA PURIFICAZIONE QUESTE VENGONO PRODOTTE COME PROTEINE DI FUSIONE CON UNA PROTEINA STABILE DELL'ORGANISMO OSPITE.

- I DUE cDNA DEVONO ESSERE FUSI MANTENENDO LA CORRETTA CORNICE DI LETTURA



Sistemi di espressione procariotici:



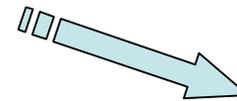
Sistemi di espressione procariotici:

The FLAG[®] Protein Expression System

The FLAG system relies on the carefully engineered FLAG octapeptide fusion tag:

Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys

- The FLAG peptide is very hydrophobic, increasing the likelihood that it will be located on the surface of the fusion protein where it is accessible to antibodies
- A variety of antibodies facilitates detection and purification without denaturation
- The FLAG peptide itself gently elutes fusion proteins from anti-FLAG affinity gels
- The small size of the FLAG epitope allows most fusion proteins to retain the conformation and function of the untagged protein. If necessary, the protease **enterokinase** allows cleavage of the FLAG peptide.



Expression vectors for FLAG fusion proteins:

- N-terminal or C-terminal FLAG location
- **Mammalian**, **yeast**, **bacterial** expression vectors

Protein localization either intracellular (Met-FLAG-Protein) or extracellular (preprotrypsin-FLAG-Protein)

Protein localization either cytoplasmic (Met-FLAG-Protein) or periplasmic (ompA-FLAG-Protein)

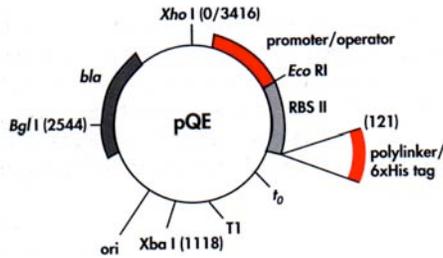
Protein localization extracellular (α -factor-FLAG-Protein)

Monoclonal anti-FLAG antibodies:

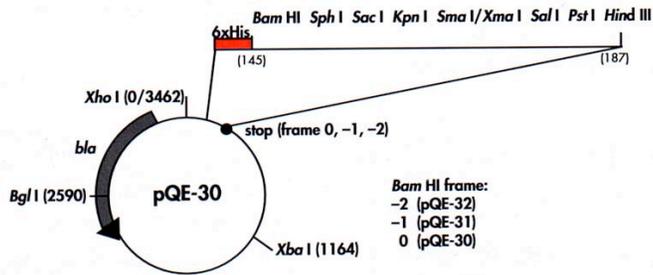
- Anti-FLAG M1 → binds to N-term FLAG fusion proteins in a Ca⁺⁺-dependent manner
- Anti-FLAG M2 → binds to FLAG epitope at any position; can be dissociated by competition with FLAG peptide
- Anti-FLAG M5 → best for detecting Met-FLAG peptides expressed in cytoplasm

Sistemi di espressione procariotici:

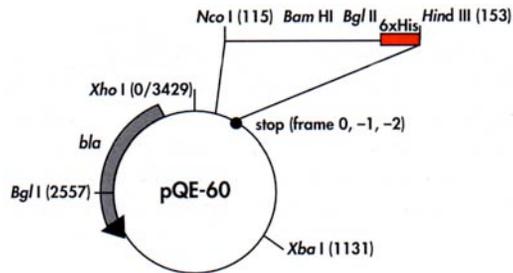
Expression vectors for His-tagging (QIAGEN)



pQE-30, -31, -32

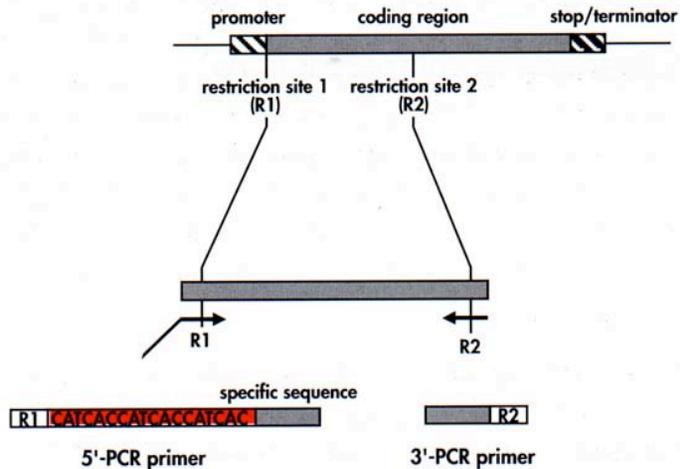


N-terminal Tag

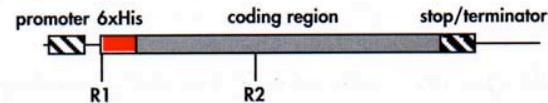


C-terminal Tag

Modification of insert by PCR



- Amplify fragment by PCR
- Cut fragment with restriction enzymes 1 and 2
- Cut vector with restriction enzymes 1 and 2 and gel purify
- Religate modified fragment with vector

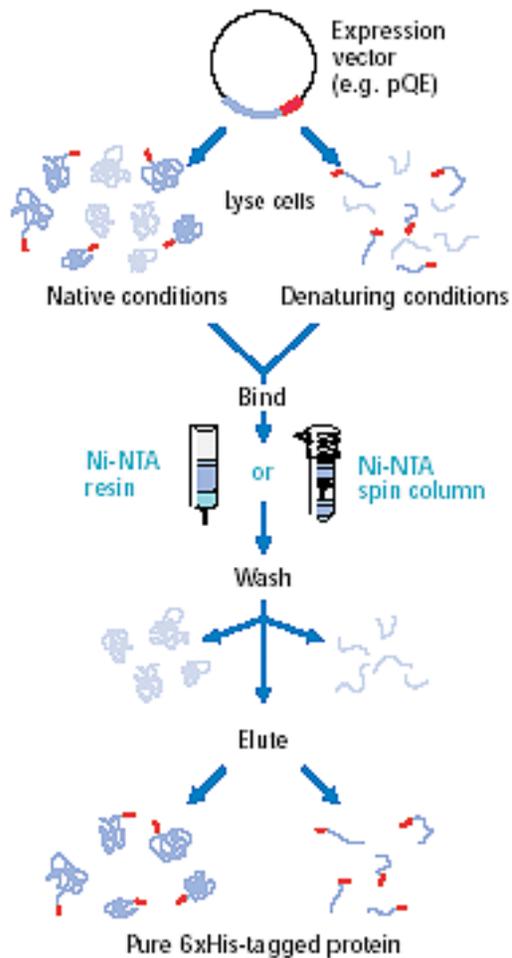


Modification of inserts by PCR.

Sistemi di espressione procariotici:

Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)

Protein Purification with the Ni-NTA Protein Purification System



Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid)

Ni-NTA purification procedure

Prepare cell lysate containing 6xHis-tagged protein

Bind 6xHis-tagged protein onto Ni-NTA column (pH 8.0, 0-10 mM imidazole)

Wash protein/resin complex (pH 8.0, 0-20 mM imidazole)

Elute 6xHis-tagged protein (pH 8.0, 250 mM imidazole)

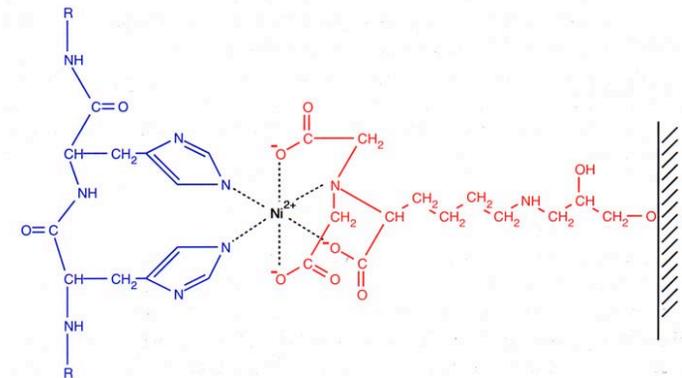
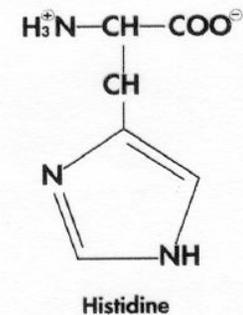
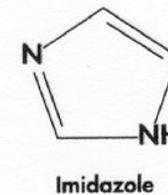


Figure 5. Interaction between neighboring residues in the 6xHis tag and Ni-NTA matrix.



Kits : Purification and Isolation of Recombinant Proteins

Company	Product	Principle of Protein Purification	Cleavage of Tag	Detection System
Amersham Pharmacia Biotech	Glutathione S-transferase Gene Fusion System	Fusion with GST (26kDa). Binding to Sepharose-coupled glutathione Elution of protein with reduced glutathione.	On the column or after elution - by thrombin or PreScission™ Protease	a) enzymatic test of GST activity b) immunologically with polyclonal anti-GST antibodies
Sigma	FLAG® Protein Expression System	Fusion with FLAG, a octapeptid. Binding to immobilized anti-FLAG antibodies. Elution by addition of FLAG peptide or by pH decrease	If necessary it is possible by enterokinase	Immunologically: three different monoclonal anti-FLAG antibodies
Stratagene	Affinity™ Protein Expression and Purification System	Fusion with calmodulin-binding peptide (CBP, 4 kDa). Binding to calmodulin-resin in the presence of Ca ⁺⁺ at physiological pH (K _D = 10 ⁻⁹ M). Elution with EGTA.	By thrombin or enterokinase (depending on the vector)	Detection by biotinylated calmodulin combined with a streptavidin-alkaline-phosphatase-conjugate.

Company	Product	Principle of Protein Purification	Cleavage of Tag	Detection System
Promega	Pin Point™ Protein Purification System	Fusion with a protein fragment (12.5 kDa), which <i>in vivo</i> becomes biotinylated. Binding to avidin resin. Elution with desthiobiotin	By Factor Xa Protease	Detection directly by streptavidin-alkaline-phosphatase conjugate.
New England Biolabs (NEB)	pMAL™ Protein Fusion and Purification System	Fusion with maltose-binding protein (MBP, 42.7 kDa). Binding to amylose resin. Elution with maltose.	By Factor Xa cleavage	Immunologically by anti-MBP serum.
	Impact™ T7 System	Fusion with intein from yeast, which in turn is fused to the chitin binding protein (CBD). Binding of fusion protein to a chitin column. Self-cleavage of the target protein by addition of DTT.	<u>Self-catalytic by protein splicing</u>	Detection possible with anti CBD antibodies.

Company	Product	Principle of Protein Purification	Cleavage of Tag	Detection System
Invitrogen	Thio-Fusion™ Expression System and His-Patch Thio Fusion™ Expression System	Fusion with thioredoxin (11.7 kDa) or His-Patch thioredoxin. Binding to ThioBond™ or Ni ²⁺ chelating resin. The ThioBond™ resin is coupled to phenylarsine oxide (PAO). Thioredoxin has a unique active site dithiol that has a high affinity for, and reacts specifically with, PAO. Elution with β-ME (ThioBond) imidazol, histidine or lower pH (Ni ²⁺ chelating resin).	By enterokinase.	Immunologically by monoclonal Anti-Thio™ antibody (recognizes thioredoxin)
Qiagen	QIAexpress system for 6xHis-tagged Proteins	Fusion with 6xHis-tag. Binding to Ni ²⁺ chelating resin (Ni-NTA). Elution with imidazol, low pH (pH 4.5-5.9). <u>Purification under denaturing conditions is also possible</u> (6M GuHCl or 8M urea), in case the protein is not soluble.	Not foreseen.	a) directly with Ni-NTA-alkaline-phosphatase- or Ni-NTA-horse-radish-peroxidase-conjugates. b) Immunologically with monoclonal anti-His antibodies.

Sistemi di espressione procariotici:

PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO IN PROCARIOTI:

Vantaggi

- SISTEMI DI ESPRESSIONE MOLTO SEMPLICI DA MANIPOLARE
- PRODUZIONE DI PROTEINE IN GRANDI QUANTITA' E A BASSO COSTO
- RISCHIO CONTAMINAZIONE VIRALE NULLO
- RISCHIO ALLERGIE RIDOTTO RISPETTO ALLA PURIFICAZIONE DI PROTEINE ETEROLOGHE (vengono prodotte proteine umane)

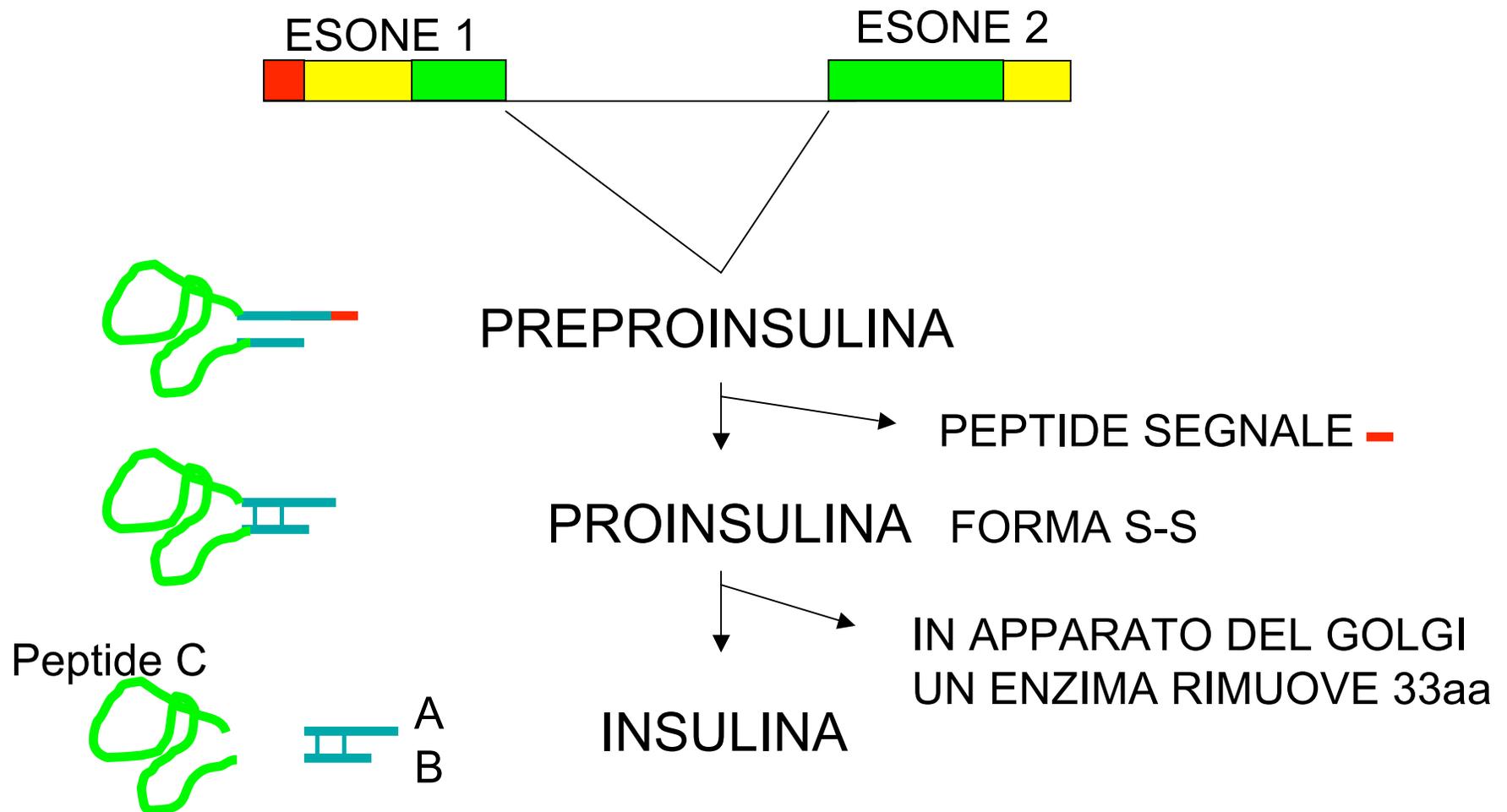
Problemi

- E' DIFFICILE OTTENERE PROTEINE CHE MANTENGONO LA CONFORMAZIONE NATIVA DELLE PROTEINE UMANE (i sistemi di folding dei batteri sono molto meno sofisticati che negli eucarioti)
- I BATTERI MANCANO DI ADEGUATI SISTEMI DI MODIFICAZIONE POST-TRADUZIONALE (glicosilazione, tagli proteolitici, fosforilazione, aggiunta di lipidi). IMPORTANTI CONSEGUENZE SULLA ATTIVITA' BIOLOGICA E SULLA ANTIGENICITA'

Sistemi di espressione procariotici:

SINTESI INSULINA IN CELLULA PANCREATICA

CATENA A → 30 aa
CATENA B → 21 aa Unite da ponti S-S



Sistemi di espressione procariotici:

PRODUZIONE DI INSULINA UMANA IN E. coli

-70 MAIALI PER 1 PAZIENTE PER UN ANNO

-SI PUO' PRODURRE INSULINA UMANA NEI BATTERI?

-E. Coli NON SA MATURARE pre mRNA EUCARIOTICI
E PRODURRE LE CORRETTE MODIFICAZIONI
POST-TRADUZIONALI

Sistemi di espressione procariotici:

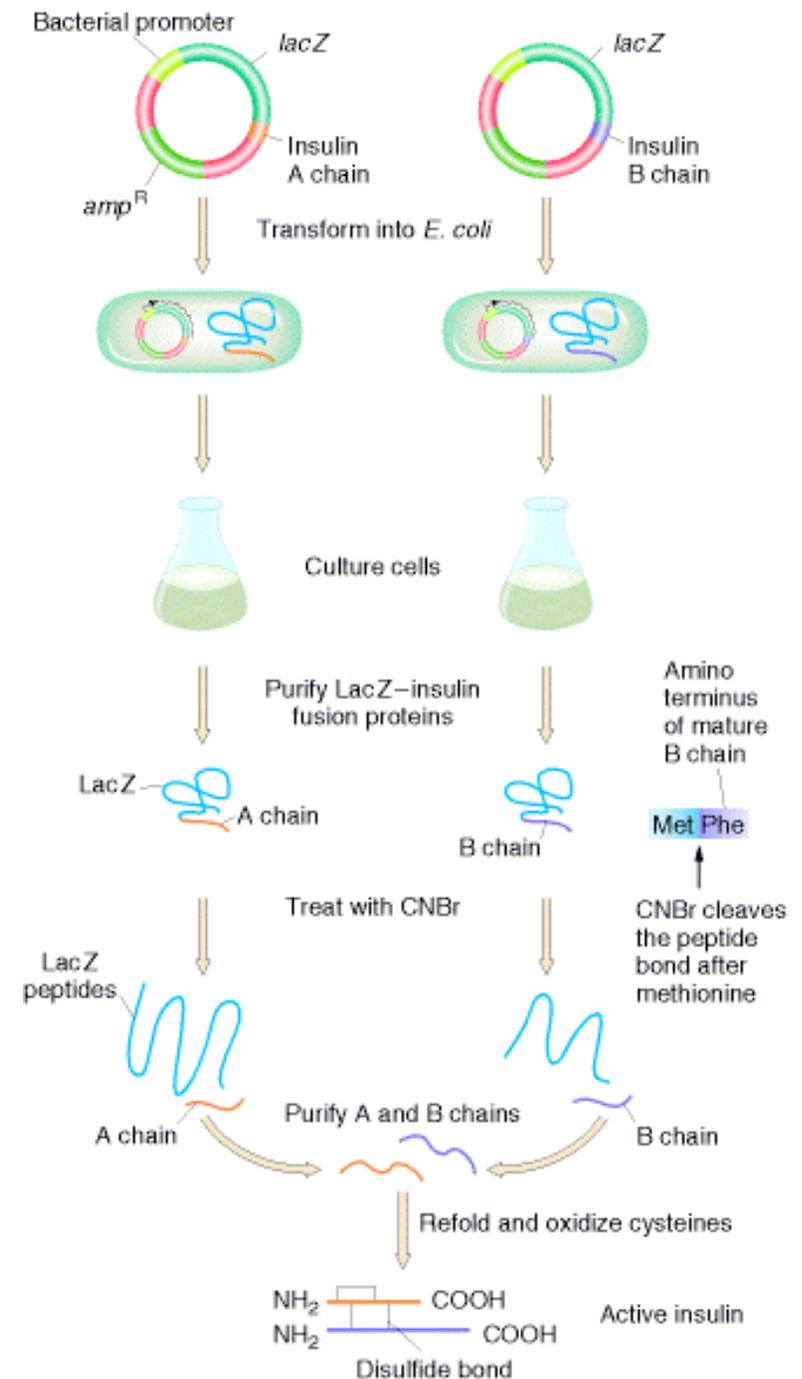
PRODUZIONE DI INSULINA RICOMBINANTE IN BATTERI

-Plasmidi separati codificano per Catena A e B

-uso del promotore e di alcuni codoni iniziali LacZ (proteina di fusione)

-le sequenze LacZ sono eliminate con trattamento con bromuro di cianato

-catene mescolate assieme e tramite un processo chimico si formano legami S-S



Cleavage sites engineered into fusion proteins in *E. coli*

Sequence recognized

Cleavage factor

Asp ↓ - Pro

Acid pH

Met ↓ - X

CNBr

Arg ↓ - X or Lys ↓ - X

Trypsin

Arg ↓ - X

Clostripain

Ile - Glu - Gly - Arg ↓ - X

Factor Xa

Leu - Val - Pro - Arg ↓ - Gly - Ser

Thrombin

Leu - Glu - Val - Leu - Phe - Gln ↓ - Gly - Pro

PreScission Protease™

(Amersham-Pharmacia, fusion of human rhinovirus 3C protease and GST)

Asp - Asp - Asp - Asp - Lys ↓ - X

Enterokinase

Sistemi di espressione procariotici:

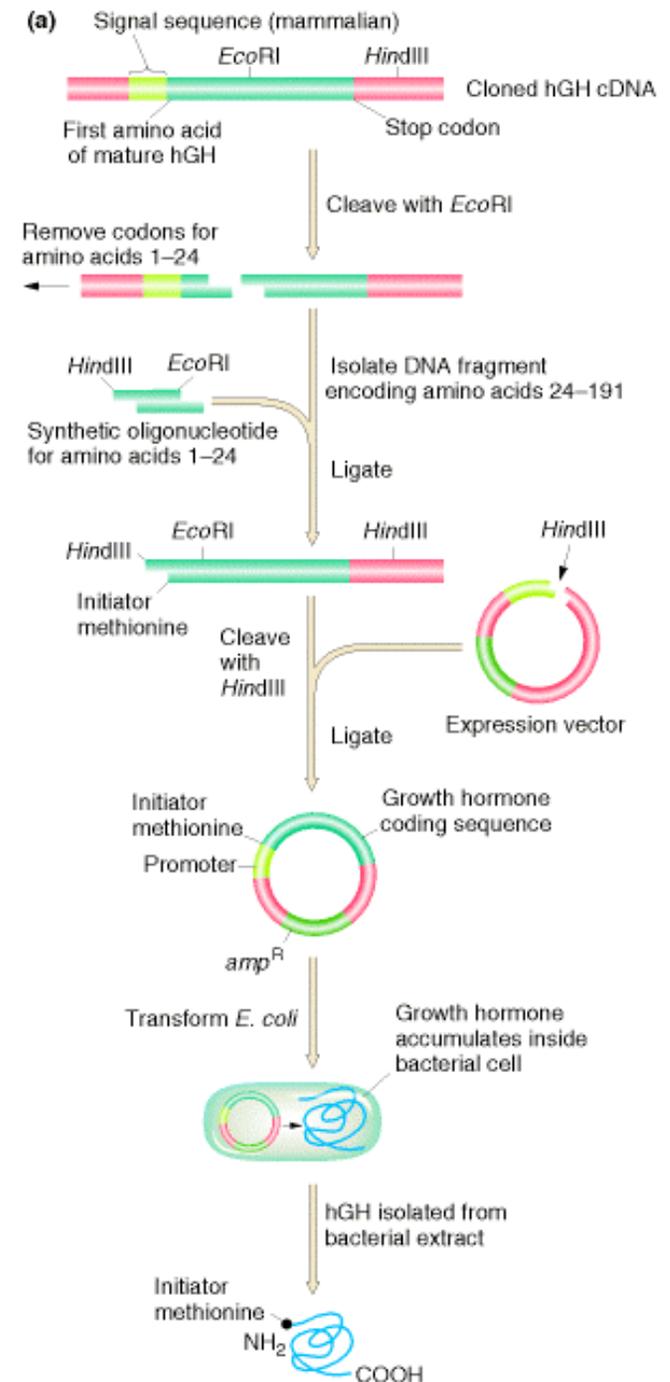
PRODUZIONE ORMONE DELLA CRESCITA UMANO IN E. Coli

-Peptide di 191 aa

-Carenza provoca nanismo ipofisario

-GH da animali non è efficace sull'uomo

-80 ipofisi di cadaveri umani per un paziente per un anno (alto rischio infezioni - CJ)



Sistemi di espressione eucariotici:

MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE EUCARIOTICHE

Vantaggi rispetto a sistemi procariotici

- FORMAZIONE CORRETTA DI PONTI DISOLFURO
- FOLDING CORRETTO
- TAGLIO PROTEOLITICO DA PRECURSORE
- GLICOSILAZIONE
- MODIFICAZIONE DI aa (FOSFORILAZIONE, ACETILAZIONE, MIRISTILAZIONE, ecc.)

Sistemi di espressione eucariotici:

PRODUZIONE DI VACCINO CONTRO EPATITE B IN LIEVITO

-VACCINI ATTENUATI SONO VIRUS ALTERATI IN MODO CHE NON POSSANO PIU' RIPRODURSI NELL'ORGANISMO IN CUI VENGONO INOCULATI

-QUESTI VACCINI SONO POTENZIALMENTE PERICOLOSI : POSSONO ESSERE CONTAMINATI CON VIRUS INFETTIVI

-TENTATIVI DI PRODURRE ANTIGENE DI SUPERFICIE DI VIRUS EPATITE B (HBsAg) IN E. Coli FALLIRONO

-IL GENE CODIFICANTE HBsAg E' STATO CLONATO IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE DI LIEVITO.

-LIEVITO TRASFORMATO CON QUESTO VETTORE PRODUCE ELEVATE QUANTITA' DI HBsAg

-UTILIZZANDO FERMENTATORI E' POSSIBILE OTTENERE 50-100 mg DI PROTEINA PER LITRO DI COLTURA

Sistemi di espressione eucariotici:

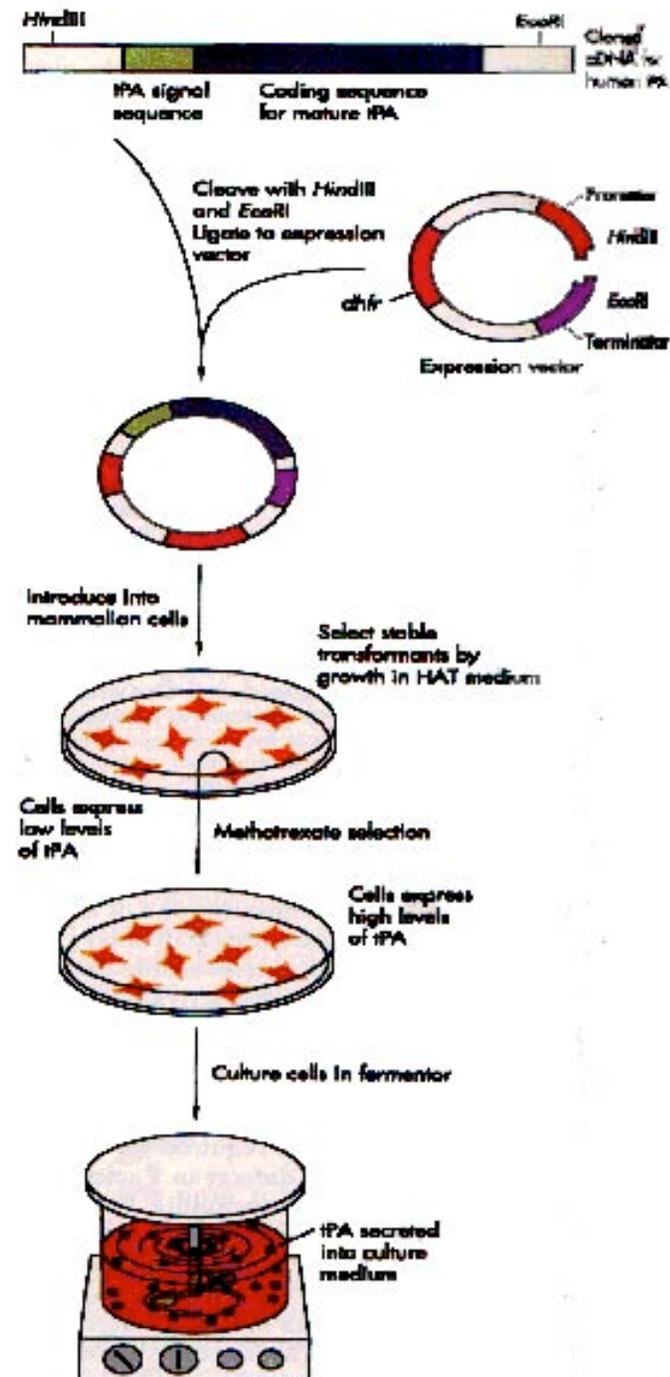
ATTIVATORE PLASMINOGENO TISSUTALE (t-PA)

INTERFERON BETA-1a

- **t-PA** E' UTILIZZATO NELLA TERAPIA DEGLI ATTACCHI CARDIACI (DISTRUGGE PICCOLI COAGULI DI SANGUE)
 - **INTERFERON BETA-1a** E' USATO NELLA TERAPIA DELLA SCLEROSI MULTIPLA.
- SONO PRODOTTI DA LINEE CELLULARI DI MAMMIFERO (CHO) IN COLTURA, NELLE GENOMA DELLE QUALI IL VETTORE DI ESPRESSIONE SI E' INTEGRATO STABILMENTE A SEGUITO DELLA TRASFEZIONE.

Sistemi di espressione eucariotici:

Espressione in cellule di mammifero di t-PA



Trasferimento genico (procarioti):

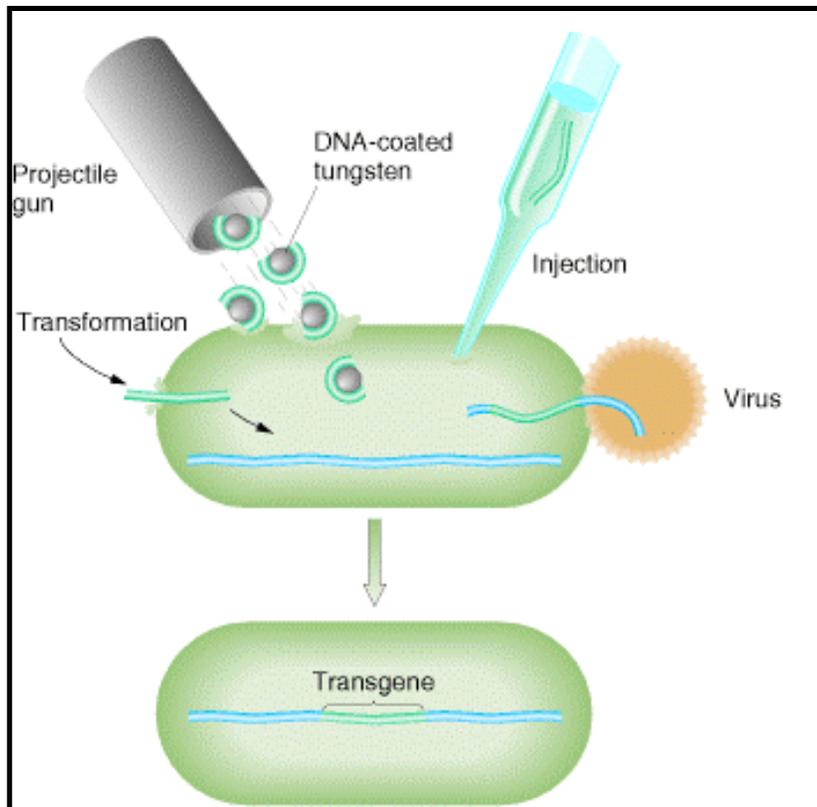
Cellule batteriche pronte a ricevere il DNA: c.COMPETENTI

Trattare le cellule con cloruro di calcio rende la membrana piu' permeabile al DNA. Questa tecnica si utilizza per quelle cellule che non sono naturalmente competenti come E.Coli.

Metodo alternativo: Elettroporazione

Trasferimento genico:

Sistemi di trasferimento genico (trasduzione)



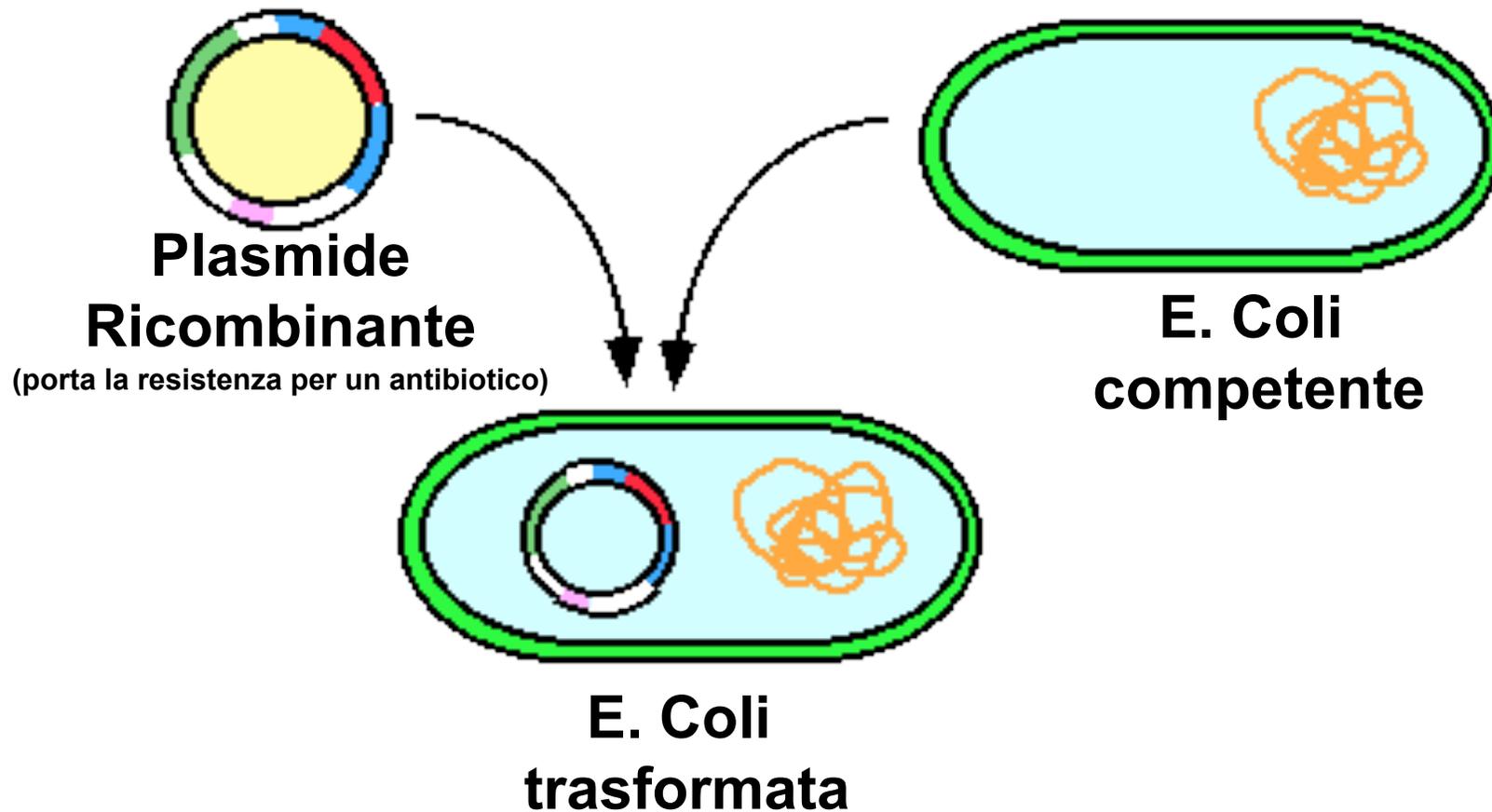
- Trasformazione (batteri)
- Trasfezione (eucarioti)
- Infezione (se il vettore è un virus)

Tecniche di trasfezione:

- Uso di sostanze permeabilizzanti
- Elettroporazione
- Sistemi liposomici
- Bombardamento con microparticelle
- Microiniezione

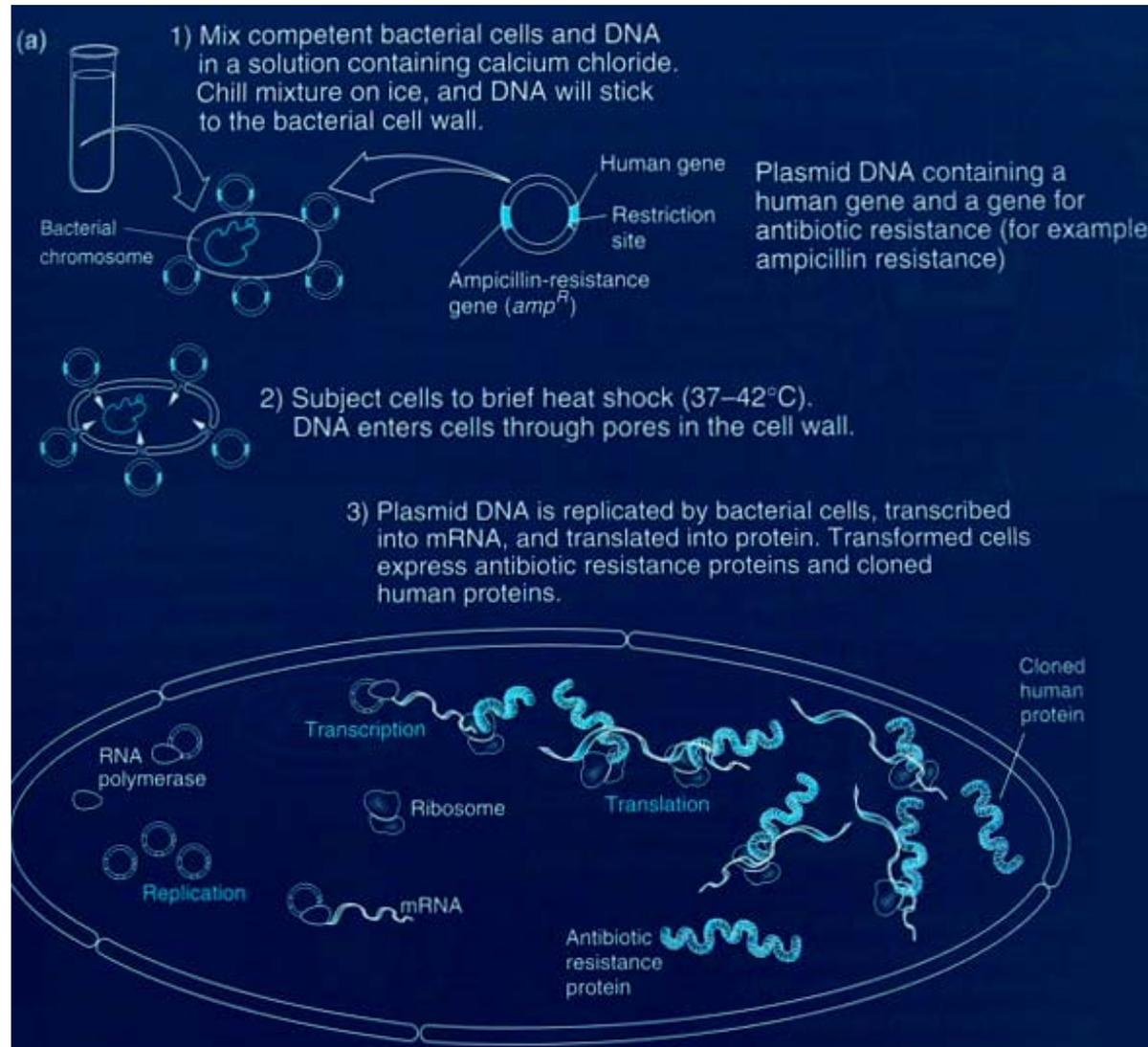
Trasferimento genico (procarioti):

Trasformazione batterica



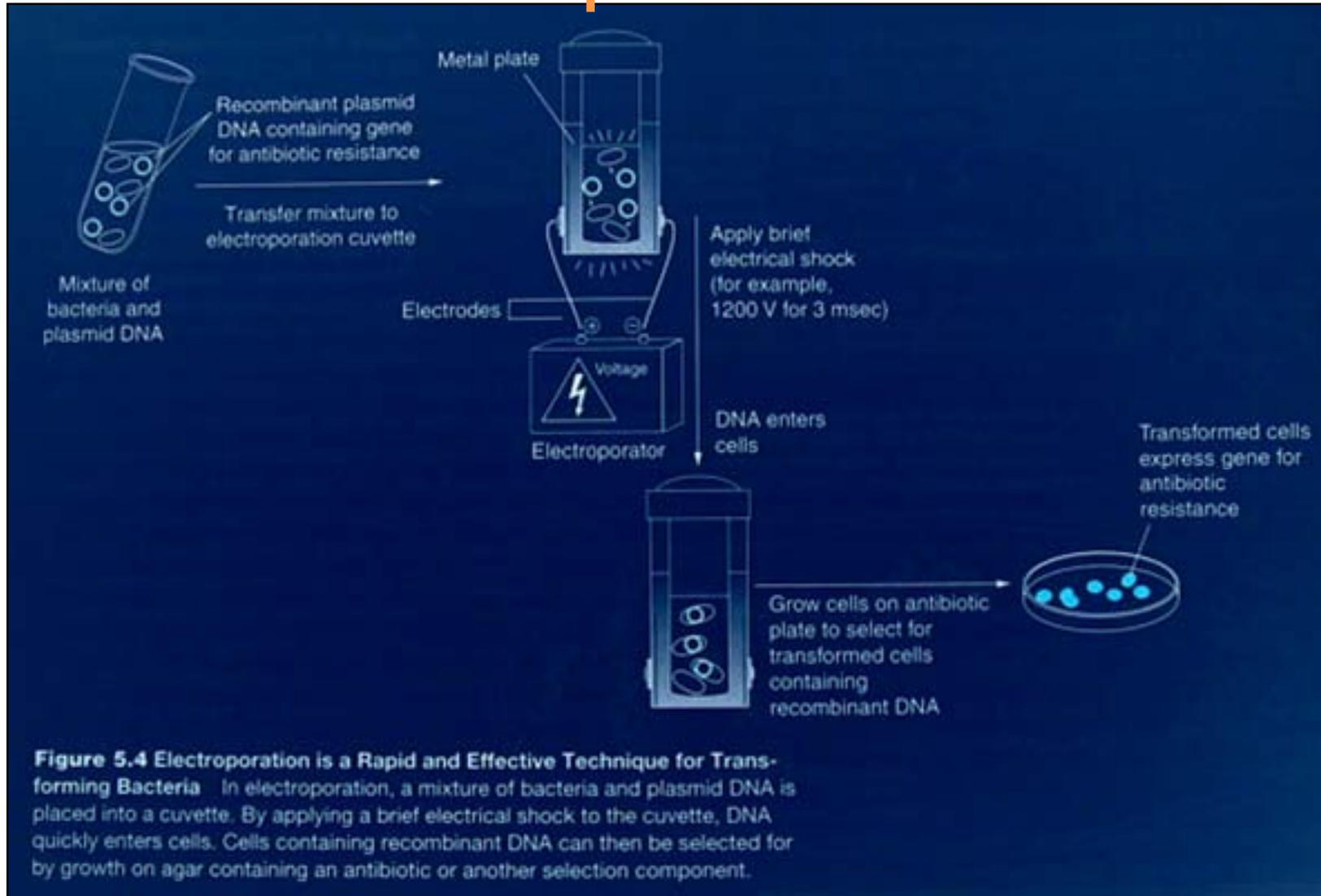
Trasferimento genico (procarioti):

Trasformazione batterica



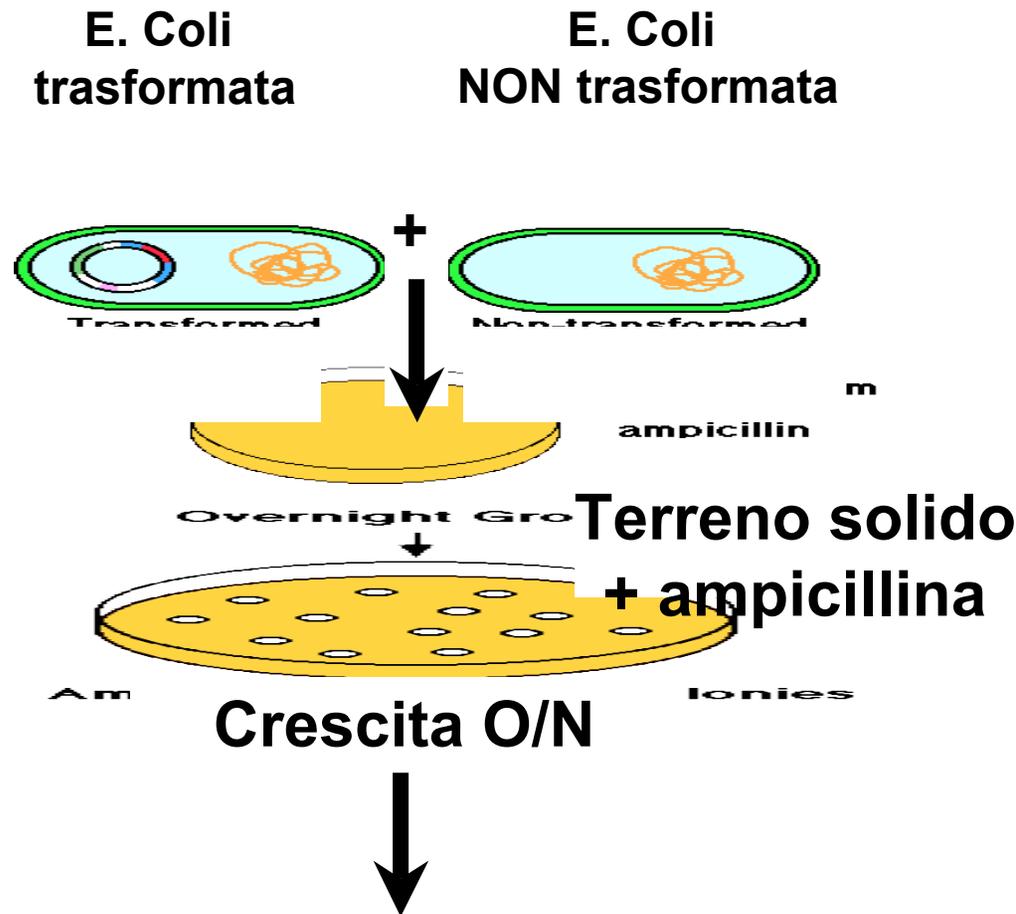
Trasferimento genico (procarioti):

Elettroporazione



Trasferimento genico (procarioti):

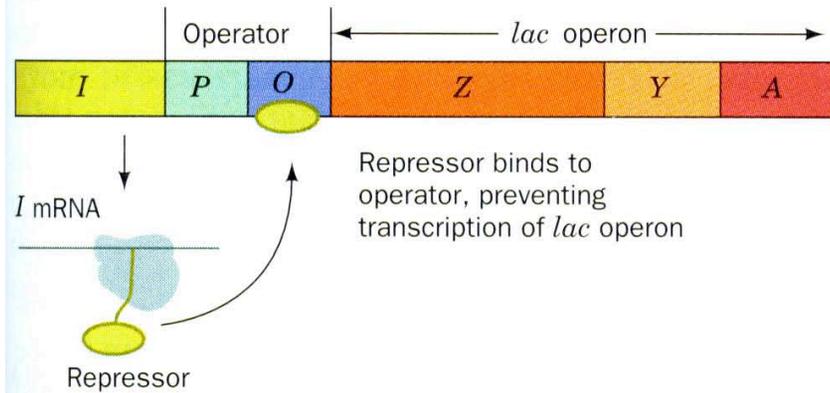
Selezione cellule trasformate



Colonie ampicillina-resistenti

Regulation of Protein Expression in the *lac* Operon

(a) Absence of inducer



(b) Presence of inducer

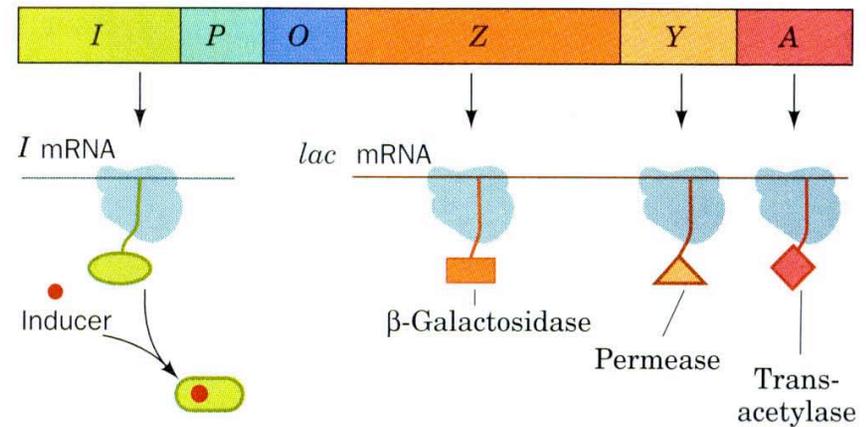


Figure 27-9. Key to Function. The expression of the *lac* operon. (a) In the absence of inducer, the repressor (the product of the *I* gene) binds to the operator (*O*), thereby preventing transcription of the *lac* operon from the promoter (*P*). (b) On binding

inducer, the repressor dissociates from the operator, which permits the transcription and subsequent translation of the *lac* structural genes (*Z*, *Y*, and *A*, which respectively encode β -galactosidase, lactose permease, and thiogalactoside transacetylase).

Trasferimento genico (eucarioti):

Trasferimento genico in cellule eucariotiche

Infezione Virale: Il DNA e' impacchettato in virus utilizzati per infettare le cellule

Vantaggi: Alta efficienza di trasferimento di DNA in cellula

Svantaggi: Tempi lunghi necessari per generare i virus ricombinanti.

Trasfezione: Il plasmide e' trasferito in cellule in coltura ed in alcuni casi anche in vivo.

Vantaggi: metodo rapido e facile da eseguire

Svantaggi: alcuni tipi cellulari non si trasfettano efficacemente.

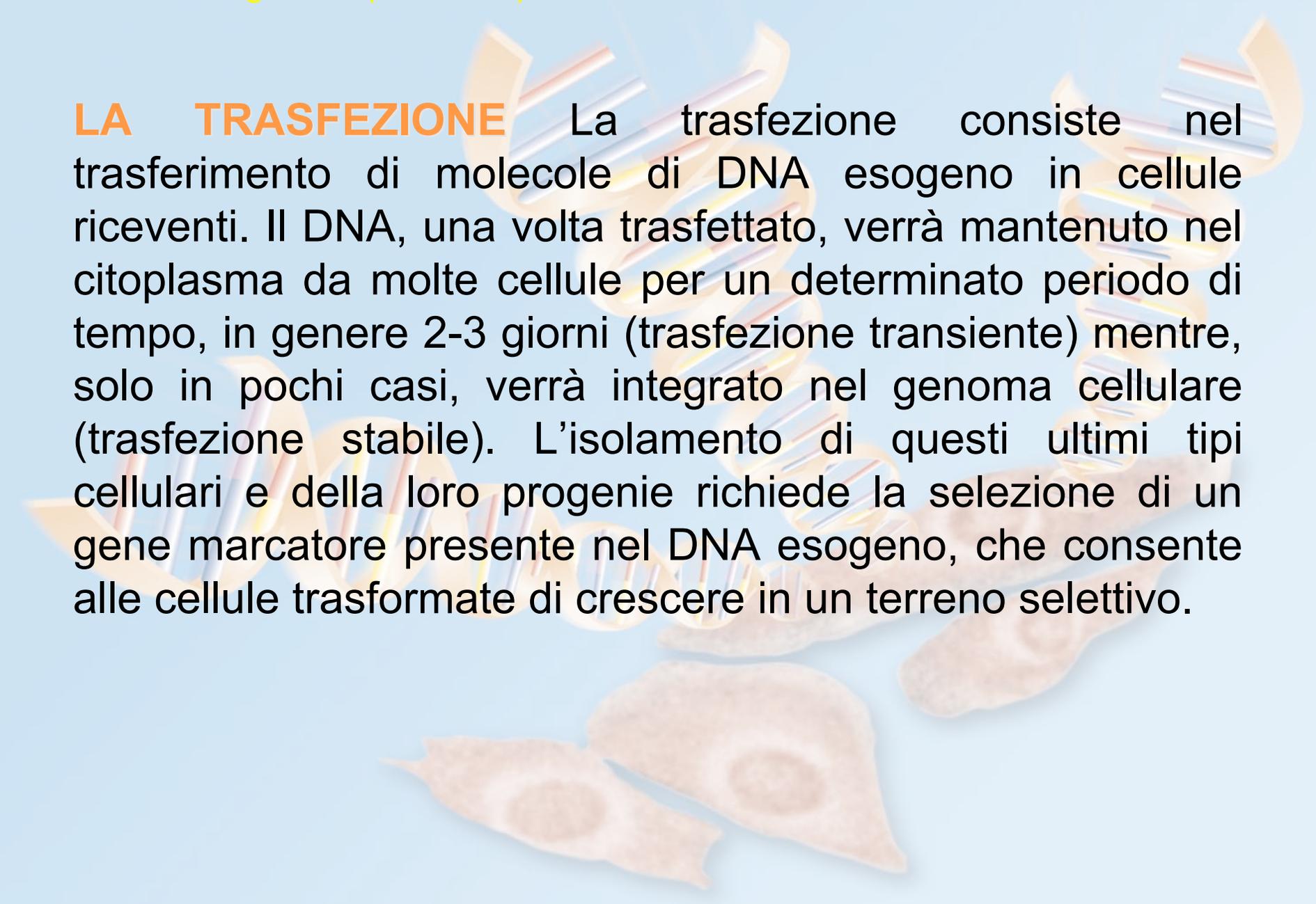
Iniezione in cellula: Il DNA e' iniettato direttamente nelle cellule

Vantaggi: metodo diretto

Svantaggi: puo' essere tecnicamente difficile da eseguire

Trasferimento genico (eucarioti):

LA TRASFEZIONE La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, verrà mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un determinato periodo di tempo, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) mentre, solo in pochi casi, verrà integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile). L'isolamento di questi ultimi tipi cellulari e della loro progenie richiede la selezione di un gene marcatore presente nel DNA esogeno, che consente alle cellule trasformate di crescere in un terreno selettivo.



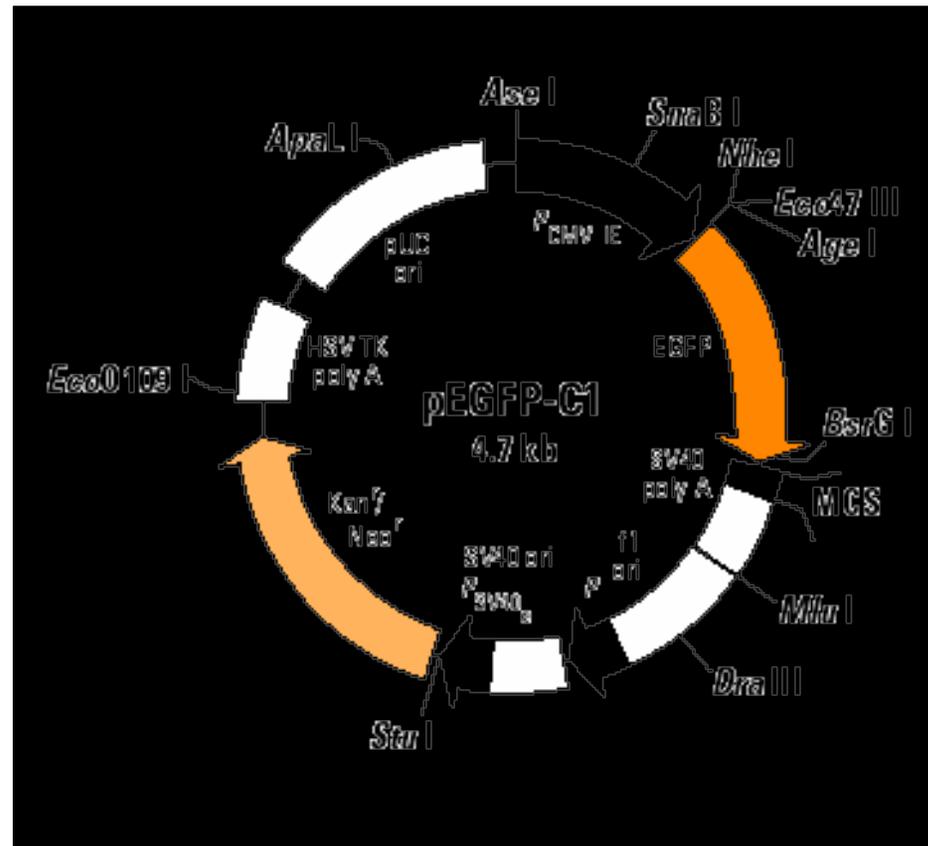
Trasferimento genico (eucarioti):

Durante le 48 ore successive alla trasfezione, i geni esogeni sono soggetti a molte delle attività regolative che controllano l'espressione del materiale cromosomico della cellula. Nel periodo successivo, invece verranno progressivamente persi dalla maggior parte delle cellule per combinazione di fenomeni di degradazione e diluizione, giacchè il DNA non integrato, non è solitamente duplicato con il materiale cromosomico della cellula ospite.

Trasferimento genico (eucarioti):

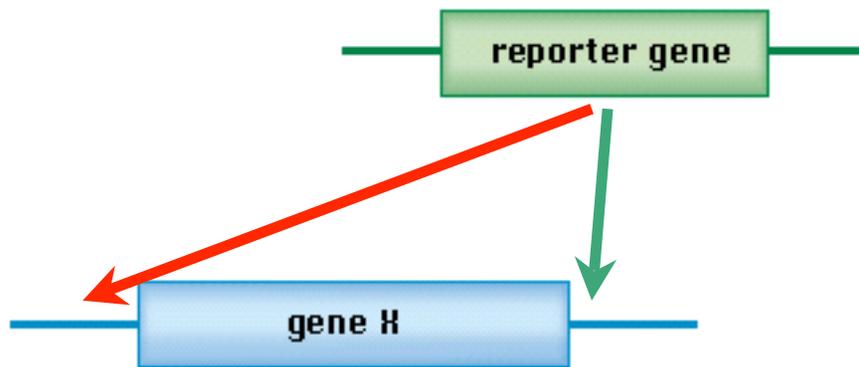
Requisiti per la trasfezione cellulare

1. Plasmide di espressione
2. Gene “reporter” o altro mezzo per verificare l’espressione
3. Metodo efficiente per il trasferimento genico

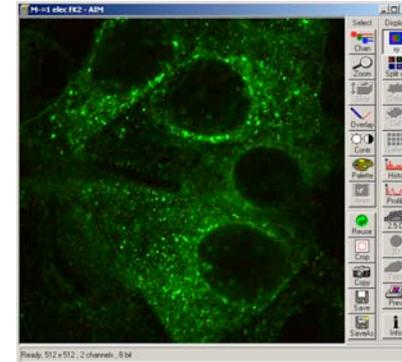


Trasferimento genico (eucarioti):

Uso della GFP come gene reporter



Puo' essere inserito a monte o a valle del gene di interesse



Trasferimento genico (eucarioti):

Altri geni reporter

Gene lacZ batterico - saggio per l'attività β -galattosidasi

Cloramfenicolo acetil transferasi batterica (CAT)

Luciferasi di lucciola - emette luce

Trasferimento genico (eucarioti):

L' introduzione di geni in cellule di mammifero è in generale un processo di per sè inefficiente, perchè necessita di una fonte abbonante di cellule di partenza per poter ottenere, al termine dell'esperimento un numero utilizzabile di cellule trasfettate. E' solo grazie alla disponibilità di linee cellulari di mammifero capaci di crescere indefinitamente in coltura che gli esperimenti di trasferimento genico sono diventati una pratica comune in laboratorio.

Trasferimento genico (eucarioti):

Tecniche di Trasfezione

1. **DEAE - destrano**

2. **Precipitazione con fosfato di calcio**

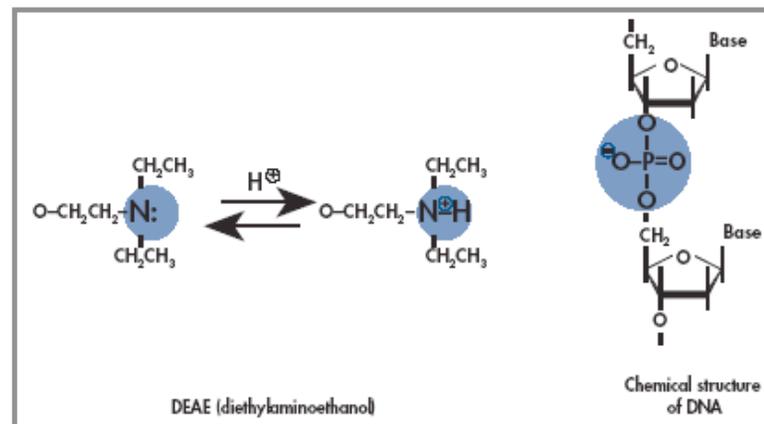
3. **Elettroporazione - DNA introdotto attraverso pori**

4. **Mediata da liposomi**

} Il DNA forma complessi con
molecole cariche positivamente.
Introdotto per endocitosi.

Trasferimento genico (eucarioti):

METODO DEL DEAE-DESTRANO L'utilizzo dei reagenti chimici per la trasfezione è stato introdotto nel 1965 con la scoperta del DEAE-Destrano (Dietilaminoetil Destrano), un polimero cationico che si lega strettamente ai gruppi fosfato del DNA carichi negativamente. Queste grosse particelle contenenti il DNA aderiscono alla superficie delle cellule e vengono introdotte al loro interno mediante un processo di endocitosi. Questo metodo, sebbene tecnicamente semplice, risulta poco efficiente per molti tipi cellulari, e quindi poco affidabile per saggi di routine dell'attività biologica di una preparazione di DNA purificato.



Trasferimento genico (eucarioti):

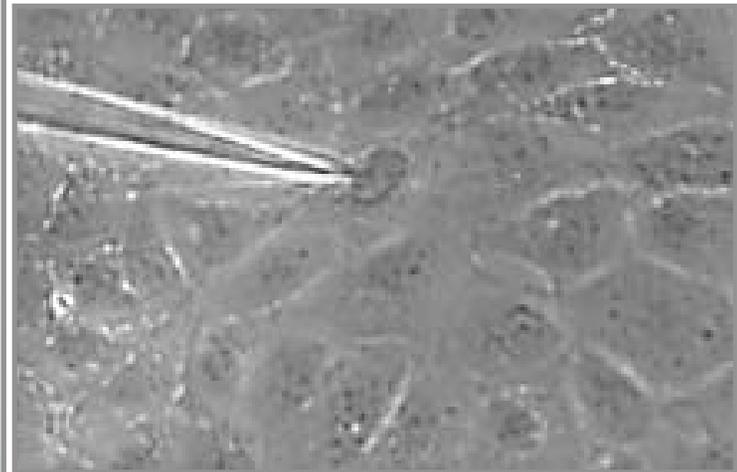
COPRECIPITAZIONE CON FOSFATO DI CALCIO Tale metodica venne introdotta nel 1970 grazie alla scoperta che le cellule sono in grado di captare in maniera efficiente il DNA sotto forma di un precipitato con fosfato di calcio. Il protocollo di base per questo tipo di esperimento prevede che si isoli il DNA che viene poi miscelato con una soluzione accuratamente tamponata contenente fosfato. L'aggiunta di cloruro di calcio forma un fine precipitato di fosfato di calcio e DNA, che si distribuisce su un monostrato di cellule, lasciate poi in incubazione a 37°C per diverse ore (4-16 h), durante le quali molte di esse captano il DNA esogeno. Il precipitato viene poi rimosso dalle cellule alle quali viene aggiunto terreno di coltura fresco.

Trasferimento genico (eucarioti):

Entrambi i metodi chimici citati sono poco dispendiosi e garantiscono una moderata efficienza di trasfezione in numerosi tipi cellulari. Tuttavia presentano alcuni svantaggi: sono infatti abbastanza tossici (soprattutto la metodica del DEAE-Destrano); sono soggetti ad una certa variabilità. Inoltre il DEAE-Destrano può essere utilizzato solo per trasfezioni transienti in cui il campione viene testato 72 ore dopo l'introduzione del DNA esogeno nelle cellule. E' stato quindi necessario mettere a punto differenti metodiche in grado di assicurare efficienze di trasfezione elevate anche in tipi cellulari poco sensibili alla trasfezione con le due metodiche chimiche sopra citate.

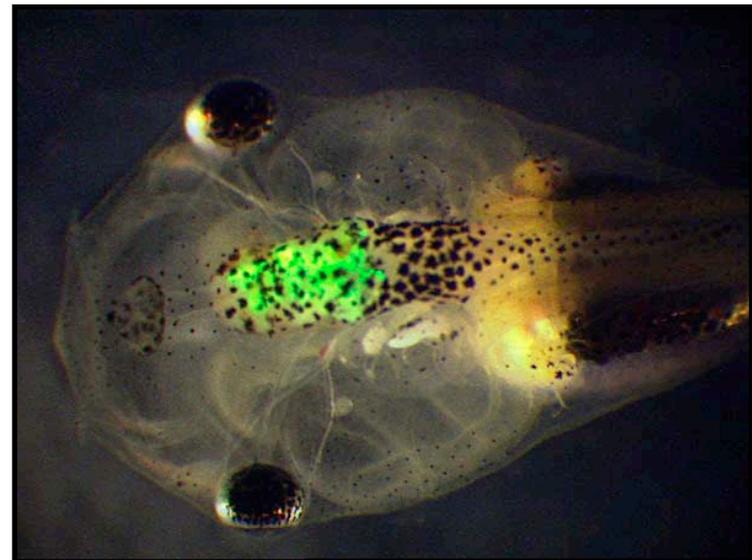
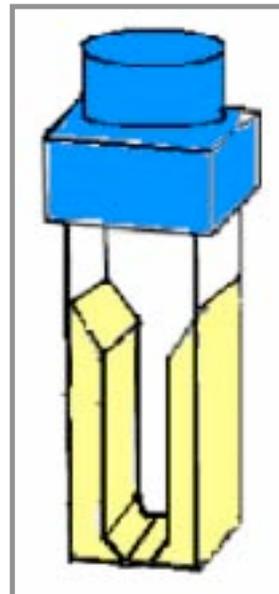
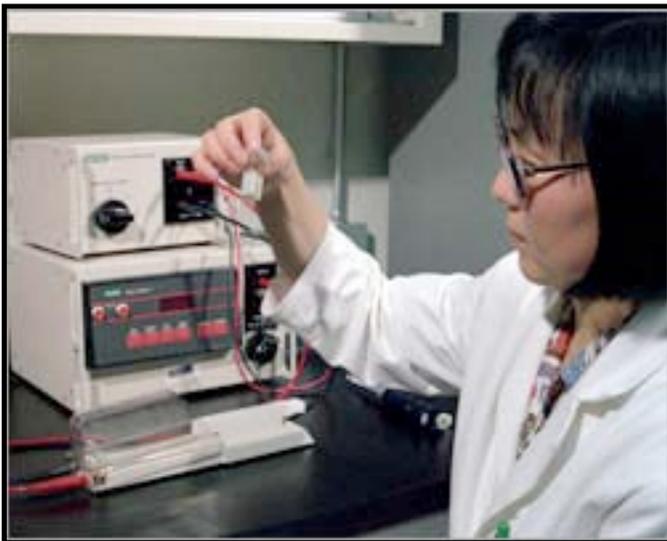
Trasferimento genico (eucarioti):

MICROINIEZIONE Permette l'introduzione diretta di acidi nucleici (DNA o RNA) nel nucleo o nel citoplasma della cellula, attraverso l'ausilio di un elettrodo con una punta molto fine, montato su uno specifico microiniettore. Nonostante l'elevata efficienza, tale metodo non viene utilizzato spesso a causa dei costi non indifferenti dell'apparato e delle difficoltà tecniche.

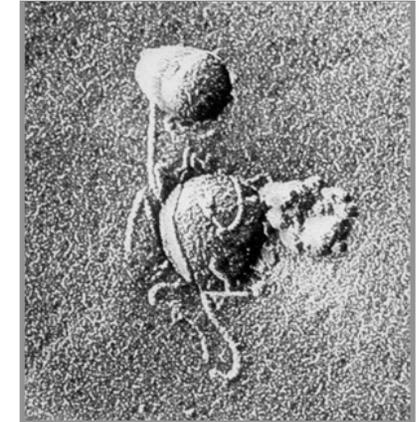
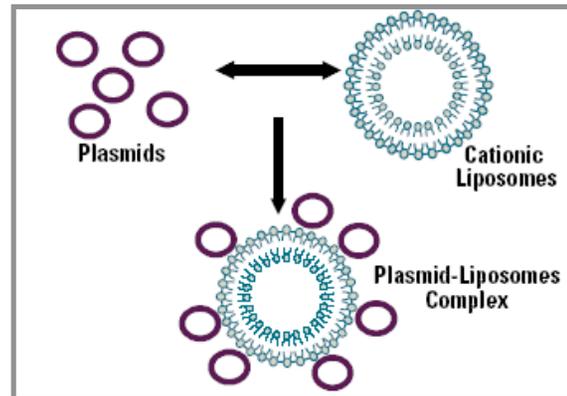
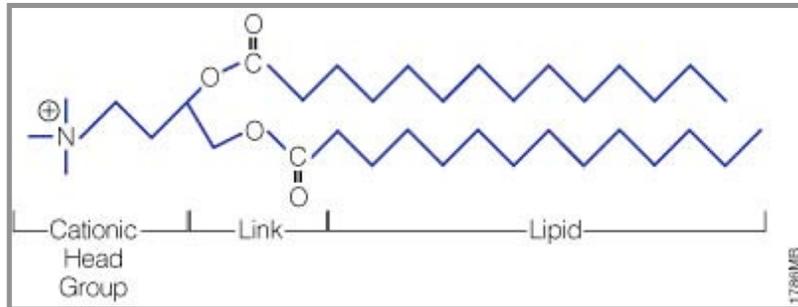


Trasferimento genico (eucarioti):

ELETTROPORAZIONE Le cellule, poste in una soluzione contenente il DNA, sono sottoposte ad un breve impulso elettrico che produce pori transitori nelle membrane, attraverso cui il DNA esogeno può entrare. Tale tecnica richiede però un numero molto elevato di cellule di partenza, a causa dell'elevato tasso di morte cellulare che si osserva nel corso degli esperimenti. Occorre quindi bilanciare l'efficienza di trasfezione con la percentuale di morte cellulare.

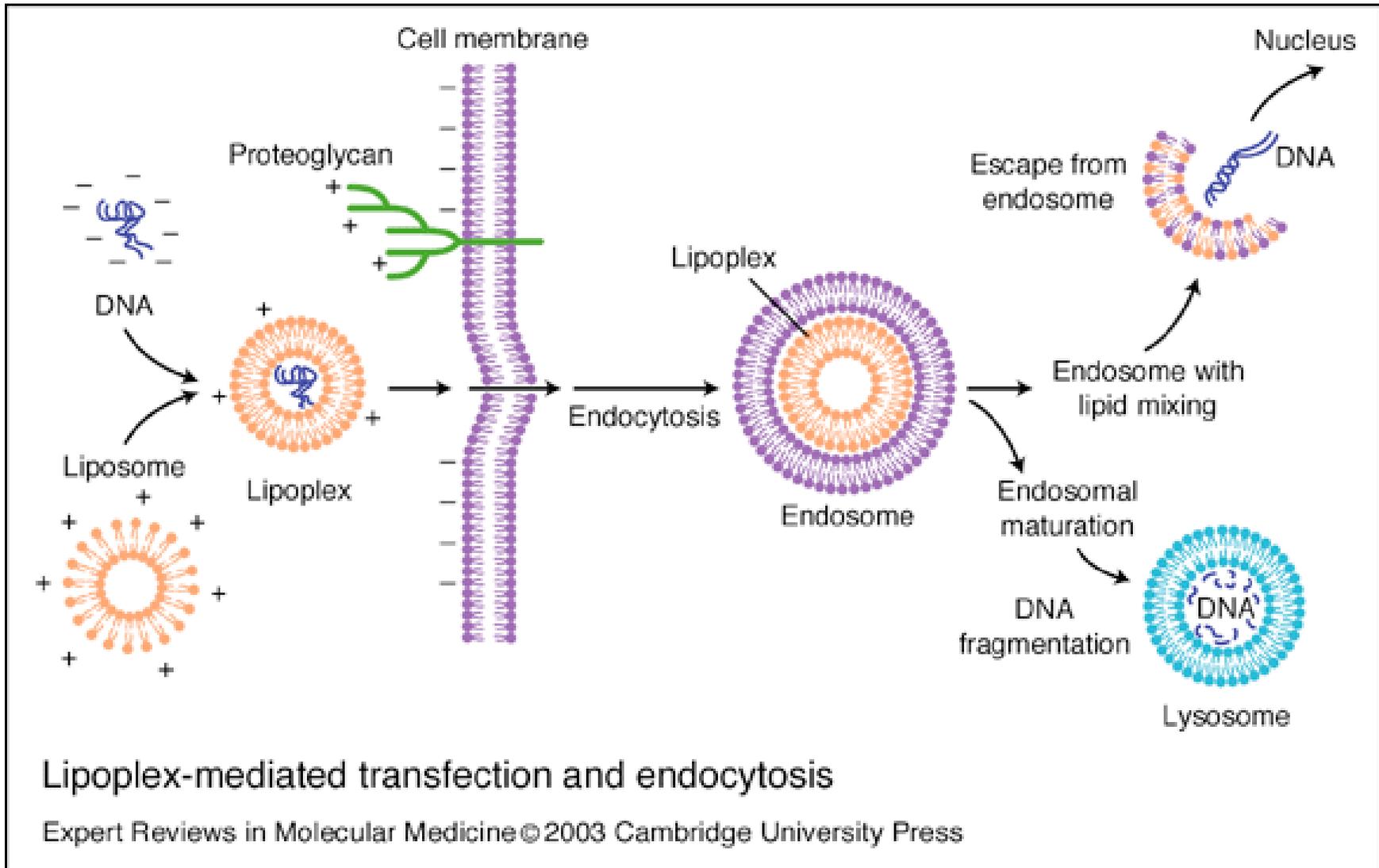


Trasferimento genico (eucarioti):



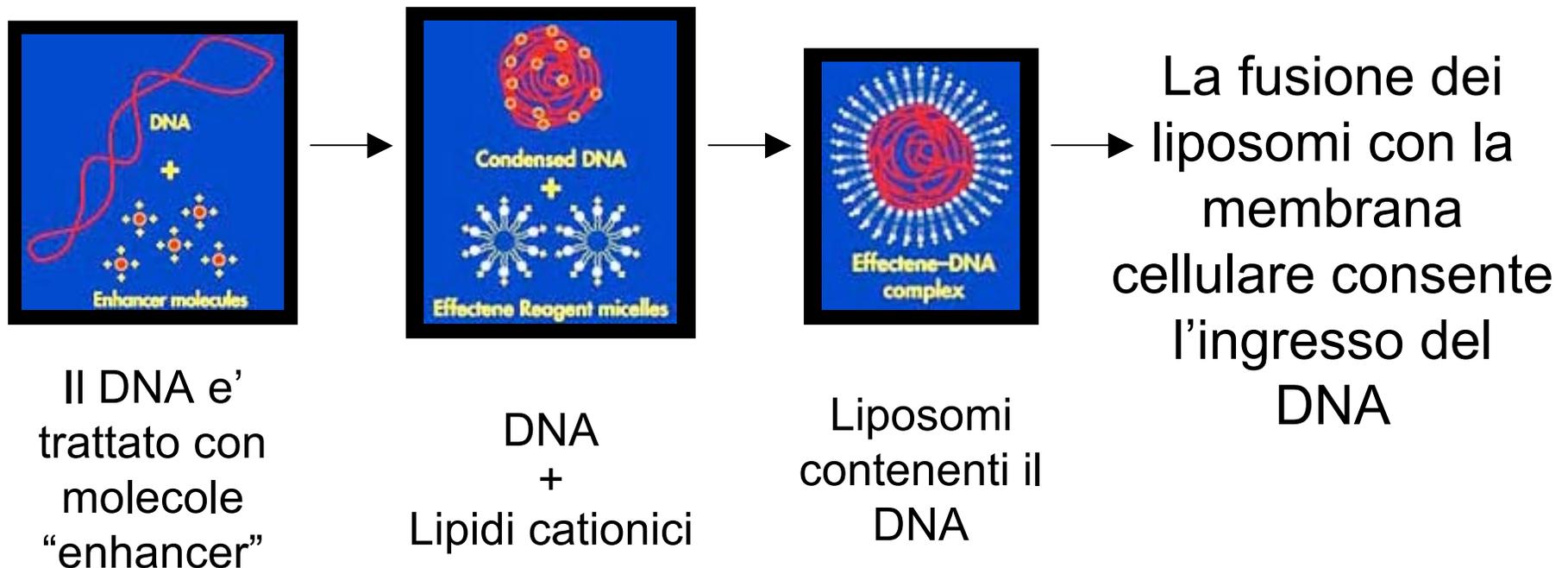
LIPIDI CATIONICI La trasfezione mediata da lipidi cationici si inserisce nel campo delle tecniche chimiche di trasferimento genico. La testa cationica del composto lipidico si associa strettamente con la carica negativa dei gruppi fosfato degli acidi nucleici. I complessi lipidi/DNA-RNA si associano per poi fondersi con le membrane cellulari, e vengono così internalizzati nella cellula. Tale metodica è molto vantaggiosa per numerose ragioni: il DNA viene rilasciato efficientemente in diversi tipi cellulari, i liposomi sono semplici da utilizzare in quanto non richiedono apparati o accorgimenti particolari, e sono impiegati con successo in studi di trasferimento genico in vivo.

Trasferimento genico (eucarioti):



Trasferimento genico (eucarioti):

Trasfezione mediata da Liposomi



Trasferimento genico (eucarioti):

Occorre tener presente alcuni accorgimenti per ottimizzare il processo di trasfezione:

DNA TRASFETTATO il DNA plasmidico usato negli esperimenti di trasfezione deve essere privo di contaminazioni da proteine, da RNA. Ciò viene indicato da un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1.8-1.9. Il DNA previamente precipitato con etanolo deve essere risospeso in una soluzione sterile quale TE o MQ autoclavata in modo che la sua concentrazione finale sia circa 0.2-1 mg/ml. La quantità ottimale di DNA trasfettata dipende dal tipo di acido nucleico e dalla linea cellulare d'interesse. **TEMPO DI TRASFEZIONE** il tempo ottimale di trasfezione è un parametro sempre dipendente dal tipo di DNA e linea cellulare utilizzati, e può variare da 30 minuti a 4 ore. **EFFETTI DEL SIERO** E' stato osservato che la trasfezione viene ottimizzata in assenza di siero ed antibiotici nel terreno di coltura.

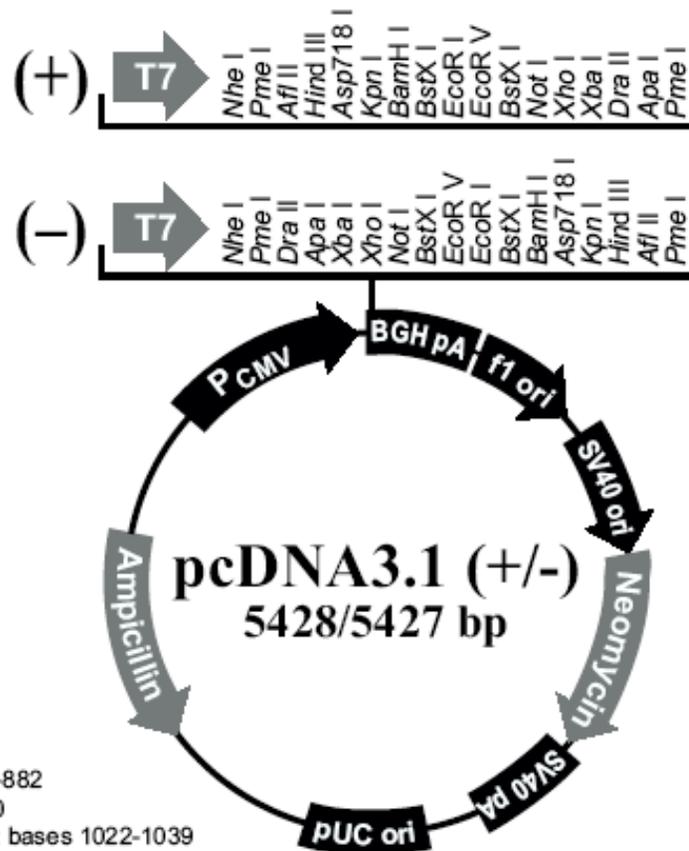
Trasferimento genico (eucarioti):

TIPO DI VETTORE: E' bene utilizzare vettori plasmidici che consentono alti livelli di espressione in linee cellulari di mammifero. Essi sono generalmente caratterizzati dalla presenza sia del promotore del Cytomegalovirus (CMV), responsabile dell'espressione costitutiva della sequenza genica inserita nel vettore sia da un gene marker che conferisce resistenza alla Neomicina, in modo da permettere la selezione dei tipi cellulari trasformati nel caso in cui si voglia integrare stabilmente il DNA nelle cellule riceventi. E' inoltre presente un gene che conferisce la resistenza all'Ampicillina per la selezione ed il mantenimento del vettore in sistemi batterici come E.Coli. Ogni plasmide mostra poi caratteri distintivi propri che lo rendono adatto per specifici prodotti sperimentali.

pcDNA3.1 Vectors

Map of pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-)

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) vectors. The complete sequences for pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) are available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 13). Details of the multiple cloning sites are shown on page 3 for pcDNA3.1(+) and page 4 for pcDNA3.1(-).



Comments for pcDNA3.1 (+) 5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 895-1010
 pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
 BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
 f1 origin: bases 1298-1726
 SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
 Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
 SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
 pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
 Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
 ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
 Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P₃): bases 5327-5333 (complementary strand)

MAPPA DEL VETTORE pcDNA3.1

Trasferimento genico (eucarioti):

Features of pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-)

pcDNA3.1(+) (5428 bp) and pcDNA3.1(-) (5427 bp) contain the following elements. All features have been functionally tested.

Feature	Benefit
Human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter/enhancer	Permits efficient, high-level expression of your recombinant protein (Andersson <i>et al.</i> , 1989; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Nelson <i>et al.</i> , 1987)
T7 promoter/priming site	Allows for <i>in vitro</i> transcription in the sense orientation and sequencing through the insert
Multiple cloning site in forward or reverse orientation	Allows insertion of your gene and facilitates cloning
Bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal	Efficient transcription termination and polyadenylation of mRNA (Goodwin and Rottman, 1992)
f1 origin	Allows rescue of single-stranded DNA
SV40 early promoter and origin	Allows efficient, high-level expression of the neomycin resistance gene and episomal replication in cells expressing SV40 large T antigen
Neomycin resistance gene	Selection of stable transfectants in mammalian cells (Southern and Berg, 1982)
SV40 early polyadenylation signal	Efficient transcription termination and polyadenylation of mRNA
pUC origin	High-copy number replication and growth in <i>E. coli</i>
Ampicillin resistance gene (β -lactamase)	Selection of vector in <i>E. coli</i>

Trasferimento genico (eucarioti):

METODI PER ANALIZZARE L'AVVENUTA ESPRESSIONE DI UNA PROTEINA ETEROLOGA

DIRETTO:

-GFP

-Tecniche immunochimiche:

Immunoblotting

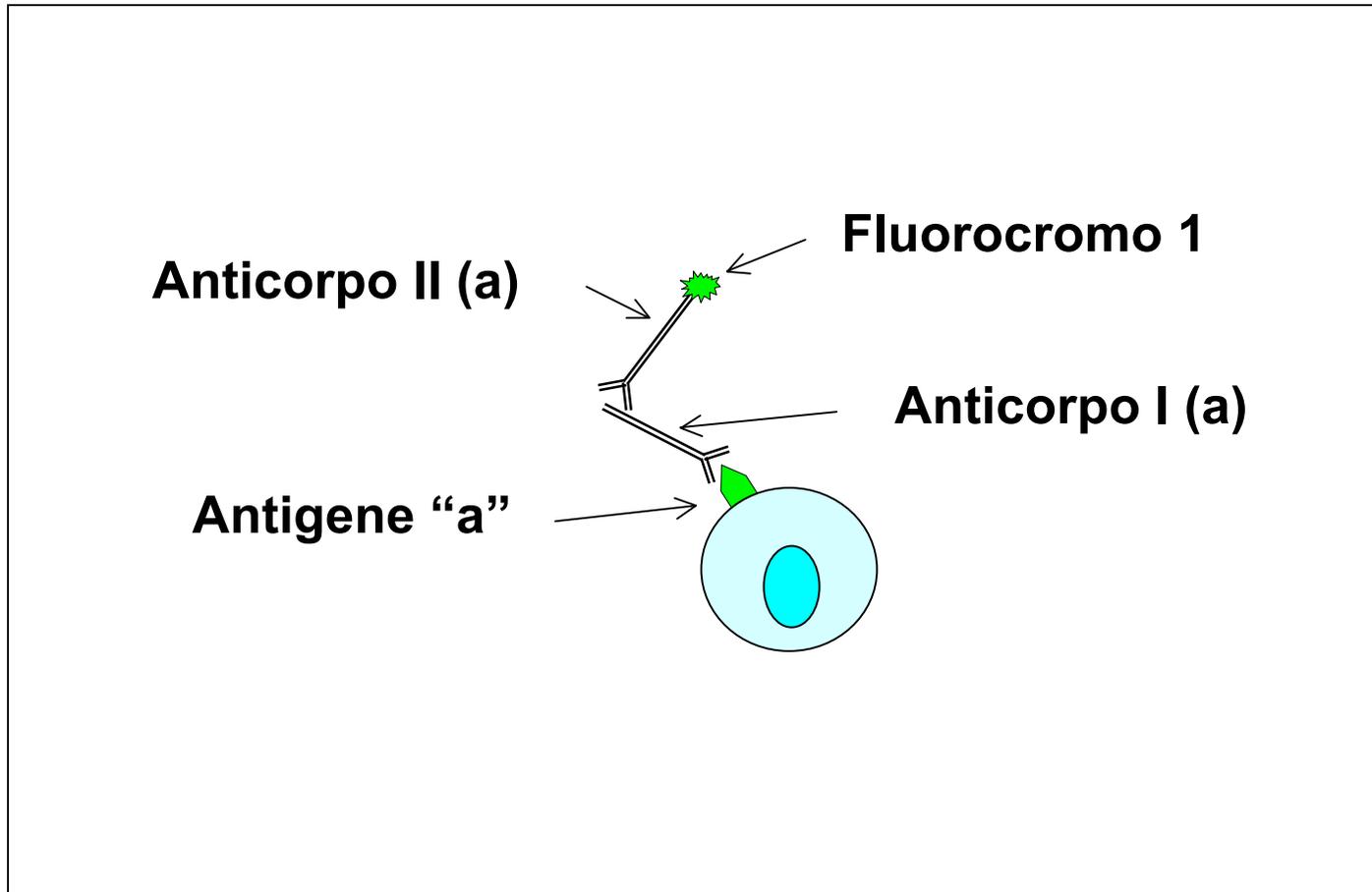
Immunofluorescenza

INDIRETTO:

-RT-PCR

Trasferimento genico (eucarioti):

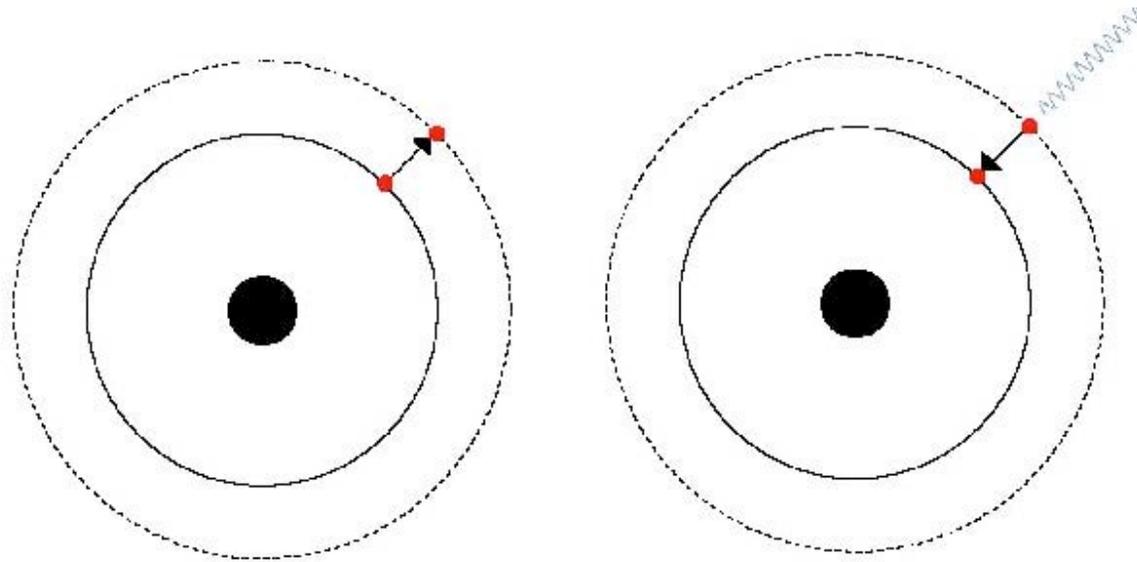
IMMUNOFLUORESCENZA SINGOLA INDIRECTA



Es. Fluorocromo 1 → FITC

Trasferimento genico (eucarioti):

FLUORESCENZA



Come avviene: il fenomeno della fluorescenza è determinato dall'assorbimento di energia da parte degli atomi, in seguito a questo assorbimento d'energia gli elettroni si spostano da un livello energetico ad uno superiore, la permanenza al livello energetico superiore è brevissima, dell'ordine dei miliardesimi di secondo, dopo di che gli elettroni tornano al livello energetico originario liberando l'energia assorbita sotto forma di radiazioni elettromagnetiche. Poiché la resa energetica non è mai del 100% le radiazioni liberate saranno di lunghezza d'onda superiore, e quindi di energia minore, rispetto a quella dell'energia eccitatrice, così se l'eccitazione è ottenuta con raggi ultravioletti le radiazioni liberate saranno sotto forma di luce visibile o di raggi infrarossi.

Trasferimento genico (eucarioti):

FLUOROFORI

Figure 1—Emission spectra for the Alexa Fluor® dye series

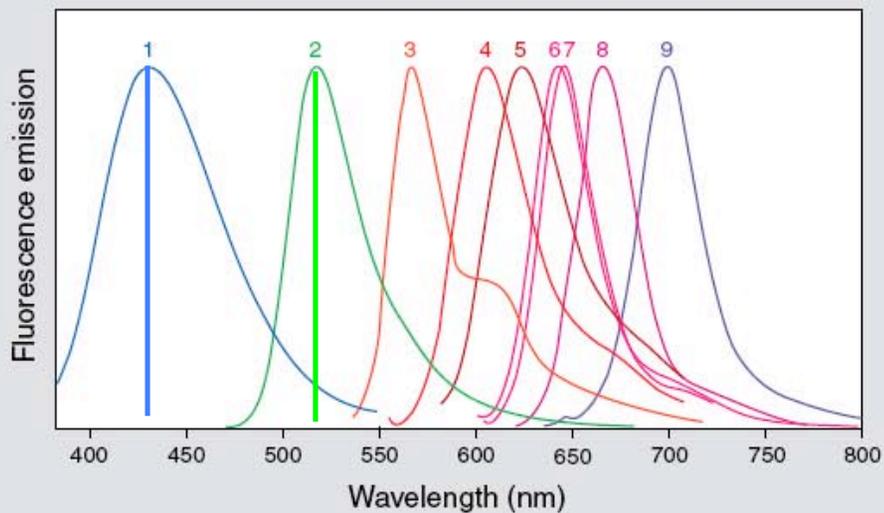


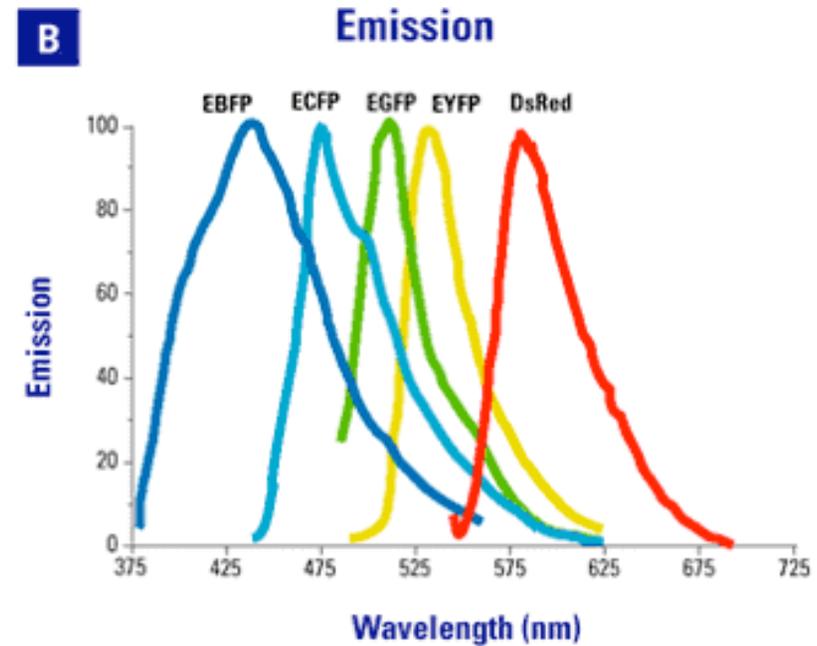
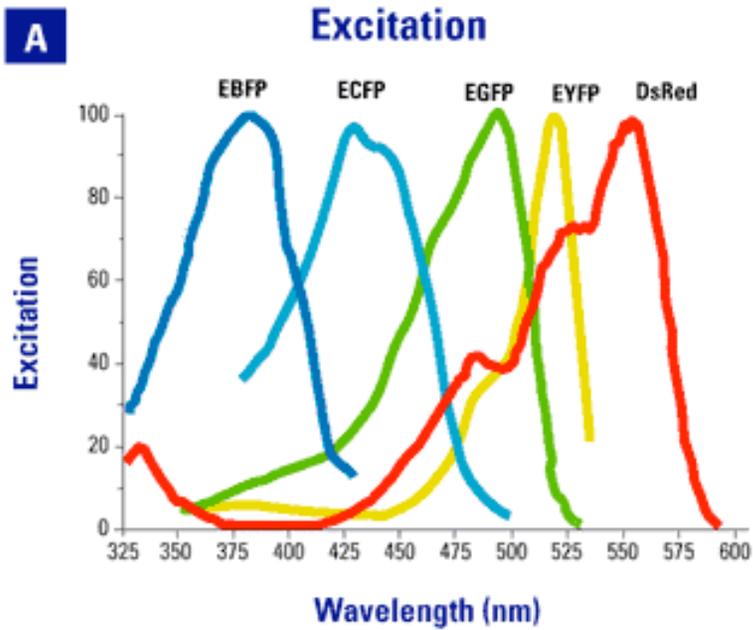
Table 2—Spectral characteristics of the Alexa Fluor® dyes

Color	Alexa Fluor® Dye	Abs*	Em*	Extinction Coefficient †
1	Alexa Fluor® 350	346	442	19,000
2	Alexa Fluor® 488	495	519	71,000
3	Alexa Fluor® 555	555	565	150,000
4	Alexa Fluor® 568	578	603	91,300
5	Alexa Fluor® 594	590	617	73,000
6	Alexa Fluor® 633	632	647 ‡	100,000
7	Alexa Fluor® 635	633	647 ‡	140,000
8	Alexa Fluor® 647	650	665 ‡	239,000
9	Alexa Fluor® 680	679	702 ‡	184,000

* Absorption and fluorescence emission maxima, in nm. † Extinction coefficient at λ_{\max} in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.
‡ Human vision is insensitive to light beyond ~650 nm, and therefore it is not possible to view the far-red-fluorescent dyes by looking through the eyepiece of a conventional fluorescent microscope. Colors in this table correspond to the spectra at left.

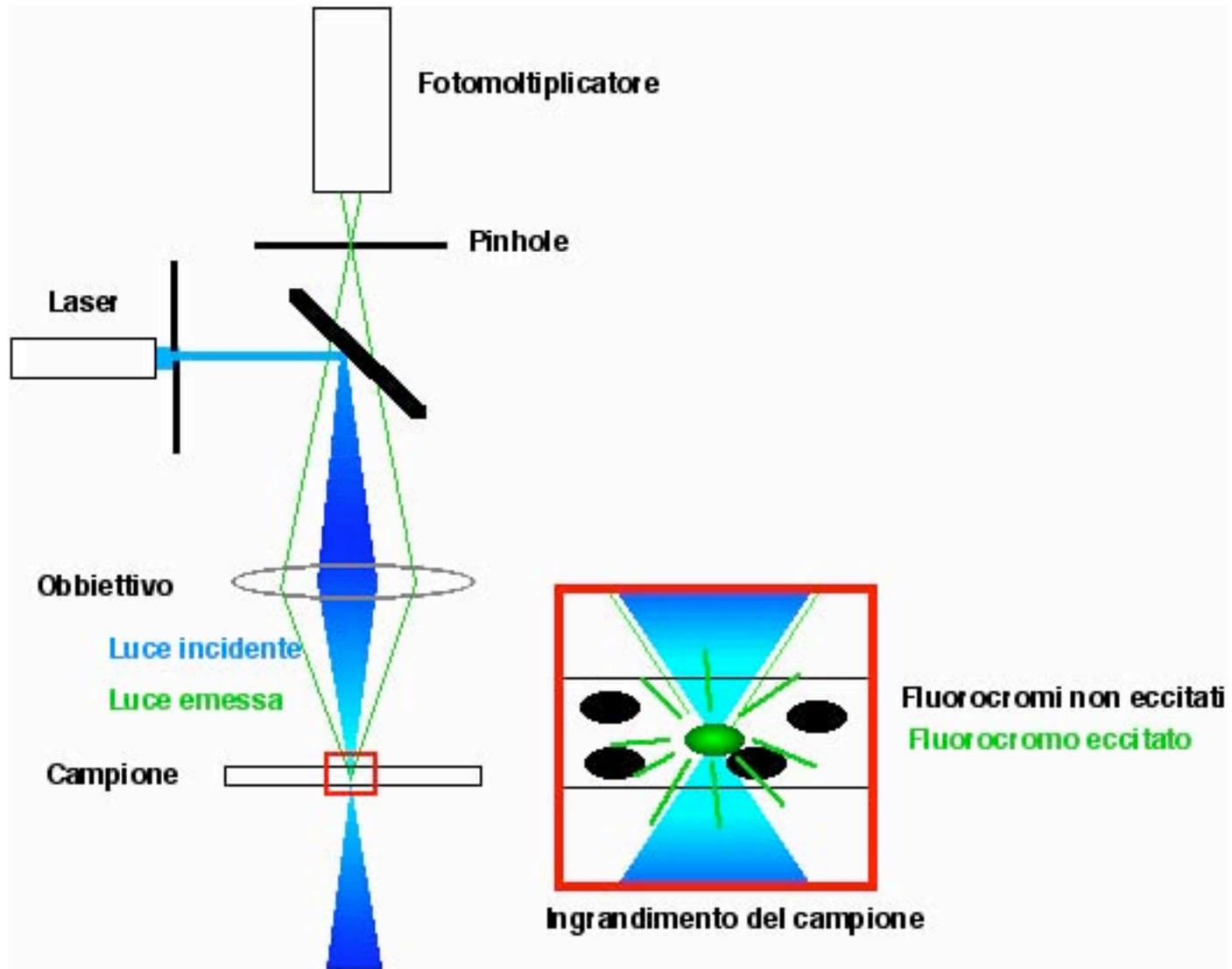
Trasferimento genico (eucarioti):

FLUOROFORI



Trasferimento genico (eucarioti):

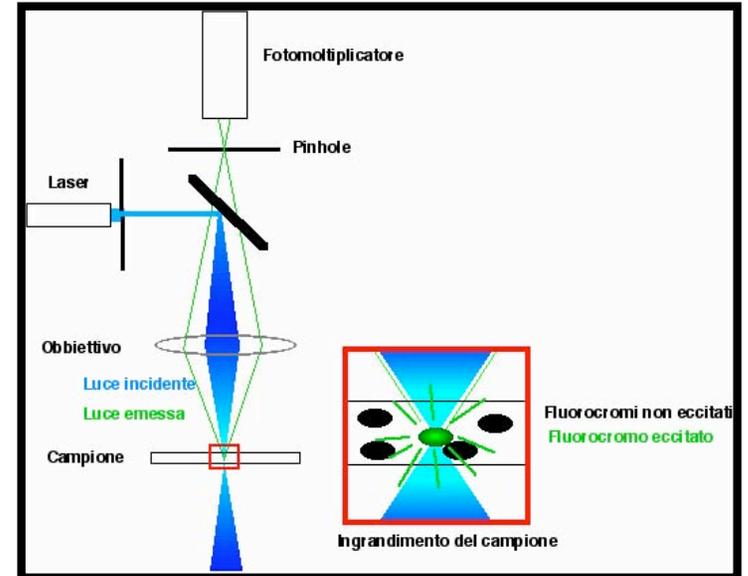
MICROSCOPIA CONFOCALE



Trasferimento genico (eucarioti):

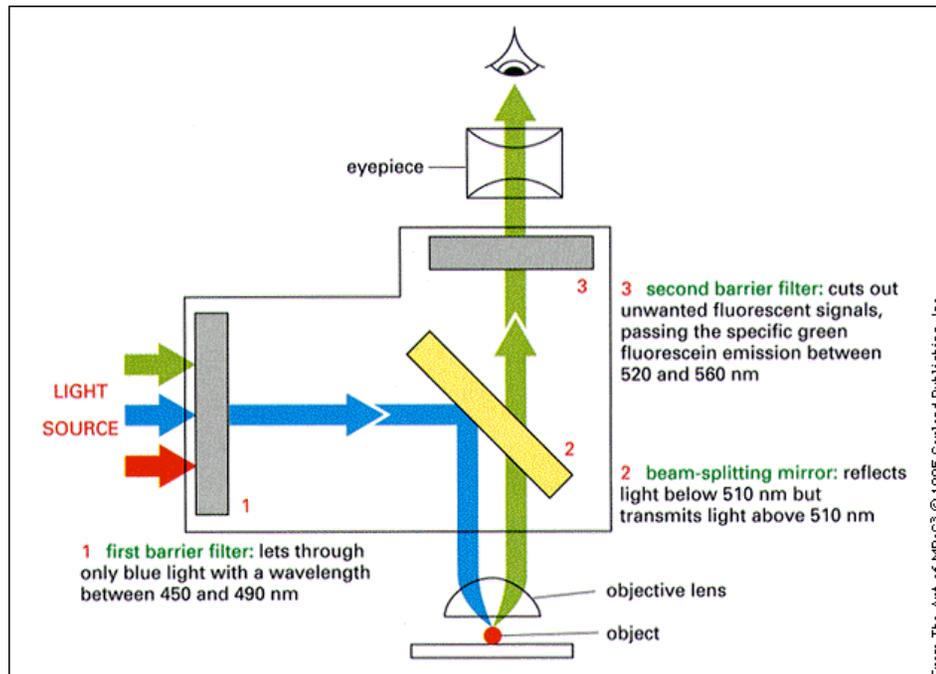
MICROSCOPIA CONFOCALE

Nei moderni microscopi confocali la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in **un punto estremamente piccolo** del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale. Le caratteristiche della luce laser (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare fenomeni di aberrazioni e diffrazioni tipiche invece della luce prodotta da tradizionali lampade a incandescenza. Inoltre, le lenti dell'obiettivo fanno sì che l'intensità della luce laser sia sufficiente a eccitare i fluorocromi soltanto nel punto di massima concentrazione del raggio, corrispondente al piano di messa a fuoco dell'obiettivo. In questo modo **le aree superiori ed inferiori al piano di fuoco, non venendo eccitate**, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, limitando la formazione di aloni e riducendo il 'rumore di fondo' (v. figura, ingrandimento). La luce emessa dai fluorocromi presenti nel campione viene catturata dalle lenti dell'obiettivo e deviata da uno specchio dicroico su un fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Tra lo specchio dicroico e il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma (o pinhole), che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco (che, seppure in minima parte vengono illuminate per effetto di fenomeni di rifrazione all'interno del campione) di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo dal piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale.

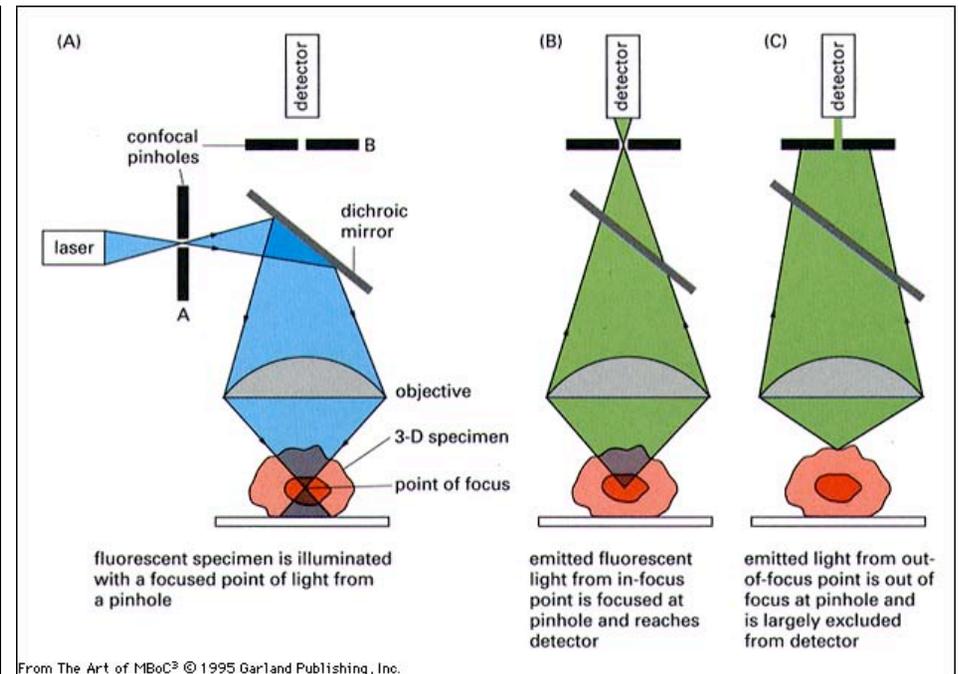


Trasferimento genico (eucarioti):

VANTAGGI DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE



From The Art of MBoC[®] © 1995 Garland Publishing, Inc.



From The Art of MBoC[®] © 1995 Garland Publishing, Inc.

Sorgenti laser disponibili:

Krypton/Argon 488, 568, 647 nm

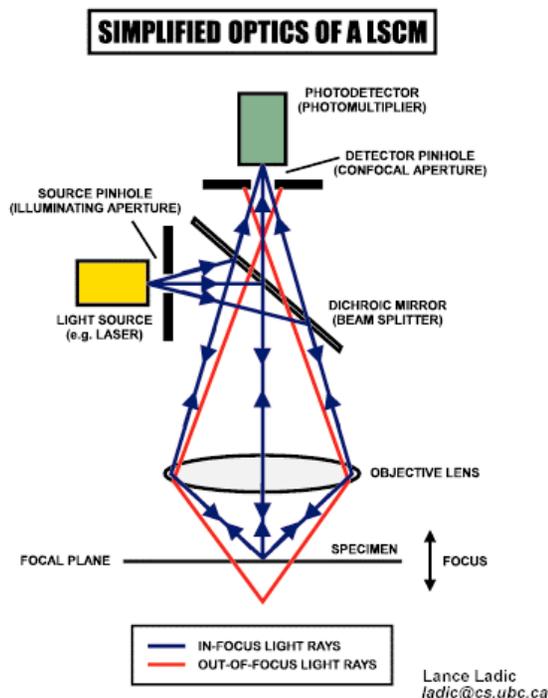
Argon ion 488, 514 nm

Helium/Neon 543 nm

UV 354 nm

Trasferimento genico (eucarioti):

VANTAGGI DELLA MICROSCOPIA CONFOCALE

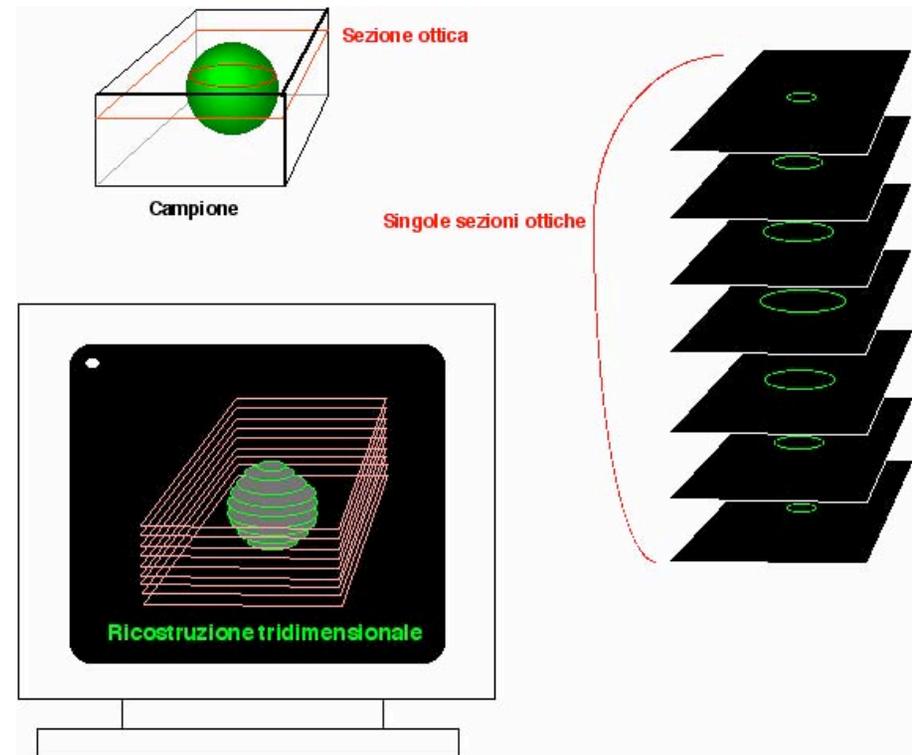


- 1) Ridotta profondità di campo
- 2) Aumentata risoluzione sui 3 assi XYZ
- 3) Sezionamento ottico XY e Z (evita la preparazione di sottili sezioni e permette di effettuare una ricostruzione 3D del campione)
- 4) Permette di lavorare su cellule vive (si evitano gli artefatti di fissazione e inclusione)

Trasferimento genico (eucarioti):

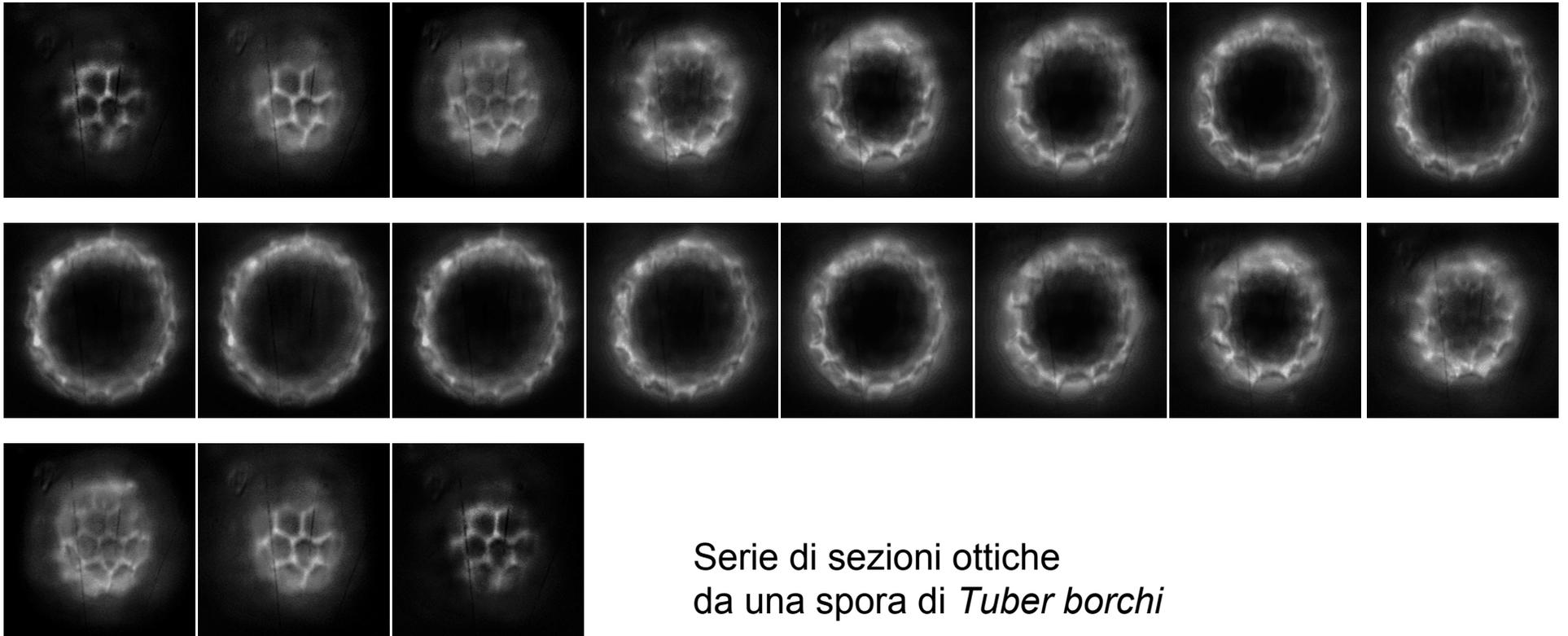
MICROSCOPIA CONFOCALE

Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato e inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine a video: ogni punto del campione verrà cioè a corrispondere ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel corrispondenti ai punti scanditi dal fascio laser nel campione darà così l'immagine finale. Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire serie di scansioni successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di **sezioni ottiche** e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.



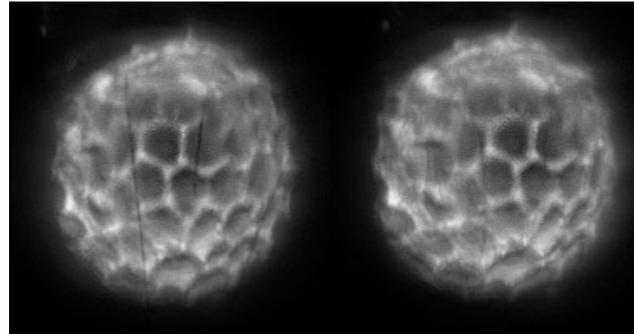
Trasferimento genico (eucarioti):

MICROSCOPIA CONFOCALE

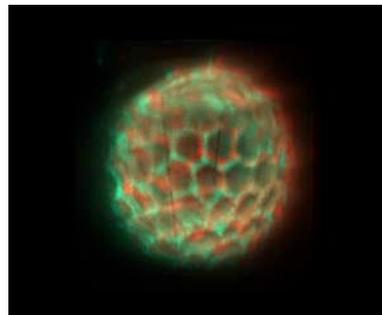


Trasferimento genico (eucarioti):

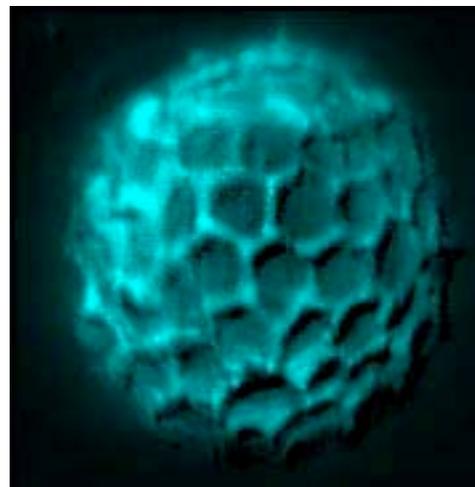
MICROSCOPIA CONFOCALE



STEREOCOPPIA La stereocoppia qui presentata è stata costruita in modo da essere osservata con la cosiddetta tecnica 'cross-eyed', vale a dire facendo convergere gli occhi in un punto davanti allo schermo.



ANAGLIFO L'anaglifo qui presentato va osservato con gli appositi occhiali a lenti colorate (rosso/verde). Per una corretta visualizzazione del campione la lente verde deve essere davanti all'occhio destro, quella rossa davanti al sinistro.



MODELLO VIRTUALE Alcuni software consentono anche di costruire un modello virtuale delle superfici tridimensionali risultanti dall'accostamento dei pixel luminosi rilevati, o applicare successivamente effetti di ombreggiatura che possono dare all'immagine finale una maggiore leggibilità anche da parte di un osservatore non esperto. Infine, il controllo completo della dimensione dei singoli pixel e dello spessore delle sezioni ottiche consente di effettuare misure precise dei soggetti osservati (stereologia).