

Lezione 5-6

martedì 16 Marzo 2010

corso integrato Biologia Applicata BU
Ingegneria Genetica BCM
ore 9:00 aula 2A

da pET a FLP

pET per clonaggio ed espressione in batteri tramite la regolazione del sistema “lac” che regola la T7 polymerase

sistema FLP per espressione in cellule eucariotiche tramite ricombinazione omologa in un unico sito dei propri geni di interesse

obiettivo: far esprimere geni per avere un fenotipo confrontabile che dipenda non dal sito di inserzione ma solamente dal gene inserito

varianti dei plasmidi per clonare il gene di interesse

clonare e controllare

quando si clona come si può essere sicuri di aver clonato
la cosa giusta ?

cosa sono i controlli?

la selezione con l'antibiotico garantisce che sia presente il
plasmide

ci deve essere anche l'inserto!

controllo dell'inserto clonato

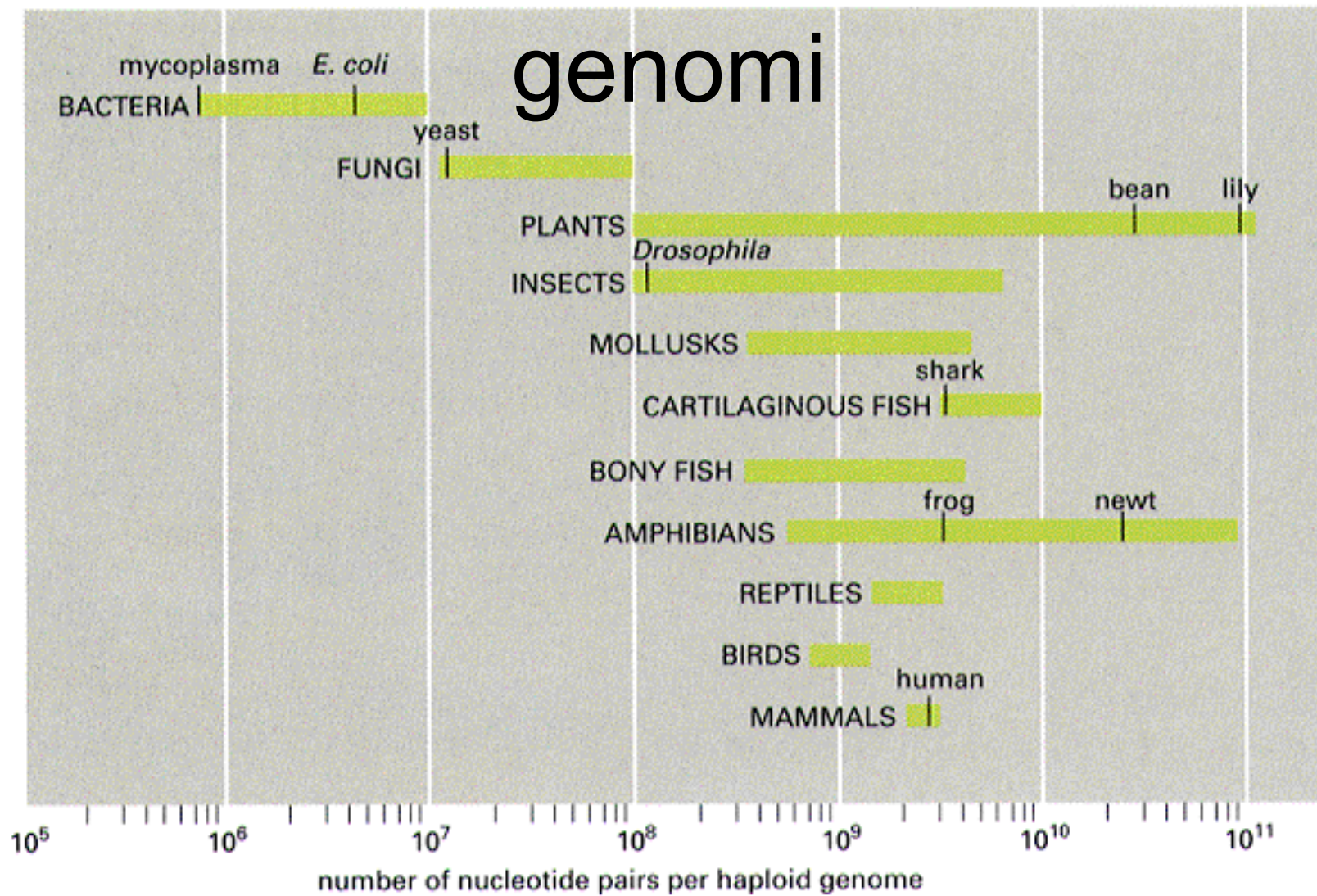
1° controllo per grandi frammenti = Southern

2° corsa elettroforetica della miniprep batterica del DNA plasmidico superavvolto o linearizzato o separando inserto da vettore con enzimi esterni al sito di clonaggio ma interni al sito multiplo di clonaggio SMC o MCS

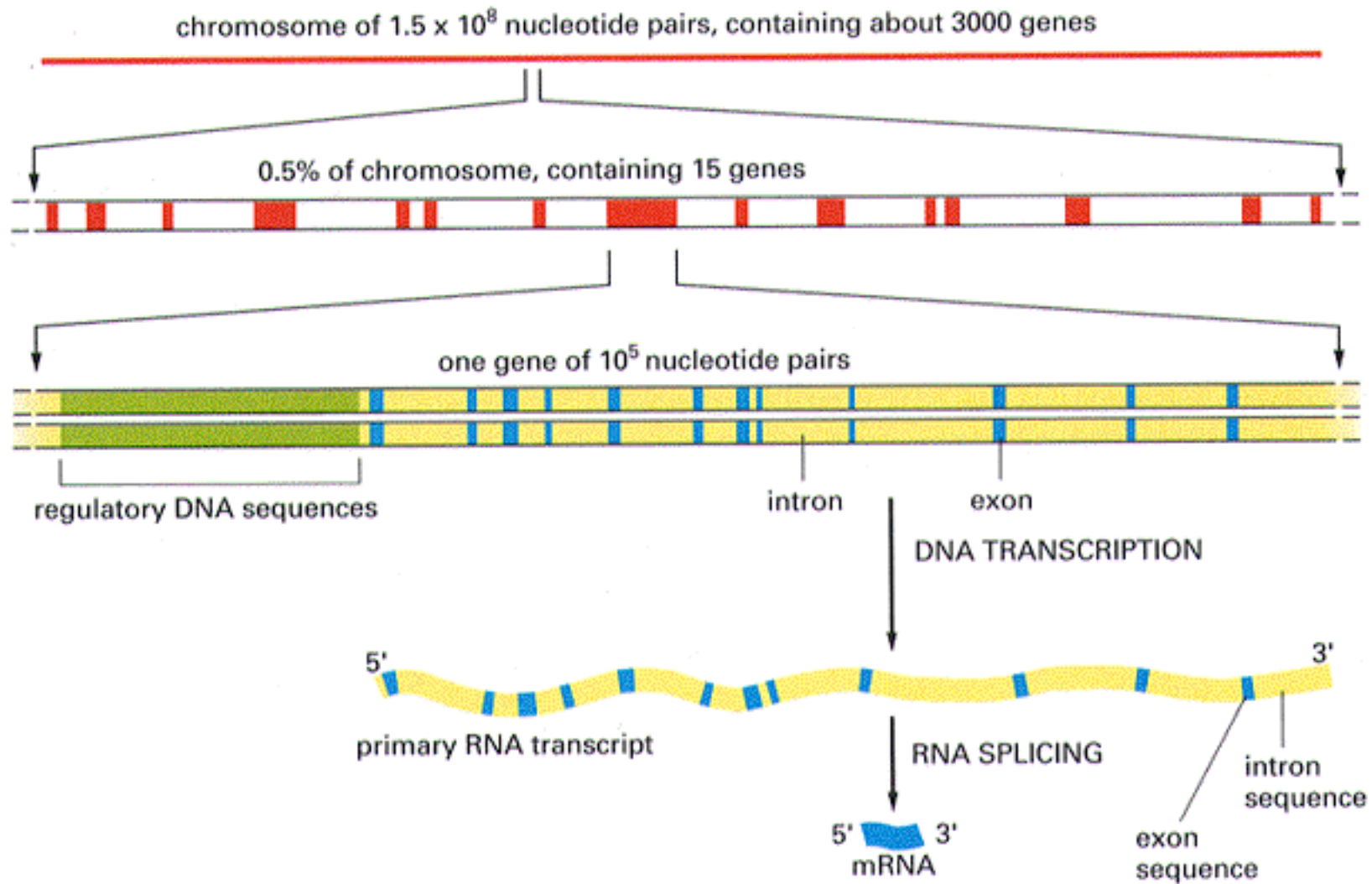
3° controllo per PCR (vedremo prossimamente) con strategie diverse tramite primers scelti sul plasmide ed eventualmente sul DNA clonato quando è lungo con successiva analisi su gel di agarosio

4° controllo: sequenziamento diretto dei punti critici del clonaggio (conservazione della open-reading-frame) oppure il verso di inserzione dell'inserto clonato

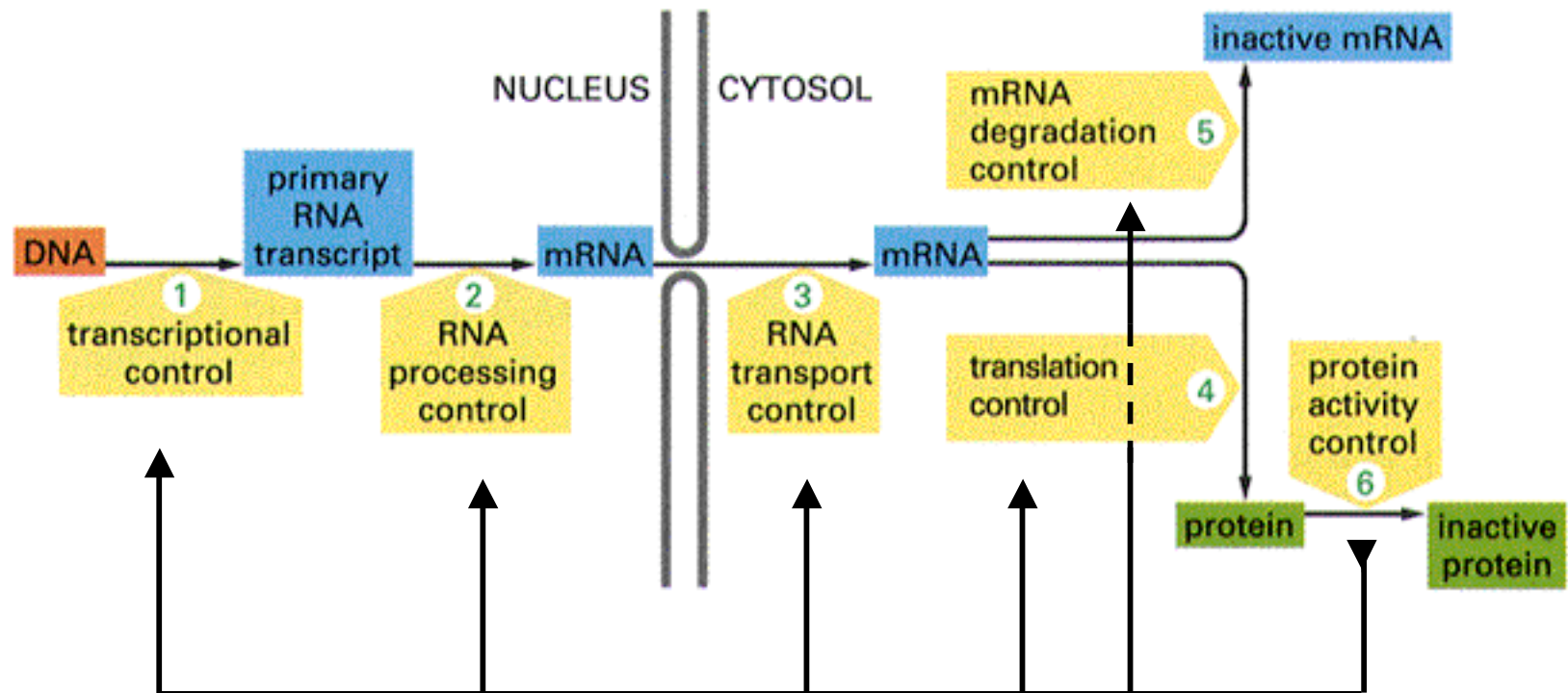
genomi



dal genoma alla cDNA library



dal DNA al fenotipo

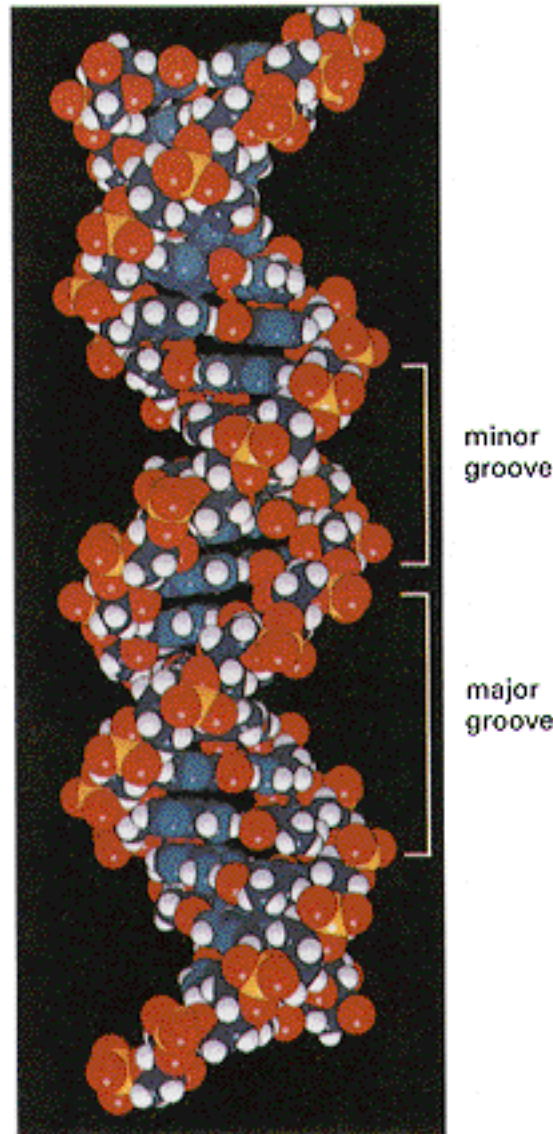


la doppia elica da e riceve informazioni

l'informazione genetica non procede a senso unico dal genoma verso il nucleo - citoplasma - matrice - e ambiente,

è vero anche il contrario perchè il genoma deve essere pronto a ricevere messaggi dall'ambiente in cui si trova le cellula:

questa è la regolazione



nuovi usi dei plasmidi

dai clonaggi e subclonaggi per analisi più fini e sequenziamento

le libraries di DNA genomico e cDNA (trascrittoma)

i vettori di espressione in E.coli o eucarioti

sistemi con promotori costitutivi o inducibili

negli eucarioti i plasmidi non si replicano

trasfezione transiente o stabile

la trasfezione stabile può avvenire tramite
integrazione del vettore

strutture del 1° plasmide



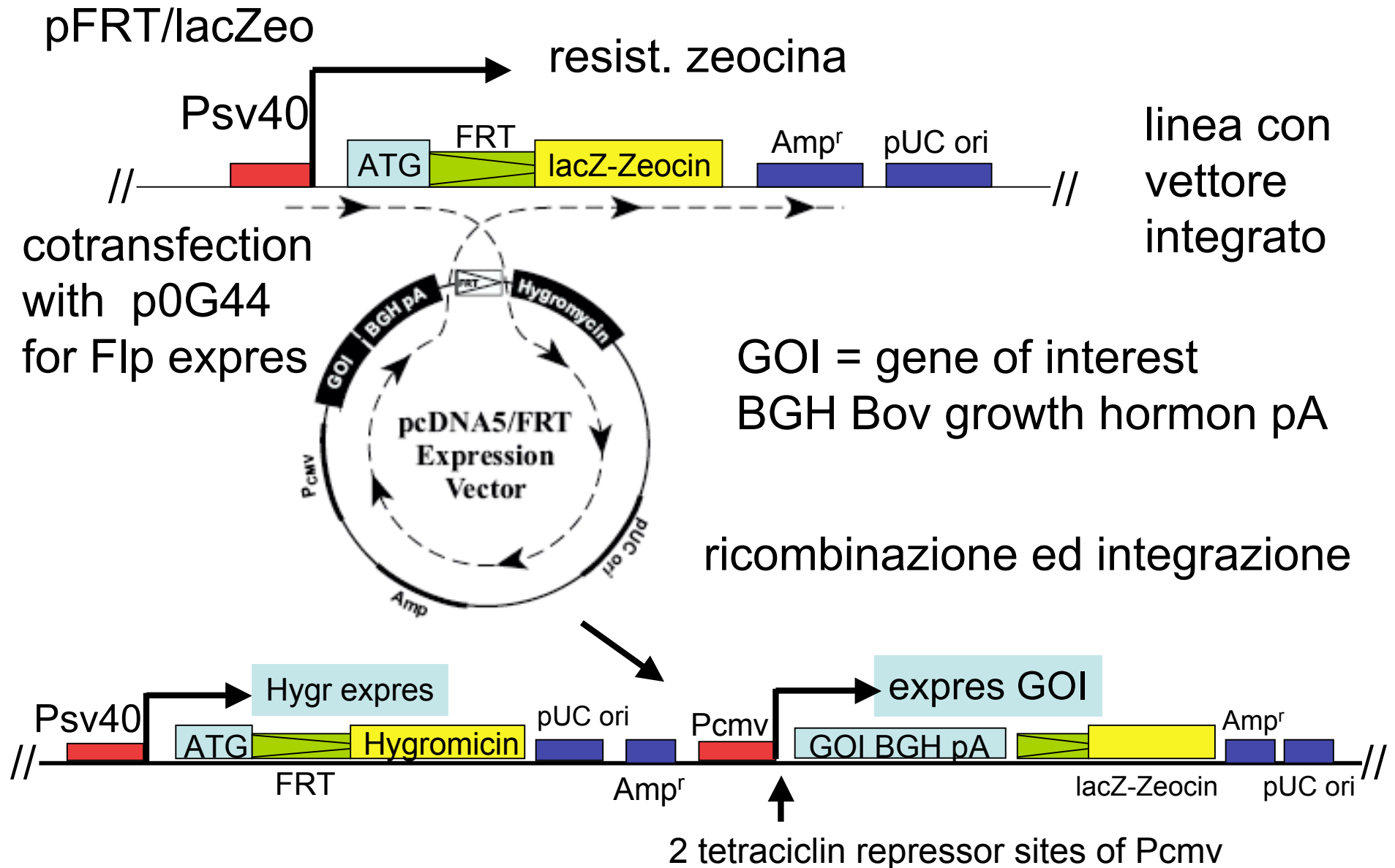
FRT = Flp Recombination Target

Flp-In Host Cell Line

la linea cellulare trasfettata diventa target per l'integrazione tramite Flp

la linea può essere cotrasfettata con il plasmide con il gene cDNA di interesse + pOG44 (che esprime la Flp recombinase)

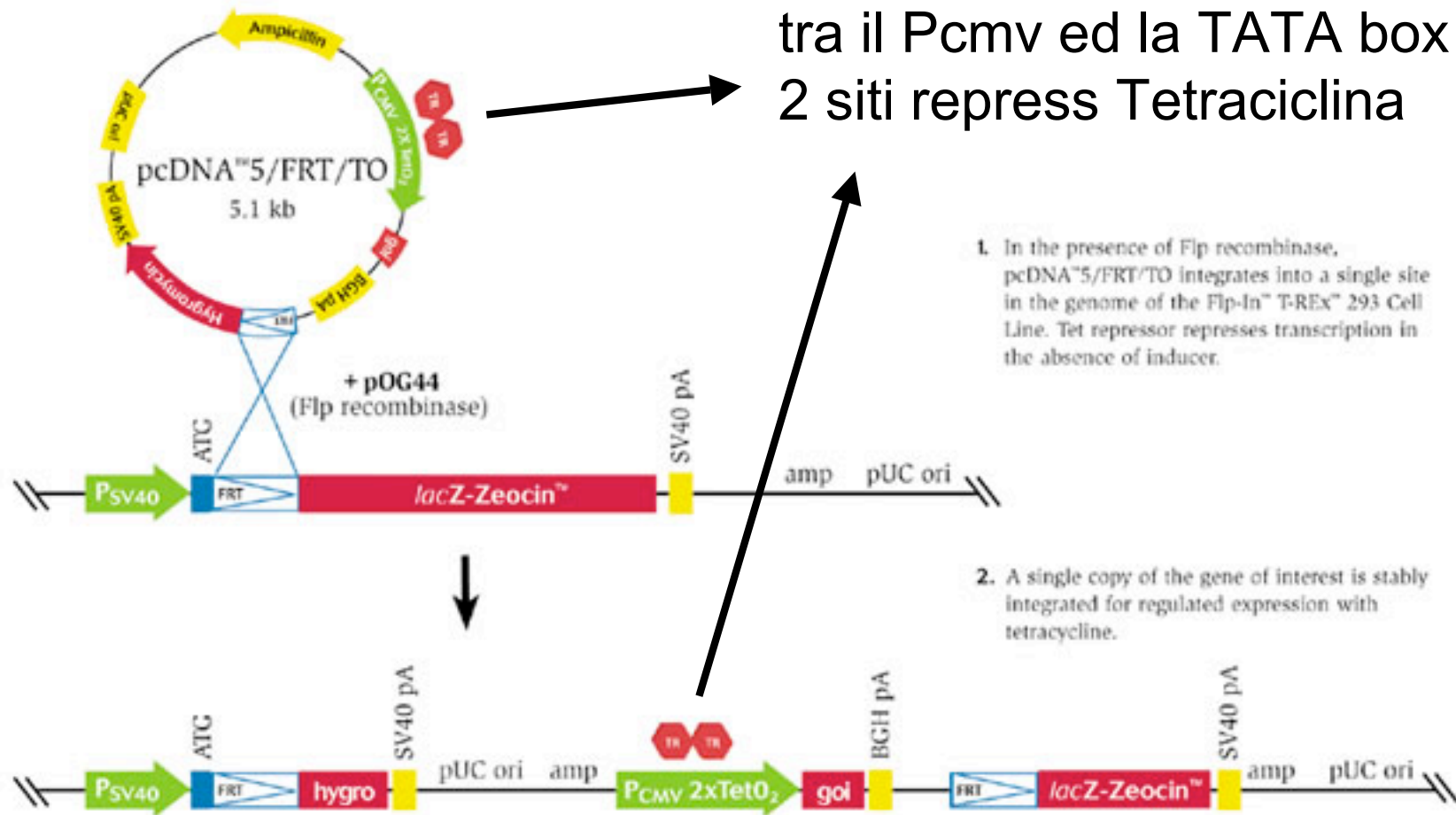
integrazione del GOI



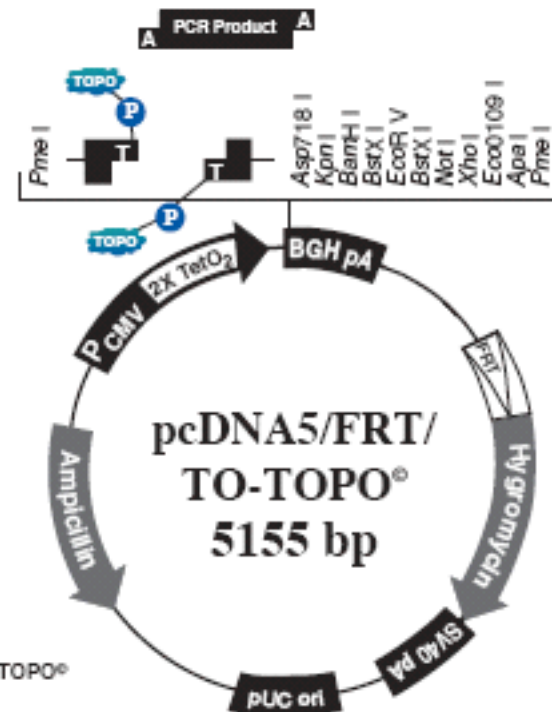
un sistema inducibile

la linea cell deve avere anche pT-Rex
per repress Tetrac.

Figure 1 - Integration of the Flp-In™ T-REx™ vector



topo isomerase plasmid



Comments for pcDNA5/FRT/TO-TOPO®
5155 nucleotides

CMV promoter: bases 232-958

TATA box: bases 804-810

Tet operator (2X TetO₂) sequences: bases 820-859

CMV forward priming site: bases 769-789

TOPO® Cloning site: bases 989-990

BGH reverse priming site: bases 1107-1124

BGH polyadenylation signal: bases 1113-1337

FRT site: bases 1621-1668

Hygromycin resistance gene (no ATG): bases 1676-2695

SV40 early polyadenylation signal: bases 2828-2958

pUC origin: bases 3341-4014 (complementary strand)

bla promoter: bases 5020-5118 (complementary strand)

Ampicillin (bla) resistance gene: bases 4159-5019 (complementary strand)

plasmide pOG44

Map of pOG44

pOG44 is a 5785 bp vector that expresses a temperature-sensitive Fip recombinase (flp-F70L) under the control of the human CMV promoter as previously described (O'Gorman *et al.*, 1991). The vector contains a synthetic intron to enhance expression of the *FLP* gene. Note that the vector does not contain an antibiotic resistance marker to allow stable selection in mammalian cells. The figure below summarizes the features of the pOG44 vector. The complete sequence for pOG44 is available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page 7).



introne di fusione
della regione
di trascrizione tardiva
di Adenovirus + Ig
Variable
che funge da enhancer

Comments for pOG44 5785 nucleotides

CMV promoter: bases 234-821

Synthetic intron: bases 871-1175

FLP ORF: bases 1202-2473

SV40 late polyadenylation signal: bases 2597-2732

pUC origin: bases 3327-3993 (complementary strand)

bla promoter: bases 4999-5097 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4138-4998 (complementary strand)

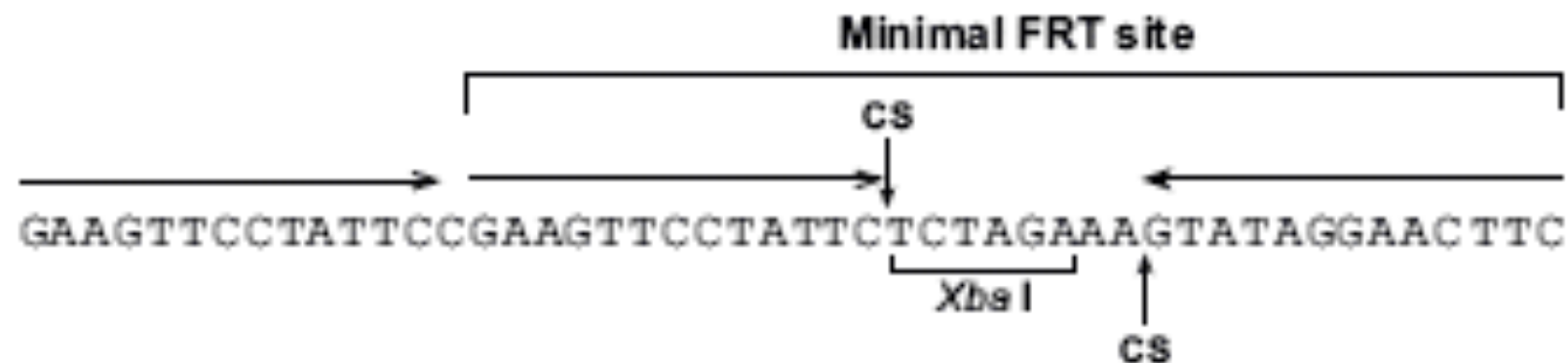
strutture specifiche

Features of pOG44 The table below describes the relevant features of pOG44. All features have been functionally tested.

Feature	Benefit
Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter	Allows high-level expression of the <i>FLP</i> gene (Andersson <i>et al.</i> , 1989; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Nelson <i>et al.</i> , 1987)
Synthetic intron	Hybrid fragment which contains sequences derived from the adenovirus major late region and an IgG variable region (Huang and Gorman, 1990; O'Gorman <i>et al.</i> , 1991) and functions to enhance expression of the <i>FLP</i> gene
<i>FLP</i> ORF (flp-F70L)	Encodes a temperature-sensitive Flp recombinase (Buchholz <i>et al.</i> , 1996) that mediates conservative recombination via FRT sites (O'Gorman <i>et al.</i> , 1991)
SV40 late polyadenylation signal	Allows polyadenylation of mRNA
pUC origin	Allows high-copy number replication and growth in <i>E. coli</i>
<i>bla</i> promoter	Allows expression of the ampicillin (<i>bla</i>) resistance gene
Ampicillin (<i>bla</i>) resistance gene (β -lactamase)	Allows selection of transformants in <i>E. coli</i>

sito FRT per enzima FLP

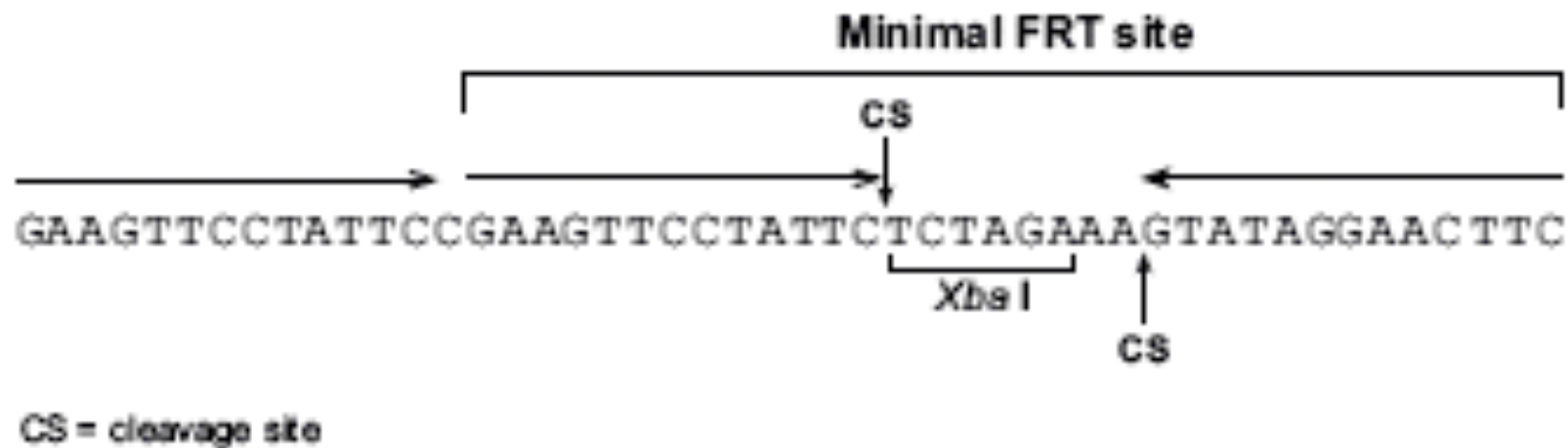
The FRT site, originally isolated from *Saccharomyces cerevisiae*, serves as a binding site for Flp recombinase and has been well-characterized (Gronostajski and Sadowski, 1985; Jayaram, 1985; Sauer, 1994; Senecoff *et al.*, 1985). The minimal FRT site consists of a 34 bp sequence containing two 13 bp imperfect inverted repeats separated by an 8 bp spacer that includes an *Xba*I restriction site (see figure below). An additional 13 bp repeat is found in most FRT sites, but is not required for cleavage (Andrews *et al.*, 1985). While Flp recombinase binds to all three of the 13 bp repeats, strand cleavage actually occurs at the boundaries of the 8 bp spacer region (see figure below) (Andrews *et al.*, 1985; Senecoff *et al.*, 1985).



CS = cleavage site

sito FRT per l'enzima FLP

sito FRT, isolato da *Saccharomyces cerevisiae* per il legame della ricombinase Flp (Gronastajski and Sadowski, 1985; Jayaram, 1985; Sauer, 1994). sito minimo FRT = 34 bp di sequenza; palindrome imperfetta di 13 bp separata da uno spaziatore di 8 bp con un sito di restrizione Xba I. Un frammento ulteriore di 13 bp sul lato vicino al sito di taglio (cleavage site). La Flp rec lega i tre elementi di 13bp e taglia sul bordo dell'elemento di 8 bp dove stanno le due ripetizioni da 13 bp. (vedi la figura sotto: Andrews et al 1985; Senecoff et al, 1985).

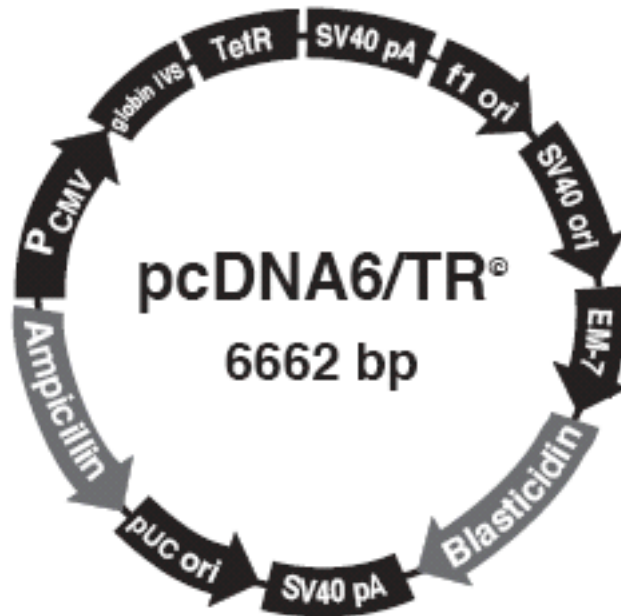


l'espressione del repressore Tet

Mechanism of Repression

In the absence of tetracycline, the Tet repressor forms a homodimer that binds with extremely high affinity to each TetO2 sequence in the promoter of the inducible expression vector (Hillen and Berens, 1994). The 2 TetO2 sites in the promoter of the inducible expression vector serve as binding sites for 4 molecules (or 2 homodimers) of the Tet repressor. The affinity of the Tet repressor for the tet operator is $K_B = 2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ (as measured under physiological conditions), where K_B is the binding constant (Hillen and Berens, 1994). Binding of the Tet repressor homodimers to the TetO2 sequences represses transcription of your gene of interest. Upon addition, tetracycline binds with high affinity to each Tet repressor homodimer in a 1:1 stoichiometry and causes a conformational change in the repressor that renders it unable to bind to the Tet operator. The association constant, K_A , of tetracycline for the Tet repressor is $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Hillen and Berens, 1994). The Tet repressor:tetracycline complex then dissociates from the Tet operator and allows induction of transcription from the gene of interest.

Plasmide Tet repressor



10

Comments for pcDNA6/TR[®]
6662 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

Rabbit β -globin intron II (IVS): bases 1028-1600

TetR gene: bases 1684-2340

SV40 early polyadenylation sequence: bases 2346-2477

f1 origin: bases 2897-3325

SV40 promoter and origin: bases 3335-3675

EM-7 promoter: bases 3715-3781

Blasticidin resistance gene: bases 3782-4180

SV40 early polyadenylation sequence: bases 4338-4468

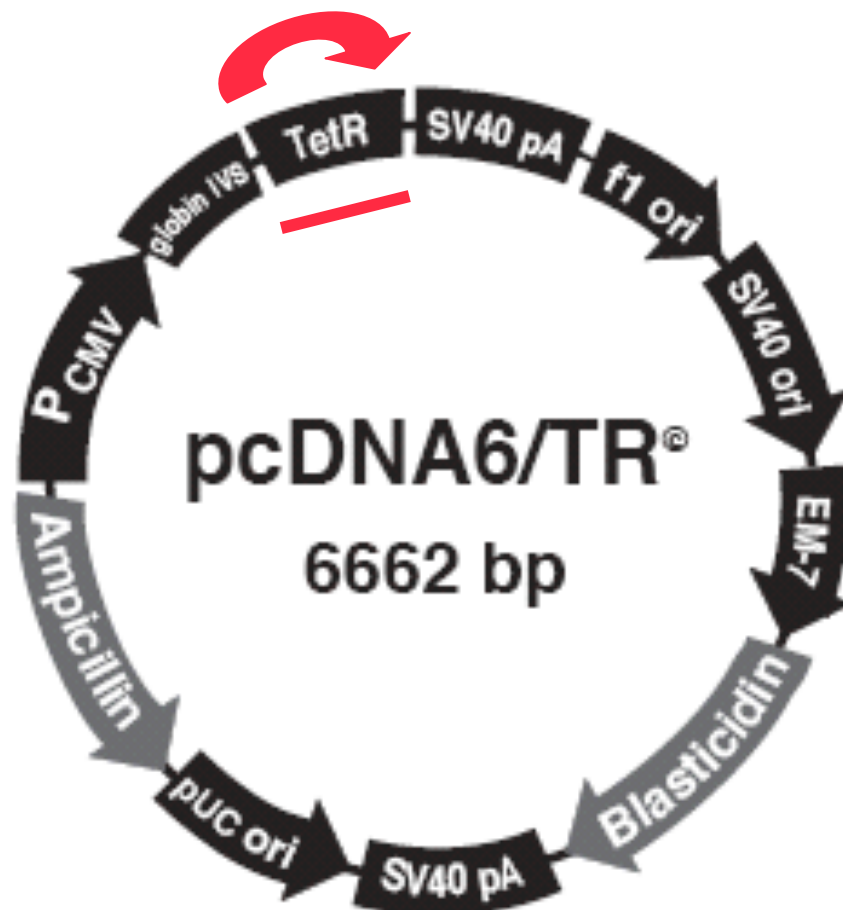
pUC origin: bases 4851-5521

bla promoter: bases 6521-6625 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 5666-6526 (complementary strand)

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter
- Rabbit β -globin intron II (IVS)
- TetR gene
- SV40 early polyadenylation signal
- f1 origin
- SV40 early promoter and origin
- EM7 promoter (Ecoli syntetic promoter)
- Blasticidin (bsd) resistance gene
- SV40 early polyadenylation signal
- pUC origin
- bla promoter
- Ampicillin (*bla*) resistance gene (β -lactamase)

Plasmid Tet repressor expression



- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter
- Rabbit β -globin intron II (IVS)
- TetR gene
- SV40 early polyadenylation signal
- f1 origin
- SV40 early promoter and origin
- EM7 promoter (Ecoli syntetic promoter)
- Blastcidin (bsd) resistance gene
- SV40 early polyadenylation signal
- pUC origin
- bla promoter
- Ampicillin (bla) resistance gene (β -lactamase)

vantaggi del sistema Flp

Advantages of the Flp-In™ T-REx™ System

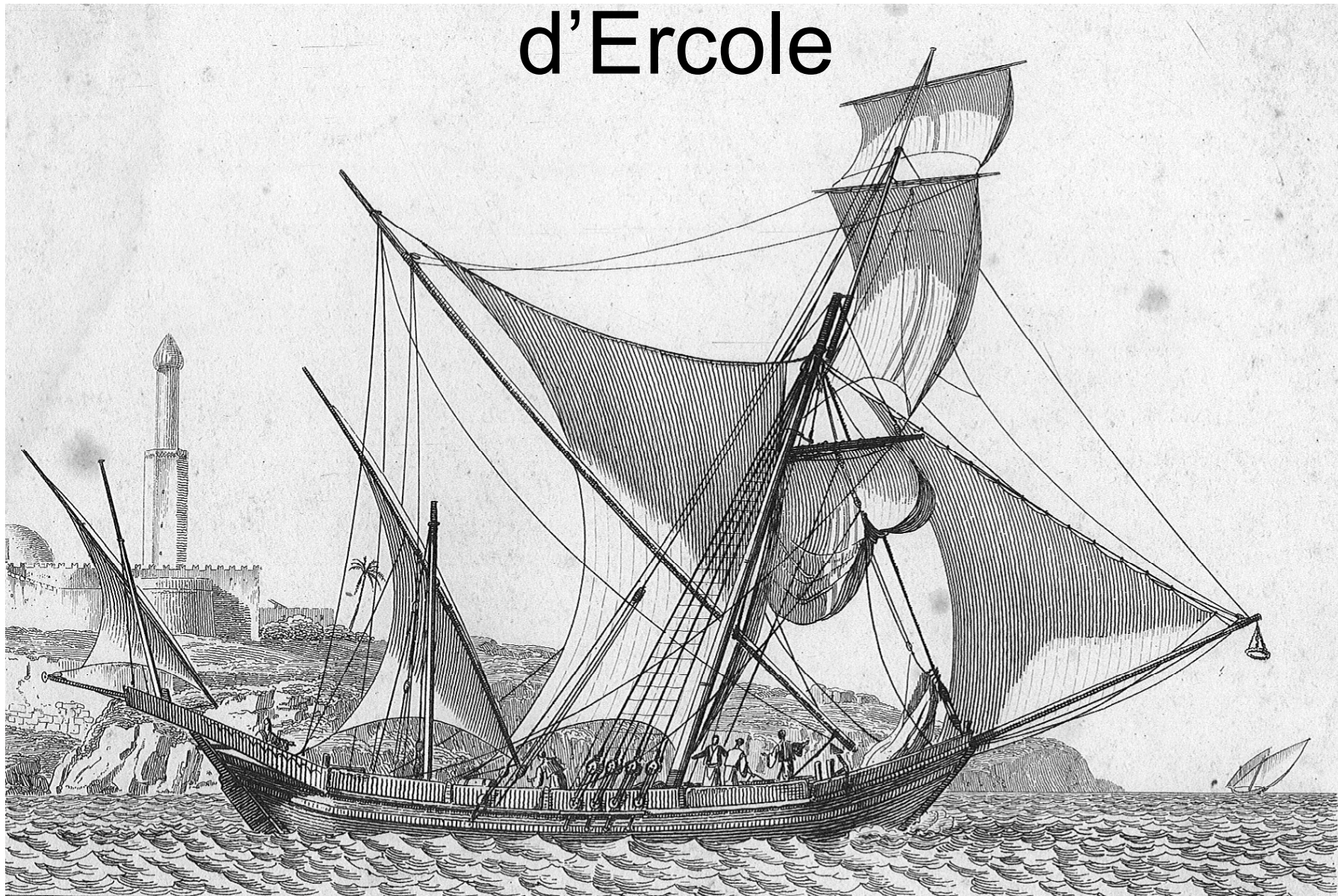
Use of the Flp-In™ T-REx™ System to generate stable expression cell lines provides a number of advantages as described below:

- Once the Flp-In™ T-REx™ host cell line containing an integrated FRT site has been created, subsequent generation of Flp-In™ T-REx™ cell lines expressing the gene(s) of interest is rapid and efficient.
 - The Flp-In™ T-REx™ System allows the generation of isogenic, inducible stable cell lines.
 - The Flp-In™ T-REx™ System permits polyclonal selection of stable expression cell lines.
-

Vantaggi dell'uso del sistema Flp in T-Rex per produrre linee cellulari ad espressione stabile:

- preparata la linea cellulare con il vettore integrato stabilmente col sito FRT si fa ricombinare facilmente con il plasmide col gene di interesse da esprimere
- il sistema Flp in T-Rex permette di fare linee isogeniche, stabili ed inducibili
- il sistema Flp in T-Rex permette una selezione policlonale di linee cellulari che esprimono stabilmente il gene di interesse

navigare oltre le colonne d'Ercole



cosa penserebbe Dante inf. c.XXVI

94, né dolcezza di figlio, né la pieta
del vecchio padre, né 'l debito amore
lo qual dovea Penelopé far lieta,

97, vincer potero dentro a me l'ardore
ch'i' ebbi a divenir del mondo esperto,
e de li vizi umani e del valore;

100, ma misi me per l'alto mare aperto
sol con un legno e con quella compagna
picciola da la qual non fui diserto.

133, quando n'apparve una montagna, bruna
per la distanza, e parvemi alta tanto
quanto veduta non avea alcuna.

136, Noi ci allegrammo, e tosto tornò in pianto,
ché de la nova terra un turbo nacque,
e percosse del legno il primo canto.

139, Tre volte il fé girar con tutte l'acque;
a la quarta levar la poppa in suso
e la prora ire in giù, com'altrui piacque,

142, infin che 'l mar fu sovra noi richiuso".

all'inferno i cattivi consiglieri

come si fa a giudicare se una ricerca è giusta o sbagliata dal punto di vista etico

è giusto che ci siano i comitati etici che però non possono giudicare sull'obiettivo di conoscenza della ricerca ma sulla eventuale procedura non etica e sulla eventuale strumentalità di quella conoscenza

riepilogo

4 vettori :

1 per integrazione nella linea cellulare con FLP site

2 plasmide che esprime il repressore Tet O

3 per far ricombinare nel sito FRT il gene d'interesse

4 trasfezione transiente per fare esprimere la ricombinase