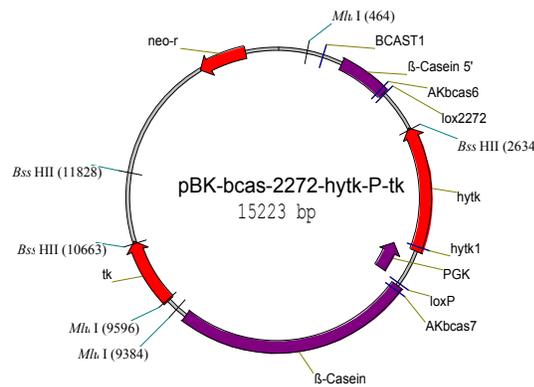


### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 VETTORE DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO p53

##### 3.1.1 Sintesi del costrutto

Abbiamo iniziato a testare il primo tipo di cassetta di selezione negativa in una linea di cellule epiteliali mammarie murine immortalizzate (HC11). Il costrutto di ricombinazione di partenza da noi utilizzato è il pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk fornitoci dal prof. Andreas Kolb, che presenta il gene di fusione HyTk (che conferisce resistenza all'igromicina e sensibilità al gancyclovir) all'interno della regione di omologia per la  $\beta$ -caseina murina e un ulteriore TK come selettore negativo all'esterno di tale cassetta.

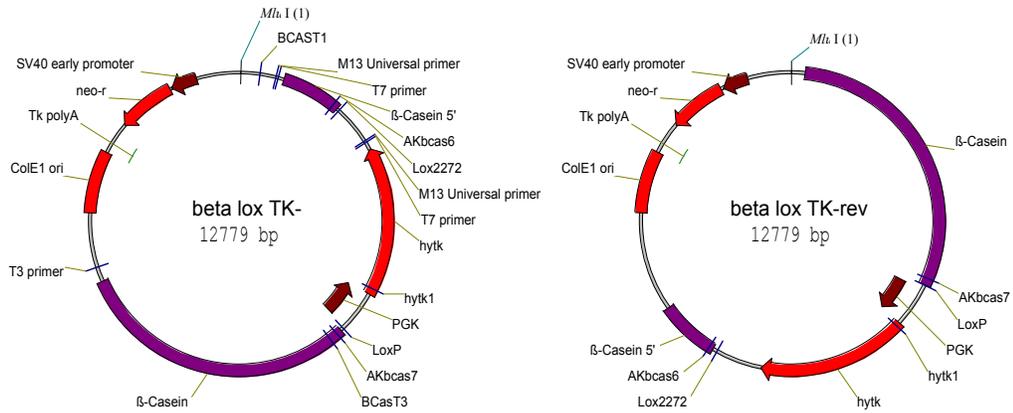


**Fig. 3.1**

Costrutto originale pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk del prof. Andreas Kolb

Dopo aver eliminato il TK esterno e alcuni siti di restrizione, si è inserito come selettore esterno una cassetta d'espressione per la p53, proteina chiave nel processo apoptotico ( $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev).

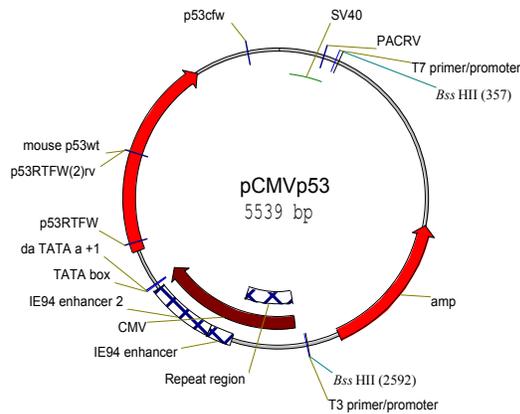
L'eliminazione del TK esterno ( $\beta$ -loxTK<sup>-</sup> e  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev) è stata realizzata ligando tra loro i frammenti pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk // *Bss*HII+*Mlu*I e pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk // *Mlu*I.



**Fig. 3.2**

Costrutti  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup> e  $\beta$ -loxTK<sup>-rev</sup> derivanti dall'eliminazione del TK esterno alla regione di omologia per la  $\beta$ -caseina murina del costrutto originale pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk di Kolb

Il marcatore per la selezione negativa è stato ottenuto digerendo enzimaticamente il plasmide pCMVp53 con *Bss*HIII. Quest'ultimo poi è stato rilegato al vettore  $\beta$ -loxTK<sup>-rev</sup> // *Mlu*I, ottenendo così il costrutto finale  $\beta$ -loxTK<sup>-rev</sup>/p53rev.



**Fig. 3.3**

Plasmide da cui è stata estratta la cassetta di selezione negativa p53.

### 3.1.2 Preparazione del DNA per le trasfezioni

Il costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev precedentemente allestito nel nostro laboratorio è stato utilizzato per trasformare cellule di *Escherichia coli* competenti e conservato così in glicerolo a -80°C. Dato che il DNA per la trasfezione di colture cellulari deve essere molto pulito, abbiamo riestratto tali plasmidi con il Plasmid Mini Kit (Qiagen).

La sera precedente all'estrazione vengono inoculati da stock al glicerolo o da striscio su piastra le cellule competenti con i plasmidi d'interesse in 5 ml di terreno liquido LB (Luria-Bertani medium: 10 g/l triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l NaCl) addizionato con 50 µg/ml di kanamicina, dato che i nostri plasmidi contengono la resistenza alla neomicina. Gli inoculi vengono incubati a 37°C per 16 ore circa, e il giorno successivo si procede con l'estrazione dei plasmidi con Plasmid Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo.

Il costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev è stato linearizzato mediante l'enzima di restrizione *Sfi*I (Amersham) e incubato a 37°C per circa 1 ora: il frammento atteso è di 16089 pb. La digestione viene controllata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,7%, utilizzando come marcatore di peso molecolare il  $\lambda$  DNA // *Hind*III (Fermentas).

Il successivo passaggio di purificazione è necessario in quanto il DNA per la trasfezione deve essere molto pulito. I residui normalmente presenti, a causa di purificazioni poco accurate o per processi di digestione, sono le proteine. La purificazione e successiva precipitazione sono indispensabili per allontanarle e, nel caso di enzimi di restrizione, evitare digestioni letali del genoma delle cellule trasfettate.

Il DNA digerito viene estratto con 1 vol. di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1), precipitato con etanolo e risospeso in tampone TE (1 mM EDTA; 10 mM Tris, pH 8) nella quantità desiderata.

Dopo aver digerito e purificato il DNA da utilizzare nelle trasfezioni, esso va quantificato su gel d'agarosio, utilizzando diluizioni dello stesso e del marcatore di peso molecolare di quantità nota. Anche in questo caso, abbiamo usato varie diluizioni di  $\lambda$  DNA // *Hind*III.

### 3.1.3 Colture cellulari di HC11 e trasfezioni

Le HC11 sono una linea di cellule epiteliali mammarie murine immortalizzate (Doppler et al., 1989). Esse sono coltivate in RPMI, con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino, 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomicina, 2,5 µg/ml anfotericina B (tutto Euroclone) e 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) (Sigma).

#### ➤ Scongelo e coltura

Le cellule, conservate in CryoVials (Nalgene) in azoto liquido, vengono scongelate a temperatura ambiente, diluite in terreno fresco, centrifugate, risospese in 5 ml di RPMI completo e trasferite in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> (Corning) per colture cellulari. Le cellule vengono poi incubate a 37°C ad atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Il cambio del terreno, che mediamente si effettua ogni 2-3 giorni, viene indicato dal viraggio al giallo del rosso fenolo, indicatore di pH presente nel terreno stesso: ciò avviene in seguito all'acidificazione del terreno dovuta alla crescita cellulare.

La procedura di cambio del terreno prevede l'aspirazione completa del terreno esaurito, il lavaggio con 3 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline: 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), la sua successiva aspirazione e l'aggiunta di terreno fresco.

Quando le cellule raggiungono la confluenza, dopo il lavaggio con PBS, si effettua la tripsinizzazione. La tripsina (EuroClone: 0,05% tripsina; 0,02% EDTA in PBS) infatti permette il distacco delle HC11 dalla fiasca per poterle riattivare o diluire, a seconda delle necessità.

Il processo di tripsinizzazione, svolto in maniera controllata, agisce a livello dei legami intercellulari e dei legami delle cellule stesse con il substrato sintetico delle fiasche, senza danneggiare le cellule. Questa fase di distacco è indispensabile in quanto cellule iper-confluenti vanno incontro a morte a causa dell'inibizione da contatto.

Per fiasche da 25 cm<sup>2</sup> è sufficiente aggiungere 1 ml di tripsina e incubare a 37°C per qualche minuto. Dopo aver controllato l'avvenuto distacco al microscopio rovesciato, la tripsina viene inattivata con 2 ml di terreno completo, si pipetta e si lavano le pareti della fiasca in modo da ottenere una sospensione di singole cellule. Infine si diluisce in RPMI completo a seconda delle necessità.

#### ➤ Trasfezione

Per effettuare la trasfezione è necessario riattivare le cellule un paio di giorni prima: questa fase ci garantisce di avere una coltura vitale, non soggetta a inibizione da contatto. La riattivazione consiste nel tripsinizzare e diluire le cellule alla concentrazione desiderata.

Il giorno successivo alla riattivazione, le cellule vengono contate mediante camera emocitometrica e seminate in fiasche o piastre per colture cellulari delle dimensioni desiderate.

La procedura prevede l'aspirazione del terreno, il lavaggio con PBS, l'aggiunta di 1 ml di tripsina per fiasche da 25 cm<sup>2</sup> e l'inattivazione con 2 ml di RPMI completo. A questo punto, si risospende la coltura cellulare pipettando, si trasferisce una goccia su

ciascuna delle due camere emocitometriche e si contano le cellule presenti. Si calcola successivamente la media delle cellule contate nei due campi e si moltiplica tale valore per  $10^4$  in modo da ottenere la concentrazione (n° di cellule/ml). Ogni quadrato dell'emocitometro con vetrino coprioggetti infatti corrisponde ad un volume di  $10^{-4}$   $\text{cm}^3$ . Dato che  $1 \text{ cm}^3$  equivale circa a 1 ml, la concentrazione di cellule per ml sarà:

$$\text{media delle cellule contate} / 10^{-4} \text{ ml} = \text{media delle cellule contate} * 10^4 / \text{ml}$$

Dopo la conta, le cellule vengono diluite e seminate in modo da avere circa  $1-3 * 10^5$  cellule in piastre Petri (Falcon) da 60 mm di diametro pronte per la trasfezione.

Il giorno successivo abbiamo eseguito la trasfezione tramite liposomi: si tratta di sostanze chimiche in grado di formare strutture vescicolari lipidiche monostrato, inglobando al loro interno il DNA. I liposomi possono così interagire con le membrane cellulari e veicolare il DNA fino al nucleo.

Per questi esperimenti abbiamo utilizzato in parallelo due diversi prodotti commerciali: il Metafectene della Biontex e il FuGENE6<sup>TM</sup> della Roche. Per ogni trasfezione allestita, abbiamo utilizzato come controllo positivo, cellule trasfettate con una cassetta d'espressione per la GFP e come controllo negativo cellule trasfettate senza DNA.

## 1. Metafectene

Qualche ora prima della trasfezione, le cellule da trasfettate vengono lavate con PBS e si aggiunge terreno fresco.

La soluzione A viene allestita miscelando, in una provetta da 1,5 ml, 0,5  $\mu\text{g}$  di DNA con RPMI senza siero e antibiotici, precedentemente filtrato (filtri sterili di acetato di cellulosa ALBET-JACS,  $\varnothing = 0,20 \mu\text{m}$ ), per arrivare ad un volume finale di 300  $\mu\text{l}$ , pipettando delicatamente.

La soluzione B si prepara con 6  $\mu\text{l}$  di Metafectene e RPMI senza siero e antibiotici per arrivare ad un volume finale di 300  $\mu\text{l}$ , sempre pipettando gentilmente.

Si unisce infine la soluzione B alla soluzione A, pipettando piano, senza agitare o centrifugare, e si incuba a temperatura ambiente per 20 minuti. Alla fine si trasferisce la miscela nel terreno di coltura delle cellule e si incuba per 48 ore a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

## 2. FuGENE6<sup>TM</sup>

Anche con questo secondo protocollo, è necessario cambiare il terreno alle cellule qualche ora prima della trasfezione.

In questo caso, in provetta da 1,5 ml si prepara una miscela con 297  $\mu\text{l}$  di RPMI senza siero e antibiotici precedentemente filtrato, e 3  $\mu\text{l}$  di FuGENE6<sup>TM</sup>, stando attenti a non fare entrare in contatto l'agente di trasfezione con le pareti della provetta stessa. Si agita la provetta e la si lascia a temperatura ambiente per 5 minuti. Si aggiunge poi 1  $\mu\text{g}$  di DNA da trasfettare alla miscela, si inverte un paio di volte e la si lascia per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, la miscela di trasfezione viene aggiunta alle cellule goccia a goccia. Si distribuisce infine uniformemente il terreno e si incuba per 48 ore a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

➤ Selezione delle cellule trasfettate

Dopo 48 ore d'incubazione, iniziano i 14 giorni di selezione. In questo esperimento l'agente di selezione è l'igromicina, in quanto il plasmide che abbiamo usato per le trasfezioni, se integrato, rende le cellule resistenti a tale antibiotico. Per le HC11 la concentrazione da usare di igromicina B è 300 µg/ml (Roche) in RPMI, in base alle prove di titolazione eseguite.

Prima del cambio di terreno, si valuta l'efficienza di trasfezione mediante conta delle cellule fluorescenti del controllo positivo al microscopio ottico rovesciato, dotato di appositi filtri per l'epifluorescenza. Si contano 10 campi visivi (10x) casuali e si calcola la media di cellule fluorescenti per campo.

Fatto ciò, si aspira il terreno, si effettua un lavaggio con PBS e si aggiunge il terreno di selezione. Nella prima settimana di selezione si effettua il cambio di terreno ogni due giorni, mentre nella seconda settimana si riduce la frequenza effettuando il cambio solo se necessario.

➤ Isolamento dei cloni

Tra il quinto e il settimo giorno di selezione si procede all'isolamento dei cloni cellulari. Questo passaggio ci permette di isolare i cloni derivati da singole cellule resistenti all'igromicina e di espanderli separatamente per le successive analisi.

Quando i cloni in selezione sono ben identificabili ed ancora ben separati tra loro, si posiziona una griglia numerata sul fondo della piastra e si procede alla localizzazione di tutti i cloni presenti. Si prepara una piastra da 96 pozzetti per colture cellulari (Corning) con 200 µl di terreno di selezione in ogni pozzetto.

La piastra da cui dobbiamo isolare i cloni viene lavata con PBS e si aggiungono 3 ml di tripsina diluita 1:20 in PBS. Individuato il clone al microscopio ottico rovesciato, con un puntale di una pipetta p10 si entra al centro del clone, si aspira (se le cellule non si staccano, si gratta delicatamente il fondo della piastra) e si trasferiscono i 10 µl aspirati in un pozzetto della piastra da 96.

Esauriti i cloni, si procede alla replica, trasferendo 100 µl del contenuto ben risospeso di ogni pozzetto in una piastra nuova da 96. La prima replica si utilizza per l'estrazione del DNA da usare per le successive analisi di PCR, mentre la seconda replica viene conservata a -80°C per eventuali espansioni in caso di cloni positivi. Si prosegue poi con la selezione. Dopo 14 giorni, se le cellule non sono ancora giunte a confluenza, si toglie la selezione e si continua con la coltura in terreno RPMI normale.

➤ Lisi dei cloni isolati

Quando le cellule giungono a confluenza nel pozzetto, esse vengono lisate con un sistema rapido che non prevede l'estrazione di DNA con fenolo/cloroformio/alcol isoamilico, ma permette comunque di effettuare un'analisi tramite PCR.

Il metodo consiste nell'utilizzo del tampone PBNB (PCR Buffer with Non-ionic Detergents: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O; 0,1 mg/ml gelatina; 0,45% v/v NP40; 0,45% v/v Tween20).

Dopo aver tolto il terreno di crescita alle cellule, si aggiungono 50 µl di PBNB e 0,15 µl di proteinasi K (20 mg/ml) per pozzetto e la piastra viene incubata per 1 ora a 37°C. Successivamente il lisato viene trasferito in una provetta da 0,5 ml e si incuba 1 ora a 55°C. Infine si inattiva la proteinasi K a 95°C per 10 minuti in un termociclatore e il lisato così ottenuto può essere conservato in congelatore a -20°C per le successive analisi di PCR.

➤ Congelamento dei cloni isolati

La seconda replica di HC11 trasfettate e isolate nella piastra da 96 pozzetti, viene preparata per essere congelata a -80°C.

Dopo aver aspirato il terreno e lavato le cellule con PBS, si aggiungono 100 µl di RPMI completo addizionato con 10% DMSO (Sigma) e la piastra viene trasferita nel congelatore a -80°C.

### 3.1.3.1 *Analisi mediante PCR dei cloni isolati*

I lisati dei cloni di HC11 trasfettate con il vettore di ricombinazione β-loxTK<sup>-</sup> rev/p53rev isolati sono stati analizzati mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).

Per rendere piuttosto rapida l'analisi di un così alto numero di lisati cellulari, abbiamo utilizzato come miscela di reazione un prodotto commerciale completo di DNA polimerasi termostabile nel suo tampone di reazione, con nucleotidi e magnesio, chiamato MasterMix (Promega), che richiede solo l'aggiunta dei primer e di acqua per il raggiungimento del volume finale di reazione.

I primer disegnati mediante il programma VectorNTI e utilizzati per l'analisi sono:

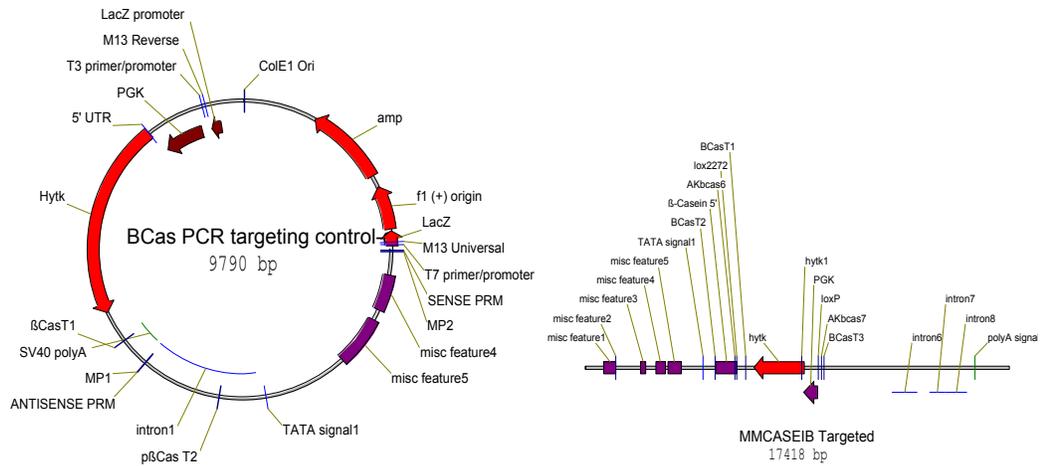
**βcasT1:** GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

**βcasT2:** CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

Il primo primer riconosce una sequenza all'interno del nostro vettore di "targeting", mentre il secondo si appaia ad una regione endogena della β-caseina murina (introne1) non compresa nel costrutto utilizzato per la trasfezione: in questo modo si ottiene un'amplificazione solo nel caso di avvenuta ricombinazione omologa.

Per avere un controllo positivo della reazione di PCR è stato realizzato un costrutto (BCas PCR targeting control-c), che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che dia un amplificato di dimensioni simili (1209 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto "gene-targeting" (1269 pb), in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica.

Come controllo negativo della reazione, oltre alla sola acqua, abbiamo utilizzato anche un lisato di HC11 wild-type ottenuto sempre con metodo PBND.



**Fig. 3.4**

A sinistra: plasmide controllo positivo per la reazione di PCR con primer  $\beta$ casT1 +  $\beta$ casT2  
A destra: ipotetico locus della  $\beta$ -caseina murina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa

*Esempio di miscela di reazione per PCR in piastra da 96 pozzetti (Eppendorf):*

DNA lisato PBND	1 $\mu$ l		
MasterMix (2x)	10,5 $\mu$ l	mix x 100	1050 $\mu$ l
Primer $\beta$ casT1+ $\beta$ casT2 (25 $\mu$ M ciascuno)	0,8 $\mu$ l		80 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,7 $\mu$ l		870 $\mu$ l
$V_f$	21 $\mu$ l		2000 $\mu$ l:100 = 20 $\mu$ l + 1 $\mu$ l lisato

Il programma usato è il seguente, su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems):

95°C 2 minuti

95°C 30 secondi		x 35 cicli
56°C 30 secondi		
72°C 2 minuti		

72°C 5 minuti

Le reazioni vengono controllate su gel d'agarosio all'1%.

Come controllo endogeno dell'avvenuta amplificazione, i lisati sono stati analizzati anche con primer GDX1 e GDX2, che amplificano il gene GdX "housekeeping" murino che codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle ubiquitine, e danno un prodotto di circa 700 pb.

**GDX1:** TAAGCTGAATGTCCCTGTGCGC

**GDX2:** TTCAGGGTGTAGAAAGCGGCTG

Il programma usato è il seguente, su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems):

95°C 2 minuti

95°C 30 secondi		x 35 cicli
58°C 30 secondi		
72°C 1 minuto		

72°C 5 minuti

### 3.1.3.2 *Analisi mediante Western blot*

#### ➤ Lisati cellulari

Alcuni cloni isolati di HC11 trasfettate col costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev sono stati espansi e, una volta giunti a confluenza, tripsinizzati. Successivamente abbiamo centrifugato  $10^6$  cellule e le abbiamo lavate con PBS. Il pellet è stato risospeso in 100  $\mu$ l di soluzione di lisi (1% SDS; 10% glicerolo; 10%  $\beta$ -mercaptoetanolo; 40 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,001% blu di bromofenolo), vortexato e bollito per 5-10 minuti per rompere il DNA. Il lisato viene poi fatto raffreddare a temperatura ambiente, centrifugato per raccogliere le gocce e nuovamente vortexato brevemente per mischiare il tutto.

#### ➤ SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Il metodo per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecilsolfato da noi usato è quello di Laemmli (1970), in cui tutte le componenti del sistema contengono 0,1% SDS. Abbiamo scelto una concentrazione di acrilammide del 10% per il gel di separazione, consigliato per proteine con un peso compreso tra i 16 e i 68 kDa: nel nostro caso infatti dovevamo visualizzare la proteina di controllo  $\beta$ -actina di 42 kDa e la proteina da analizzare p53 di 53 kDa. Il gel d'impaccamento è stato fatto ad una concentrazione del 5% di acrilammide.

La corsa viene effettuata con Mini-Protean II dual slab cell – BIO-RAD.

#### ➤ Trasferimento (elettroblotting)

Le proteine, separate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide, sono state successivamente trasferite su membrana PVDF (polivinildifluoruro) (BIO-RAD) con un processo elettroforetico, in quanto, in presenza di SDS, le proteine sono tutte cariche negativamente e corrono quindi verso l'anodo.

#### ➤ Lavaggi e "immunodetection"

Il giorno successivo vengono eseguiti i lavaggi e l'"immunodetection" (BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) - Roche). La rilevazione del segnale prevede due fasi: prima la membrana viene incubata con l'anticorpo primario murino specifico per la proteina d'interesse non marcato e successivamente con l'anticorpo secondario, in grado cioè di riconoscere la porzione costante dell'anticorpo di topo. Come anticorpi primari abbiamo usato un anticorpo anti- $\beta$ -actina (1:5000) su uno dei due gel, come controllo endogeno dell'avvenuto trasferimento, e uno anti-p53 (1-2  $\mu$ g/ml) sull'altro gel per l'analisi di nostro interesse (entrambi Abcam). Per quanto riguarda l'anticorpo secondario, abbiamo usato la miscela anti-IgG di topo/anti-IgG di coniglio del kit Roche coniugato con la perossidasi, che, in presenza del substrato chemiluminescente, catalizza la scissione di  $H_2O_2$  ed emette luce in grado di impressionare una lastra fotografica (Amersham).

### 3.1.4 Colture di cellule ES murine e trasfezioni

Successivamente abbiamo voluto cercare di valutare l'efficienza di "gene-targeting", trasfettando anche cellule ES murine col vettore  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev, in quanto questo tipo cellulare presenta un'efficienza di ricombinazione omologa più alta rispetto alle cellule somatiche.

Queste cellule vengono coltivate su feeder di fibroblasti embrionali murini (MEF) inattivati con Mitomicina C (Sigma) in DMEM High Glucose con l'aggiunta di 15% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutamina, 50  $\mu$ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomina, 0,1 mM aminoacidi non essenziali (tutto Euroclone), 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanolo e 1 mM piruvato di sodio (entrambi Sigma). Durante la selezione dopo la trasfezione, le cellule staminali sono state coltivate in piastre con uno strato di 0,1% (w/v) gelatina (Bovine skin, type B; Sigma Chemical Co.) nel terreno descritto sopra con l'aggiunta di 1000 U/ml di LIF (Leukemia Inhibitory Factor – ESGRO).

La trasfezione è stata eseguita mediante FuGENE6<sup>TM</sup> (Roche) come descritto nei protocolli, utilizzando 1  $\mu$ g di DNA e 3  $\mu$ l di FuGENE6<sup>TM</sup> per cellule seminate in piastre con diametro di 60 mm.

Dopo 48 ore, le cellule staminali embrionali murine sono state selezionate in terreno completo con 100  $\mu$ g/ml di igromicina B (Roche) per 14 giorni.

I cloni sopravvissuti di cellule ES sono stati isolati come già descritto sopra, e riespansi. Giunte a confluenza, le cellule vengono lisate col sistema PBNB (vedi sopra).

#### ➤ PCR

L'analisi degli isolati di cellule ES trasfettate con il costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>-</sup>rev/p53rev sono state svolte mediante PCR con primer  $\beta$ casT1 e  $\beta$ casT2 esattamente come sopra e in parallelo abbiamo eseguito la PCR di controllo con i primer endogeni GDX1 e GDX2. In più per sicurezza, tali cellule sono state analizzate anche con primer  $\beta$ casT2 e  $\beta$ casT3, che si trovano entrambi su sequenze della  $\beta$ -caseina endogena, assenti nei vettori utilizzati per la trasfezione. In questo caso, si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1097 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4507 pb). In questo modo, a differenza della PCR con primer  $\beta$ casT1 e  $\beta$ casT2, si ha direttamente anche un controllo endogeno dell'amplificazione.

**$\beta$ casT2:** CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

**$\beta$ casT3:** TTGTTCCAGCTTGGAGACCC

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
61°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
60°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
59°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x4 cicli
58°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x25 cicli
57°C	30 sec	
72°C	5 min	
72°C	5 min	

➤ Western blot

Per quanto riguarda le cellule ES  $\beta$ -loxTK<sup>-rev</sup>/p53<sup>rev</sup>, esse sono state analizzate anche per l'espressione della proteina p53 mediante Western blot, come sopra.

Le cellule vengono bollite nella soluzione di lisi (1% SDS; 10% glicerolo; 10%  $\beta$ -mercaptoetanolo; 40 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,001% blu di bromofenolo) e tali lisati proteici vengono poi caricati su due gel di acrilammide al 10% (SDS-PAGE) in parallelo. Le proteine sono successivamente trasferite dal gel mediante "elettroblotting" su membrana PVDF. I filtri infine sono incubati uno con l'anticorpo anti- $\beta$ actina, come controllo endogeno dell'avvenuto trasferimento delle proteine, mentre per l'altro abbiamo usato l'anticorpo anti-p53, specifico per la nostra analisi. La rilevazione del segnale viene eseguita mediante BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) – Roche -.

### 3.2 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO siRNA

Il secondo tipo di selettore negativo che abbiamo pensato di utilizzare per la “positive-negative selection” è il siRNA (Short Interfering RNAs). A questo proposito, abbiamo allestito, come sopra, un vettore di ricombinazione per la  $\beta$ -caseina murina, comprendente, come selettore positivo fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, il gene di fusione HyTk, e all'esterno delle regioni di omologia per la  $\beta$ -caseina, una cassetta di espressione codificante siRNA in grado di catalizzare la degradazione del trascritto del gene HyTk o di interferire con il processo di traduzione dello stesso ( $\beta$ cas-HyTk/siRNA).

In parallelo, dopo aver allestito lo scheletro per i vettori di ricombinazione aventi come bersaglio la  $\beta$ -lattoglobulina bovina, abbiamo completato anche questo plasmide con il medesimo schema PNS, Hytk-selettore positivo e siRNA-selettore negativo (BLG-HyTk/siRNA).

#### 3.2.1 Disegno degli oligonucleotidi

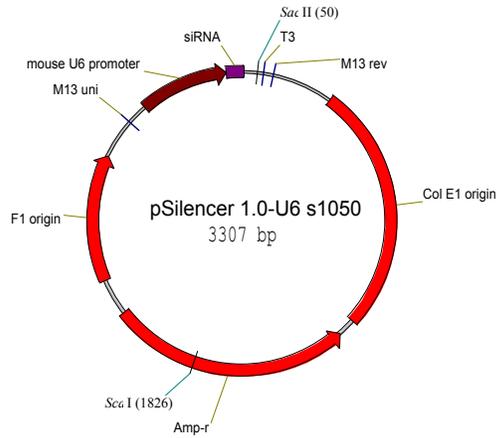
Le sequenze bersaglio S95 e S1050 all'interno del gene HyTk sono state scelte tramite i programmi “siRNA Target Finder” ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)) e EMBOSS siRNA.

Tali sequenze sono state poi inserite nel programma “Insert Design Tool for the *pSilencer*<sup>TM</sup> Vectors” ([http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer\\_converter.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html)) e abbiamo così ottenuto la mappa del vettore *pSilencer* 1.0 – U6 per il clonaggio dei nostri siRNA.

Il filamento “forward” del siRNA è costituito dalla sequenza senso della regione bersaglio, da uno spaziatore di 9 nucleotidi (TTCAAGAGA), dalla sequenza antisense e da una coda di 5 o 6 timine. La lunghezza finale è di 55 nucleotidi. Al filamento “reverse” vengono aggiunti 4 nucleotidi non appaiati ad entrambe le estremità (AATT)/(GGCC) per ottenere i siti di restrizione *EcoRI* e *ApaI* per facilitare il clonaggio all'interno del vettore. La trascrizione di questa sequenza genera così una struttura a forcina in cui la regione senso e antisense della sequenza bersaglio si appaiano.

#### 3.2.2 Allestimento del vettore di ricombinazione $\beta$ cas-HyTk/siRNA

I due filamenti del siRNA “forward” e “reverse” sintetizzati (Sigma-Genosys) sono stati appaiati in Annealing Buffer (100 mM acetato di potassio; 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4; 2 mM acetato di magnesio) a 90°C per 3 minuti e successivamente incubati a 37°C per 1 ora. I due inserti sono stati poi fosforilati tramite T4 PNK (T4 polinucleotide chinasi - USB) e legati al vettore *pSilencer* 1.0 – U6 digerito con enzimi *ApaI/EcoRI* (*pSilencer* 1.0 – U6 S95, *pSilencer* 1.0 – U6 S1050\_18 e *pSilencer* 1.0 – U6 S1050\_20), che presentava una delezione di un nucleotide a livello della sequenza antisense).



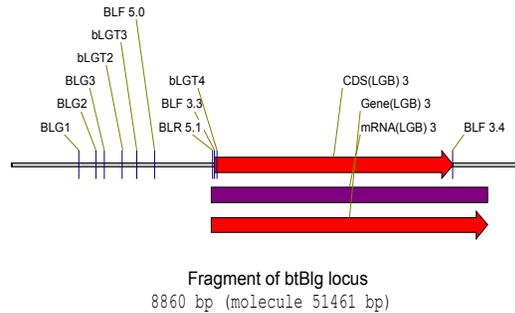
**Fig. 3.5**  
siRNA clonati nel vettore *pSilencer* 1.0 – U6

Le prime prove sono state eseguite partendo dal costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup> (vedi sopra), che presenta il gene di fusione HyTk all'interno della regione di omologia per la  $\beta$ -caseina murina e si è inserito come selettore negativo esterno la cassetta di espressione del *pSilencer* 1.0-U6 s1050\_18 codificante siRNA in grado di silenziare l'HyTk, che da esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio sembrava essere quello con attività di silenziamento più marcata ( $\beta$ cas-HyTk/siRNA).

### 3.2.3 Allestimento del vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA

Abbiamo successivamente allestito lo scheletro del vettore destinato alla ricombinazione omologa del gene della  $\beta$ -lattoglobulina (BLG) bovina, bersaglio di questa ricerca.

Le sequenze di omologia della BLG sono state ottenute tramite amplificazione del gene a partire dal DNA genomico bovino.



**Fig. 3.6**  
Frammento del locus della  $\beta$ -lattoglobulina bovina

#### 3.2.3.1 Regione 3'BLG

##### ➤ PCR

Per quanto riguarda la porzione 3'BLG (4129 pb), abbiamo disegnato, sempre mediante programma VectorNTI, i primer

**BLF 3.3:** ATGAAGTGCCTCCTGCTTGCC

**BLF 3.4:** GGCTCACCTAGATGTGGCACTG

Per eseguire la reazione abbiamo preparato due miscele, di cui la seconda con la DNA polimerasi viene aggiunta a caldo (HotStart), per ridurre gli eventuali amplificati aspecifici. Come DNA polimerasi abbiamo utilizzato Expand Long Template PCR system (Roche), che serve per amplificare lunghi frammenti di DNA che devono essere clonati in vettori con alta fedeltà di sequenza.

Il ciclo utilizzato è il seguente, su termociclatore Hybaid PCR-Sprint:

95°C	2 min	
95°C	15 sec	x 35 cicli
57°C	30 sec	
68°C	5 min	
68°C	7 min	

La reazione di PCR viene controllata su gel d'agarosio allo 0,7%.

### ➤ Purificazione di DNA da gel (gene-clean)

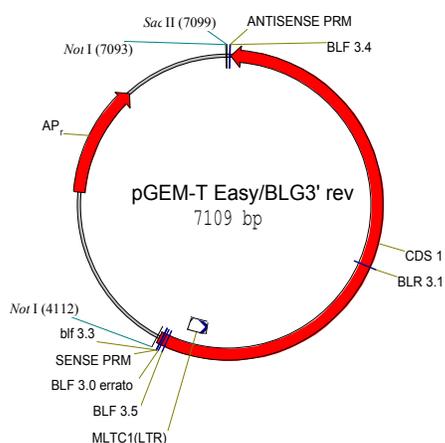
La reazione di PCR, oltre a generare la banda attesa, dava una serie di amplificati aspecifici: per questo motivo, abbiamo isolato da gel d'agarosio solo la banda di nostro interesse.

L'intero volume di reazione di PCR viene caricato in un pozzetto di un gel d'agarosio allo 0,7%. In seguito a corsa elettroforetica, si procede all'individuazione della banda d'interesse su transilluminatore. Si ritaglia con il bisturi il frammento di gel contenente la nostra banda, trasferendolo poi in una provetta da 2 ml.

Fatto ciò, si pesa il frammento di gel sulla bilancia di precisione e si procede usando il kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel) secondo protocollo.

### ➤ Ligazione

L'amplificato 3'BLG (BLF 3.3+BLF 3.4) è stato clonato poi nel vettore pGEM-T Easy (Promega) secondo protocollo e abbiamo ottenuto il plasmide pGEM-T Easy/BLG3'rev.



**Fig. 3.7**

Regione di omologia 3'BLG clonata nel vettore pGEM-T Easy

### 3.2.3.2 Regione 5'BLG

#### ➤ PCR

Per quanto riguarda invece la regione 5'BLG (1023 pb), abbiamo usato i primer

**BLF 5.0:** TGTTCCCCTACCCAGTACGCC

**BLR 5.1:** CAGCTGGGGTCACGCTTCTGAG

Per eseguire la reazione abbiamo preparato nuovamente due miscele, di cui la seconda viene aggiunta a caldo (HotStart) con Taq DNA polimerasi (Promega).  
 Il ciclo utilizzato è il seguente, su termociclatore Hybaid PCR-Sprint:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 35 cicli
58°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

La reazione di PCR viene controllata su gel d'agarosio allo 0,7% e precipitata.

➤ Trattamento della reazione di PCR con Pfu

Il trattamento con Pfu DNA polimerasi (Promega) è necessario per sequenze genomiche che devono essere clonate in vettori con alta fedeltà di sequenza: si tratta infatti di una DNA polimerasi con attività di correzione (proofreading). In questo caso, non abbiamo potuto usare direttamente la miscela Expand High Fidelity della Roche per amplificare la regione 5'BLG, perché mostrava bassa efficienza di polimerizzazione. Quindi abbiamo trattato la reazione di PCR, eseguita con Taq DNA polimerasi Promega e precipitata, con la Pfu DNA polimerasi secondo protocollo, incubandola a 37°C per 30 minuti.

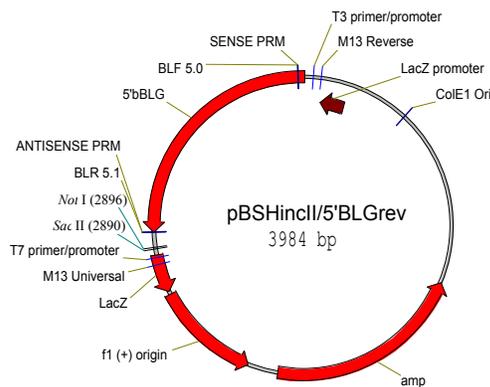
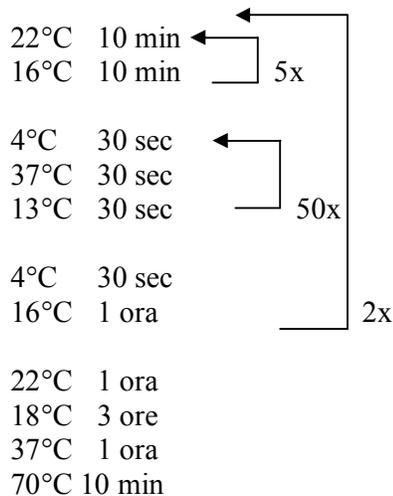
➤ Ligazione

Il frammento di PCR della regione 5'BLG, trattato con Pfu DNA polimerasi, è stato clonato nel vettore pBlueScript (pBS), che contiene la resistenza all'ampicillina e il gene lacZ che permette lo "screening" colorimetrico bianco/blu, mediante l'enzima T4 DNA ligasi (USB).

Il pBS è stato digerito con l'enzima *HincII*, che genera estremità piatte, e successivamente abbiamo eseguito una restrizione-ligazione, cercando di tenere aperto con *HincII* il vettore, al fine di ottenere il costrutto pBS*HincII*/BLG5'rev:

PBS <i>HincII</i>	1 µl
PCR	4,4 µl
Buffer OnePhorAll 10x	1 µl
DTT 1 mM	1 µl
ATP 1 mM	1 µl
BSA 20x	0,5 µl
<i>HincII</i> (50U/µl)	0,1 µl
T4 DNA ligasi (5U/µl)	1 µl
<hr/>	
V <sub>f</sub>	10 µl

La reazione è stata eseguita su termociclatore con il seguente ciclo:



**Fig. 3.8**  
Regione di omologia 5'BLG clonata nel vettore pBS

➤ Trasformazione di cellule di *E. coli* competenti (DH5α) e identificazione di colonie positive

Entrambe le reazioni di ligazione (3'BLG + pGEM-T Easy e 5'BLG + pBS) vengono poi utilizzate per trasformare cellule di *E. coli* chemiocompetenti, cioè che permettono l'incorporazione di plasmidi, mediante shock termico. Le cellule trasformate vengono piastrate a varie diluizioni su LB-agar (terreno LB con 15 g/l di polvere di agar) addizionato con 50 µg/ml ampicillina. Le piastre vengono incubate per circa 16 ore a 37°C.

Il giorno successivo le colonie batteriche cresciute vengono inoculate in 3 ml di terreno LB addizionato con ampicillina e incubate per circa 16 ore a 37°C in incubatore a secco in agitazione. Si effettua poi un'estrazione di DNA plasmidico (miniprep).

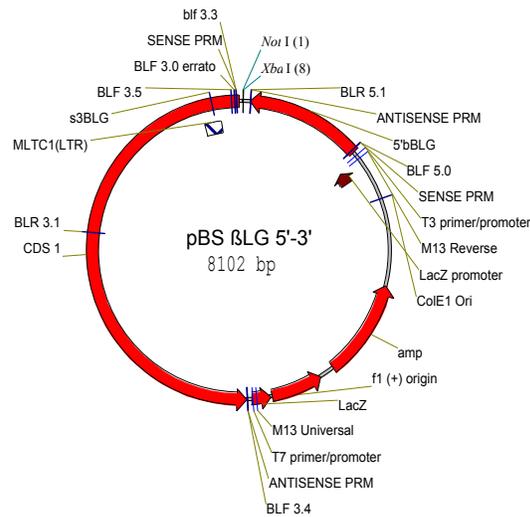
Una volta estratto il plasmide da ogni inoculo allestito, si procede all'analisi mediante enzimi di restrizione. Gli enzimi da utilizzare vengono scelti studiando le mappe di restrizione dei nostri costrutti mediante programma Vector NTI.

Le restrizioni vengono poi controllate mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Identificati i cloni positivi, si allestiscono stock al glicerolo in Cryo-vial (Nalgene) conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3.3 Plasmide pBS $\beta\text{LG}$ 5'-3'

Successivamente abbiamo legato con enzima T4 DNA ligasi il plasmide pBS*HincII*/5' $\beta\text{LG}$ rev digerito *SacII* / *NotI* e purificato con il vettore pGEM-T Easy/ $\beta\text{LG}$ 3'rev digerito anch'esso *SacII* / *NotI* ed estratto da gel d'agarosio. Abbiamo così ottenuto il costrutto pBS  $\beta\text{LG}$  5'-3'.

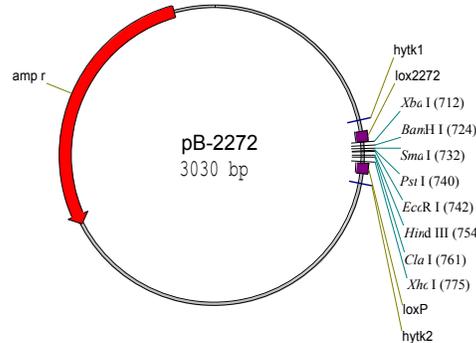


**Fig. 3.9**  
Plasmide derivante dalla ligazione delle regioni di omologia 3' $\beta\text{LG}$  e 5' $\beta\text{LG}$

### 3.2.3.4 Plasmide pBSXba2272

Per l'allestimento di questo costrutto, siamo partiti dal plasmide pB2272 fornitoci dal prof. Kolb, che contiene un sito di policlonaggio fiancheggiato da un sito *loxP* e da un segnale *lox* mutato (*lox2272*).

Su questo plasmide abbiamo disegnato due primer che amplificassero tale sito di policlonaggio, compresi i segnali *lox*, e in modo da creare alle estremità del frammento amplificato due siti di riconoscimento per l'enzima di restrizione *XbaI*.



**Fig. 3.10**  
Plasmide pB-2272 fornitoci dal prof. Kolb

Prima di eseguire la PCR, abbiamo eliminato il sito *XbaI* dal vettore pB2272.

Per questo motivo, abbiamo digerito il plasmide con *XbaI* e l'abbiamo trattato con il frammento Klenow (USB), prodotto proteolitico della DNA polimerasi I di *E. coli* che mantiene attività polimerasica 3' → 5', presenta bassa attività esonucleasica 3' → 5' e ha perso l'attività esonucleasica 5' → 3'.

Il plasmide così trattato è stato purificato mediante fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

A questo punto abbiamo legato nuovamente il plasmide e trasformato con esso cellule competenti di *E. coli* per ottenere il nuovo costrutto pB2272 delecto *XbaI* (pB2272del*XbaI*).

I primer utilizzati per la reazione di PCR sul plasmide pB2272del*XbaI* sono:

**hytk1:** TATCTAGAATAGGGCGAATTGGAGCTC

**hytk2:** ATTCTAGAAGCTCGGAATTAACCCTC

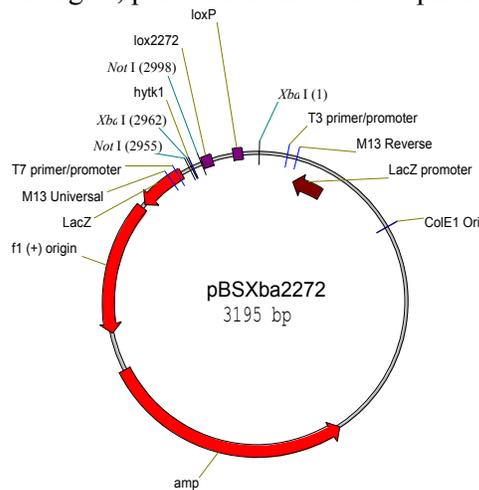
La reazione è stata eseguita usando come DNA polimerasi termostabile Expand High Fidelity (Roche) con il seguente ciclo:

94°C	2 min		
94°C	15 sec		x2 cicli
64°C	30 sec		
68°C	1 min		
94°C	15 sec		x2 cicli
63°C	30 sec		
68°C	1 min		
94°C	15 sec		x2 cicli
62°C	30 sec		
68°C	1 min		
94°C	15 sec		x4 cicli
61°C	30 sec		
68°C	1 min		
94°C	15 sec		x25 cicli
60°C	30 sec		
68°C	1 min+5 sec/ciclo		
72°C	5 min		

La reazione di PCR (pB2272-PCR di 225 pb) è stata poi purificata mediante kit Wizard DNA Clean-up (Promega), digerita con enzima di restrizione *Xba*I, nuovamente purificata con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitata.

In parallelo abbiamo digerito con *Xba*I il vettore pBlueScript, purificato mediante fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

A questo punto vettore (pBS // *Xba*I) e inserto (pB2272-PCR // *Xba*I) sono stati legati grazie all'enzima T4 DNA ligasi, per ottenere il costrutto pBS*Xba*2272.



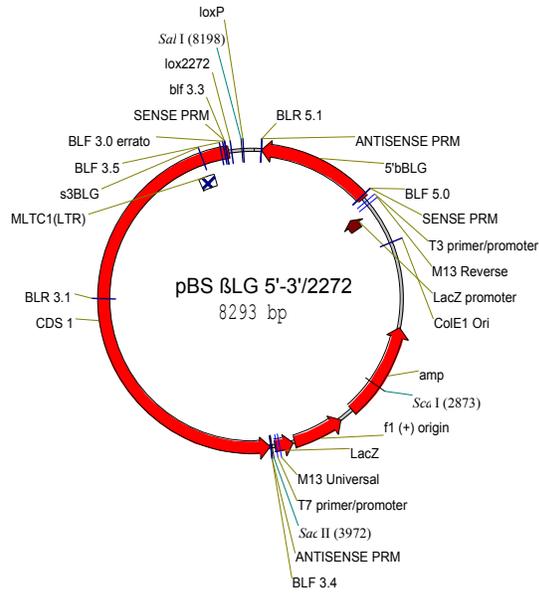
**Fig. 3.11**

Costrutto derivato dal clonaggio della PCR, eseguita con primer hytk1+hytk2 sul plasmide pB2272 di Kolb, nel vettore pBS

### 3.2.3.5 Plasmide pBS $\beta$ LG 5'-3'/2272

Abbiamo infine legato il vettore pBS  $\beta$ LG 5'-3' digerito *XbaI* // *NotI* purificato con il plasmide pBS*Xba*2272 digerito anch'esso *XbaI* // *NotI* ed estratto da gel d'agarosio, con l'enzima T4 DNA ligasi.

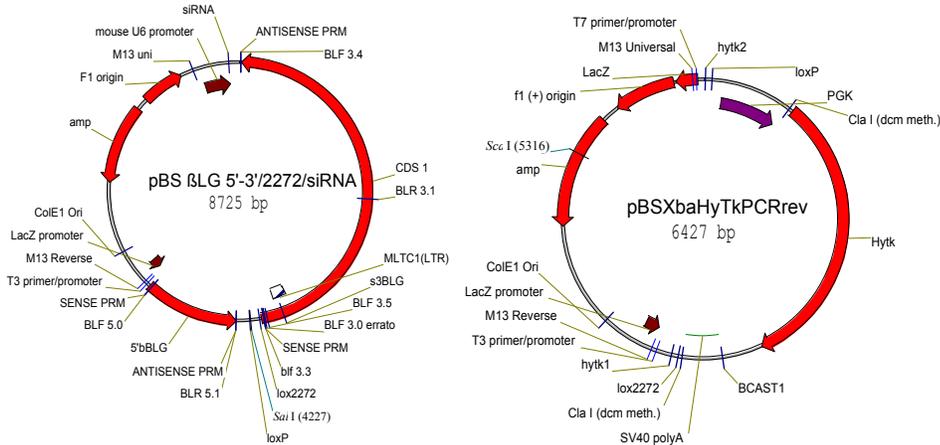
Abbiamo così ottenuto lo scheletro del nostro vettore di ricombinazione finale pBS  $\beta$ LG 5'-3'/2272, con un sito di policonnessione fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, posizionato tra le due regioni di omologia della  $\beta$ -lattoglobulina bovina (BLG5' e BLG3').



**Fig. 3.12**  
Scheletro plasmidico dei vettori di ricombinazione aventi come bersaglio il locus della  $\beta$ -lattoglobulina bovina

### 3.2.3.6 Inserimento del selettore negativo siRNA e del selettore positivo HyTk

Il selettore esterno *pSilencer* 1.0-U6 s1050\_18 è stato clonato *ScaI* // *SacII* in pBS  $\beta$ LG 5'-3'/2272 (pBS  $\beta$ LG 5'-3'/2272/siRNA).



**Fig. 3.13**

Plasmidi utilizzati nella reazione di scambio mediante Cre ricombinasi in vitro, per inserire il gene di fusione HyTk all'interno dei *lox* del vettore di sinistra

Infine il gene di fusione HyTk (selettore positivo) è stato inserito tra i due *lox* mediante una reazione di scambio mediata dalla ricombinasi Cre in vitro (BioLabs): a questo proposito, abbiamo digerito pBS  $\beta$ LG 5'-3'/2272/siRNA con *SaI* (enzima che linearizza nel sito di policlonaggio tra i *lox*) e pBSXbaHyTkPCRrev (pBS con HyTk fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, sintetizzato come pBSXba2272 sopra, solo amplificando un plasmide che all'interno dei *lox*, al posto del sito di policlonaggio, presentava il gene HyTk) con *ScaI* (che linearizza all'esterno dei siti *lox*). Con questi due plasmidi abbiamo eseguito lo scambio Cre-mediato:

pBS $\beta$ LG 5'-3'/2272/siRNA // <i>SaI</i>	200 ng
pBSXbaHyTkPCRrev // <i>ScaI</i>	200 ng
buffer 10x	2,5 $\mu$ l
Cre recombinase (1U/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	a vol.
<hr/>	
V <sub>f</sub>	25 $\mu$ l

Abbiamo successivamente defosforilato il tutto con fosfatasi SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – USB), purificato la reazione e con essa trasformato cellule competenti di *E. coli*.

Abbiamo così ottenuto il vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA, avente come bersaglio la  $\beta$ -lattoglobulina bovina.

### 3.2.4 Colture cellulari e trasfezioni

Per quanto riguarda il costrutto  $\beta$ cas-HyTk/siRNA con regioni di omologia per la  $\beta$ -caseina murina, è stato sperimentato in cellule embrionali staminali murine (cellule ES). Queste cellule vengono coltivate su feeder di fibroblasti embrionali murini (MEF) inattivati con Mitomicina C (Sigma) in DMEM High Glucose con l'aggiunta di 15% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutammina, 50  $\mu$ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomicina, 0,1 mM aminoacidi non essenziali (tutto Euroclone), 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanolo e 1 mM piruvato di sodio (entrambi Sigma). Durante la selezione dopo la trasfezione, le cellule staminali sono state coltivate in piastre con uno strato di 0,1% (w/v) gelatina (Bovine skin, type B; Sigma Chemical Co.) nel terreno descritto sopra con l'aggiunta di 1000 U/ml di LIF (Leukemia Inhibitory Factor – ESGRO).

I plasmidi  $\beta$ cas-HyTk/siRNA e  $\beta$ cas-HyTk (identico a  $\beta$ cas-HyTk/siRNA, ma privo di selettore negativo) sono stati purificati mediante un kit commerciale (Plasmid Minikit; Qiagen), linearizzati rispettivamente con l'enzima di restrizione *ScaI* e *MluI*, lavati con un volume di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitati.

La trasfezione è stata eseguita mediante FuGENE6<sup>TM</sup> (Roche) come descritto nei protocolli, utilizzando 1  $\mu$ g di DNA e 3  $\mu$ l di FuGENE6<sup>TM</sup> per cellule seminate in piastre con diametro di 60 mm.

Dopo 48 ore, le cellule staminali embrionali murine sono state selezionate in terreno completo con 100  $\mu$ g/ml di igromicina B (Roche) e in parallelo con 300  $\mu$ g/ml di G418 (Calbiochem) per 14 giorni.

I cloni sopravvissuti di cellule ES sono stati isolati come già descritto sopra, e riespansi.

Il costrutto BLG-HyTk/siRNA invece è stato trasfettato in fibroblasti bovini (sia adulti che fetali): essi vengono coltivati in terreno DMEM/199 1:1 con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutammina, 50  $\mu$ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomicina e 2,5  $\mu$ g/ml anfotericina B (tutto Euroclone).

Il vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA è stato purificato con Plasmid Minikit (Qiagen) come descritto nei protocolli, linearizzato con l'enzima di restrizione *ScaI*, lavato con un volume di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

I fibroblasti bovini sono stati trasfettati con Effectene (Qiagen), che dava una resa più alta con questo tipo di cellule rispetto al FuGENE6<sup>TM</sup>. Abbiamo utilizzato 3  $\mu$ g di DNA e 30  $\mu$ l di Effectene per cellule seminate in piastre da 100 mm di diametro.

Dopo 48 ore, i fibroblasti bovini sono stati selezionati in terreno completo con 300  $\mu$ g/ml di igromicina B per 14 giorni.

Per isolare i cloni sopravvissuti di fibroblasti, essendo molto più delicati rispetto ai cloni di cellule ES, abbiamo usato dischi di carta sterili di 5 mm di diametro (Cloning Discs, Sigma-Aldrich). Dopo aver individuato e segnato i cloni al microscopio, si lava la piastra con PBS e si posizionano i dischetti imbevuti di tripsina. Dopo circa 5-6 minuti, si recuperano i dischetti con una pinza sterile, controllando l'avvenuto distacco delle cellule, e si trasferiscono in piastre da 24 pozzetti con terreno privo di selezione. Se le colonie sono molto grandi, si cerca di recuperare le cellule rimanenti con un altro dischetto, osservandole al microscopio. Il giorno successivo, si tolgono i dischetti e si ricomincia con la selezione delle cellule fino al 14° giorno.

In entrambi i casi per le analisi di PCR, si è effettuata una lisi cellulare seguendo un protocollo denominato HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris), che, a differenza del sistema con PBNB, risulta più rapido e non utilizza proteinasi K. Esso consiste in una lisi alcalina (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) per 30 minuti a 95°C. Le cellule vengono poi raffreddate a 4°C per 10 minuti e infine si aggiunge la soluzione di neutralizzazione (40 mM Tris-HCl).

### 3.2.5 Analisi

#### 3.2.5.1 Cellule ES trasfettate col costrutto $\beta$ cas-HyTk/siRNA

##### ➤ PCR

I lisati dei cloni cellulari isolati sono stati analizzati mediante PCR.

Nel caso delle cellule staminali embrionali murine, i primer utilizzati sono  $\beta$ -casT1 e  $\beta$ -casT2, come per le HC11 sopra e con lo stesso ciclo

**$\beta$ casT1:** GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

**$\beta$ casT2:** CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

I cloni sono stati analizzati anche tramite i primer  $\beta$ -casT2 e  $\beta$ -casT3, che si trovano entrambi su sequenze della  $\beta$ -caseina endogena assenti nel vettore utilizzato per la trasfezione. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1097 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4507 pb).

**$\beta$ casT2:** CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

**$\beta$ casT3:** TTGTTCCAGCTTGGAGACCC

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il ciclo già riportato sopra.

##### ➤ Colorazione con Giemsa e conta del numero di cloni

Per quanto riguarda le prove per la valutazione dell'efficacia del siRNA, i cloni di cellule ES murine che dovevano essere contati, sono stati fissati in metanolo per 15 minuti e poi colorati con Giemsa. I cloni sono stati successivamente contati con il programma Kodak 1D.

### 3.2.5.2 Fibroblasti bovini trasfettati col costrutto BLG-HyTk/siRNA

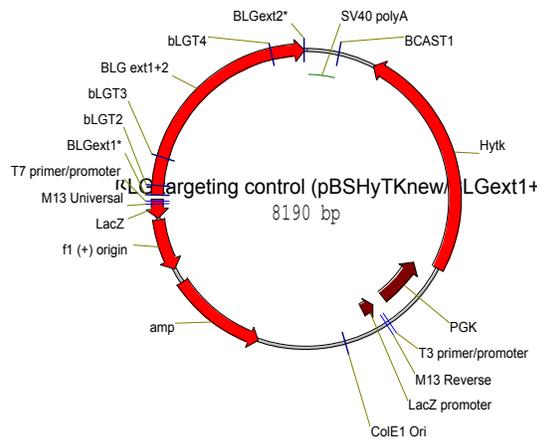
#### ➤ PCR

Per analizzare i lisati di fibroblasti bovini abbiamo cercato inizialmente di mettere a punto una PCR con primer  $\beta$ casT1 e bLGT2 su un plasmide controllo BLG targeting control

**$\beta$ casT1:** GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

**bLGT2:** AAGGACACCGGACATAAGATTAGC

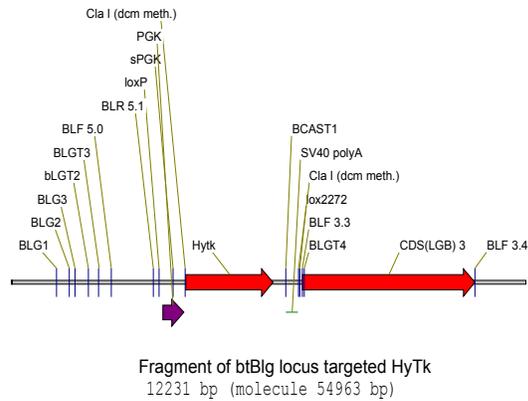
Il primo primer si appaia ad una regione del selettore positivo HyTk (vedi sopra), mentre il secondo lega una regione della  $\beta$ -lattoglobulina bovina non compresa nel vettore di ricombinazione.



**Fig. 3.14**

Plasmide controllo per la reazione di PCR con primer  $\beta$ casT1 + bLGT2

Tuttavia, essendo una PCR piuttosto difficoltosa a causa probabilmente dei primer, abbiamo deciso di analizzare i lisati di fibroblasti bovini mediante primer BLGT3 e BLGT4, entrambi disegnati su sequenze della  $\beta$ -lattoglobulina bovina, di cui il primo si appaia ad una regione compresa nel vettore di ricombinazione, mentre il secondo si trova all'esterno. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1395 pb), fornendo così automaticamente anche un controllo endogeno dell'amplificazione, e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4897 pb).



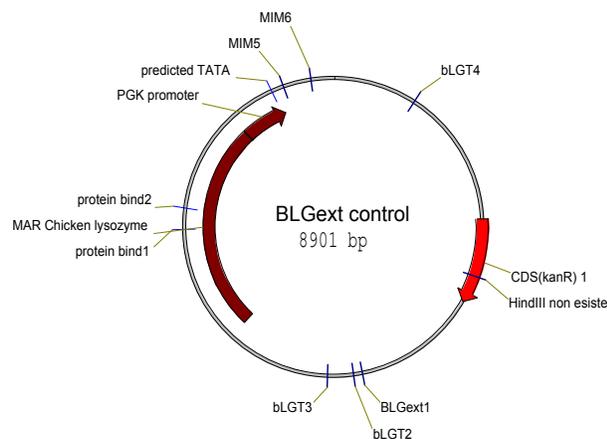
**Fig. 3.15**

Ipotetico locus della  $\beta$ -lattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-HyTk/siRNA

**BLGT3** CAGATCAGGGCAAGGACCGAAG

**BLGT4** TCTGGGTGACAATGAGGGCCTG

Per avere un controllo positivo della reazione di PCR è stato realizzato un costrutto (BLGext control) che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che dia un amplificato di dimensioni simili (5216 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto "gene-targeting", in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica.



**Fig. 3.16**

Plasmide controllo per la reazione di PCR con primer BLGT3 e BLGT4

L'amplificazione si è ottenuta con una miscela di Taq DNA polimerasi e GoTaq Green MasterMix (entrambe Promega), che contiene già nucleotidi e magnesio e un colorante/addensante, che permette il caricamento diretto della reazione su gel d'agarosio per l'elettroforesi di controllo.

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 35 cicli
66°C	30 sec	
72°C	6 min	
59°C	5 min	
95°C	30 sec	x 10 cicli
66°C	30 sec	
72°C	6 min	
72°C	7 min	

*Esempio di reazione per PCR BLGT3+BLGT4:*

DNA lisato	1 µl
GoTaq Green MasterMix 2x	10,5 µl
Taq DNA polimerasi (5 U/µl)	0,2 µl
Primer BLGT3+BLGT4 (25 µM ciascuno)	0,8 µl
H <sub>2</sub> O	8,5 µl
	<hr/>
V <sub>f</sub>	21 µl

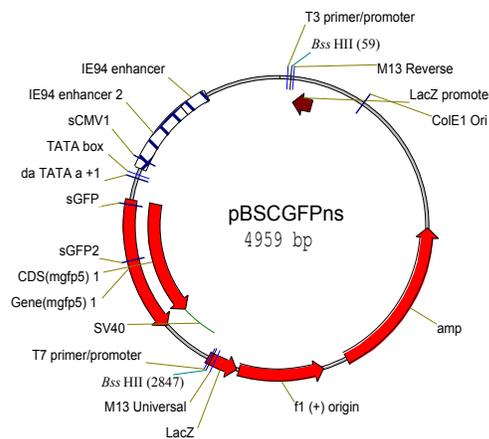
### 3.3 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO GFP

#### 3.3.1 CMV-GFP

##### 3.3.1.1 Sintesi del costrutto e trasfezione in HC11

Come sopra, il costrutto di partenza da noi utilizzato è il pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk fornitoci dal prof. Andreas Kolb, che presenta il gene di fusione HyTk (che conferisce resistenza all'igromicina e sensibilità al gancyclovir) all'interno della regione di omologia per la  $\beta$ -caseina murina e un ulteriore TK come selettore negativo all'esterno di tale cassetta. Dopo aver eliminato il TK esterno e alcuni siti di restrizione, si è inserito come selettore esterno una cassetta d'espressione per la GFP (Green Fluorescent Protein) ( $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup>).

L'eliminazione del TK esterno ( $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup> e  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>) è stata realizzata ligando tra loro i frammenti pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk // *Bss*HIII+*Mlu*I e pBK- $\beta$ cas-2272-hytk-P-tk // *Mlu*I. Il marcatore per la selezione negativa è stato ottenuto digerendo enzimaticamente il plasmide pBSCGFPns con *Bss*HIII. Quest'ultimo poi è stato rilegato al vettore  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup> // *Mlu*I, ottenendo così il costrutto finale  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup>.



**Fig. 3.17**

Plasmide da cui è stata estratta la cassetta di selezione negativa GFP.

Il vettore di ricombinazione  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup> è stato poi estratto con Plasmid Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo, linearizzato mediante l'enzima *Sfi*I, purificato con fenolo/cloroformio e precipitato con etanolo.

Il DNA così preparato è stato utilizzato per l'allestimento delle trasfezioni in HC11 come nel paragrafo 3.1.3. In seguito a trasfezione, quando i cloni in selezione sono ben identificabili ed ancora ben separati tra loro, si posiziona una griglia numerata sul fondo della piastra e si procede alla localizzazione di tutti i cloni presenti. Successivamente si identificano i cloni che si presentano fluorescenti al microscopio con filtri per l'epifluorescenza, per escluderli dalla procedura d'isolamento: infatti in questo caso le cellule fluorescenti, non avendo perso il selettore negativo GFP, sono andate sicuramente incontro ad un processo di ricombinazione casuale e non hanno subito l'evento di "gene-targeting". I cloni non fluorescenti isolati sono stati lisati col metodo PBNB, controllati mediante PCR con primer GDX1 e GDX2 e analizzati con primer  $\beta$ casT1 e  $\beta$ casT2 esattamente come sopra.

### **3.3.1.2 *Analisi mediante FACS***

Per eseguire questa analisi abbiamo scongelato un isolato di HC11  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup> fluorescente, uno non fluorescente e uno con fluorescenza dubbia. Li abbiamo coltivati in RPMI completo fino al raggiungimento della confluenza in fiasche da 25 cm<sup>2</sup>. A questo punto le tre fiasche assieme ad un controllo negativo di HC11 wild-type e ad un controllo positivo di HC11 “verdi”, trasfettate in precedenza con il plasmide pBSGFP3, sono state spedite per l’analisi citofluorimetrica presso

Istituto di Medicina Molecolare A. Nocivelli  
Clinica Pediatrica  
Dipartimento Materno Infantile  
Spedali Civili di Brescia

Per eseguire l’analisi tramite FACS, le cellule sono state tripsinizzate, centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e lavate con 10 ml di PBS. Il lavaggio è stato eseguito 2 volte. Il pellet di cellule infine viene risospeso in 300  $\mu$ l di PBS e le cellule sono analizzate mediante il citofluorimetro FACScan -3 colori- (Necton Dickinson) supportato dal programma CellQuest, per valutare la fluorescenza.

### **3.3.1.3 *Analisi mediante Southern blot***

Per assicurarci che l’integrazione della GFP fosse avvenuta, a causa della bassa rilevazione del segnale, abbiamo eseguito un Southern blot. Per l’analisi abbiamo espanso due cloni isolati di HC11 trasfettate  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup> identificati come “fluorescenti” (H9 e F8) e due identificati come “non fluorescenti” (G3 e E5).

La tecnica del Southern blot serve per localizzare sequenze specifiche all’interno del DNA genomico mediante sonde marcate.

Il DNA genomico è stato digerito con enzimi di restrizione, scelti in base alla sonda utilizzata, e i frammenti risultanti sono stati separati tramite elettroforesi su gel d’agarosio. Abbiamo utilizzato un trasferimento di tipo alcalino su una membrana di nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham LIFE SCIENCE), usando NaOH 0,4 M: la soda modifica il pH e allenta i legami idrogeno presenti nella molecola di DNA. Le posizioni relative dei frammenti di DNA sono conservate durante il trasferimento sulla membrana. Il DNA legato irreversibilmente alla membrana carica positivamente, viene poi ibridato con una sonda marcata con digossigenina che localizza la posizione della banda complementare alla sonda stessa. Dopo l’ibridazione, le sonde marcate sono riconosciute da un anticorpo anti-digossigenina legato alla fosfatasi alcalina (AP), la quale defosforila il substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche), che emette luce e impressiona così la lastra fotografica.

I vantaggi dell’utilizzo di sonde non radioattive sono diversi: sono più sicure, possono essere conservate più a lungo e riutilizzate più volte.

➤ Estrazione di DNA genomico da cellule

Le HC11 giunte a confluenza nelle fiasche da 25 cm<sup>2</sup> vengono lavate e tripsinizzate. Successivamente si aggiunge RPMI completo per neutralizzare la tripsina e si centrifugano a 1000 rpm per 5 minuti.

Al pellet di cellule si aggiungono poi 500 µl di soluzione di lisi – Laird Parker buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) con 150 µg/ml di proteinasi K. Le cellule vengono incubate per una notte in questa soluzione a 55°C. Il giorno successivo, se la lisi è avvenuta in modo completo, si procede alla purificazione con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1) e precipitazione con isopropanolo. Il DNA viene poi risospeso in 100 µl di TE.

➤ Digestione del DNA genomico con *SalI*

La scelta dell'enzima dipende dalla sonda utilizzata: serve infatti un enzima che dia un frammento di dimensione nota.

Nel nostro caso abbiamo scelto *SalI* che genera un frammento di 3153 pb.

La sonda GFP, che si ibrida alla sequenza codificante, era stata precedentemente allestita nel nostro laboratorio mediante PCR e nucleotidi marcati con digossigenina, precipitata, risospesa in TE e diluita nella soluzione di preibridazione nella misura di 10-20 ng/ml.

I DNA digeriti *SalI* sono poi caricati su gel d'agarosio allo 0,7%, utilizzando come marcatore di peso molecolare 1 µl di DNA del fago λ digerito *HindIII* con 2 µl dello stesso marcato con digossigenina.

Il DNA separato tramite elettroforesi su gel d'agarosio, viene fotografato e successivamente si esegue il "blotting" sulla membrana di nylon mediante trasferimento alcalino, che richiede circa sei ore.

➤ Preibridazione e ibridazione

Al termine del trasferimento alcalino, la membrana viene incubata a 42°C in agitazione per circa 1 ora nella soluzione di preibridazione (High SDS concentration hybridization buffer: 7% SDS; 50% formamide; 5x SSC; 2% Blocking Reagent; 50 mM sodio-fosfato, pH 7; 0,1% N-lauroylsarcosine) precedentemente sciolta a 58°C: questo passaggio serve per ridurre i legami aspecifici della sonda alla membrana.

Successivamente, tolta la soluzione di preibridazione, si aggiunge la sonda, precedentemente denaturata per 10 minuti a 68°C, e si incuba così la membrana a 42°C in agitazione per una notte.

Lavaggi e rilevazione del segnale (detection)

Terminata la fase d'ibridazione, si recupera la sonda e si procede con i lavaggi e con la rilevazione del segnale secondo il manuale "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Roche).

Si prosegue poi con l'esposizione della membrana alla lastra fotografica in una cassetta di sviluppo (tutto Amersham).

Infine si sviluppa la lastra per 5 minuti in "developer buffer", la si sciacqua in acqua e la si fissa per 10 minuti in "fixer buffer" (tutto Kodak).





### 3.3.2.2 Colture cellulari e trasfezioni

I fibroblasti bovini sono stati coltivati come già detto sopra in terreno DMEM/199 1:1 con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml gentamicina e 0,1 U/ml penicillina/streptomina. Abbiamo ommesso in questi esperimenti l'antimicotico, in quanto ci siamo accorti che la crescita clonale di questo tipo cellulare veniva inibita in presenza di anfotericina.

I costrutti BLG-neo/pCXEGFP e BLG-HyTk/pCXEGFP sono stati purificati mediante un kit commerciale (NucleoBond AX 500, Macherey-Nagel), linearizzati rispettivamente con *XhoI* e *ScaI*, lavati con un volume di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico, precipitati e trasfettati nei fibroblasti bovini in parallelo con Effectene (Qiagen) o con il sistema Nucleofector™ (Amaxa biosystems).

Nel caso di trasfezione con Effectene, il giorno precedente la trasfezione, circa  $8 \cdot 10^5$  fibroblasti vengono seminati in una piastra da 100 mm di diametro. La trasfezione si esegue secondo protocollo con 2 µg di DNA e 100 µl di Effectene. Il giorno successivo alla trasfezione, i fibroblasti vengono suddivisi in 10 piastre da 150 mm di diametro per garantire cloni ben isolati tra loro.

Per quanto riguarda la trasfezione con il sistema Nucleofector™, abbiamo trasfettato circa  $10^6$  cellule con 3 µg di DNA. Le cellule sono state risospese in 100 µl di Basic Nucleofector™ Solution e ad esse abbiamo aggiunto il DNA. La miscela è stata posta in una cuvette Amaxa e la trasfezione è stata eseguita mediante il programma V-24 (messo a punto con una trasfezione transiente con il costrutto GFP fornito nel kit, che dava una resa dell'80% di cellule verdi e una mortalità del 40% dopo 6 ore dalla trasfezione). Le cellule poi sono state diluite nel loro terreno di coltura completo e seminate in una piastra da 150 mm di diametro. Il giorno successivo, esse sono state divise in 15 piastre da 150 mm di diametro.

Dopo 48 ore dalla trasfezione, i fibroblasti sono stati selezionati per 10 giorni rispettivamente in terreno completo con 300 µg/ml di igromicina B nel caso di cellule trasfettate con il costrutto BLG-HyTk/pCXEGFP e con 500 µg/ml di G418 per quelle trasfettate col plasmide BLG-neo/pCXEGFP. Dopo circa 10 giorni, i cloni sopravvissuti vengono identificati e controllati al microscopio con filtri per l'epifluorescenza per escludere dalla procedura d'isolamento quelli che risultano fluorescenti: infatti, come abbiamo già spiegato sopra, le cellule fluorescenti, non avendo perso il selettore negativo GFP, sono andate sicuramente incontro ad un processo di ricombinazione casuale e non hanno subito l'evento di "gene-targeting".

I cloni di fibroblasti vengono isolati mediante l'utilizzo di dischetti di carta imbevuti di tripsina e successivamente trasferiti in piastre da 24 pozzetti per colture cellulari (Corning) ed espansi. Al raggiungimento della confluenza, abbiamo diviso a metà il contenuto dei vari pozzetti in 2 piastre da 24. Abbiamo fatto espandere nuovamente le cellule e alla fine una piastra è stata utilizzata per l'estrazione del DNA, mentre l'altra è stata congelata a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.3.2.3 *Analisi dei cloni isolati*

#### ➤ PCR

Il DNA è stato estratto incubando i pellet dei vari fibroblasti bovini isolati nel tampone Laird-Parker (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) con l'aggiunta di 300 µg/ml di Proteinasi K a 55°C per 16 ore. I lisati cellulari sono stati poi lavati con 1 vol. di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico. I DNA sono stati successivamente precipitati mediante 1 vol. di isopropanolo ed infine lavati con 70% etanolo, asciugati e risospesi in 20 µl del tampone TE.

I DNA delle cellule trasfettate con il vettore BLG-HyTk/pCXEGFP sono stati analizzati mediante PCR eseguita con i primer BLGT3 e BLGT4: il primo si appaia a una sequenza della β-lattoglobulina endogena situata sul genoma bovino più all'esterno delle regioni di omologia contenute nei costrutti da noi allestiti, e quindi assente nei vettori utilizzati per la trasfezione, e il secondo si appaia invece ad una sequenza contenuta nella regione 3' della β-lattoglobulina compresa nei costrutti. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa sull'allele che ha subito l'evento di ricombinazione omologa col vettore di ricombinazione (4897 pb) e l'allele/gli alleli wild-type (1395 pb).

**BLGT3**      CAGATCAGGGCAAGGACCGAAG

**BLGT4**      TCTGGGTGACAATGAGGGCCTG

Il ciclo utilizzato su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) è lo stesso già descritto sopra.

Per quanto riguarda invece fibroblasti trasfettati con il vettore di ricombinazione BLG-neo/pCXEGFP, oltre ai primer BLGT3 e BLGT4 che generano sull'allele wild-type una banda di 1395 pb e sull'allele HR una banda di 3429 pb, abbiamo disegnato altri 2 primer "annidati" che si appaiano alla sequenza neo<sup>R</sup> e che generano un'ulteriore banda solo nel caso di avvenuto evento di ricombinazione omologa (1838 pb per BLGT3+BLGT4+NEO1 o 2100 pb per BLGT3+BLGT4+NEO2).

**NEO1**      ATGGAAGGATTGGAGCTACGGG

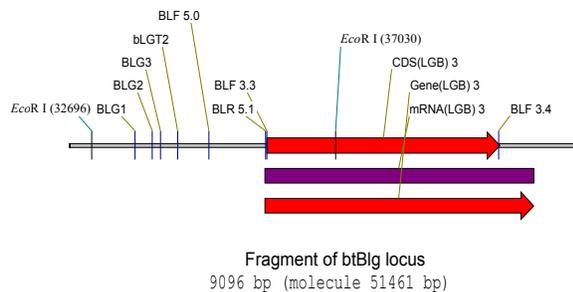
**NEO2**      AGGACATAGCGTTGGCTACCCG

Il ciclo utilizzato è lo stesso descritto sopra per i primer BLGT3 e BLGT4.

➤ Southern blot

I DNA dei vari cloni di fibroblasti bovini trasfettati coi costrutti BLG-HyTk/pCXEGFP e BLG-neo/pCXEGFP sono stati digeriti mediante l'enzima di restrizione *EcoRI*, sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,7% e trasferiti su membrana di nylon. Tale membrana è stata successivamente ibridata con la sonda BLG 1+3 new (470 pb) marcata con digossigenina. Il segnale è stato rilevato mediante anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

La sonda è stata preparata mediante PCR su DNA bovino con primer BLG1 e BLG3, situati sulla  $\beta$ -lattoglobulina bovina più all'esterno della regione 5' compresa nel nostro vettore di ricombinazione, e desossinucleotidi marcati con digossigenina.



**Fig. 3.20**

Locus parziale della  $\beta$ -lattoglobulina bovina

La reazione di PCR è stata poi precipitata e diluita nella soluzione di preibridazione.

**BLG1:** TTGCTTCTGCACTTACAGGCC

**BLG3:** TGTCAGATGCGAGAGGCTGTGC

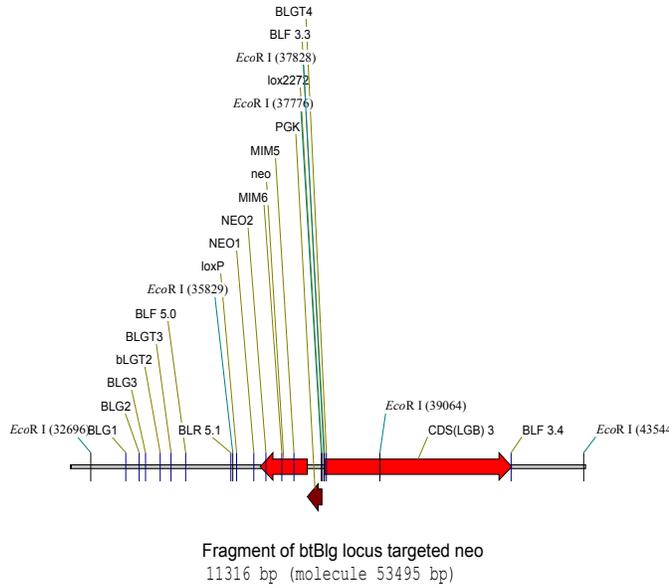
La PCR è stata realizzata su termociclatore Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

95°C 5 min

95°C 40 sec		x 35 cicli
60°C 30 sec		
72°C 45 sec		

72°C 5 min

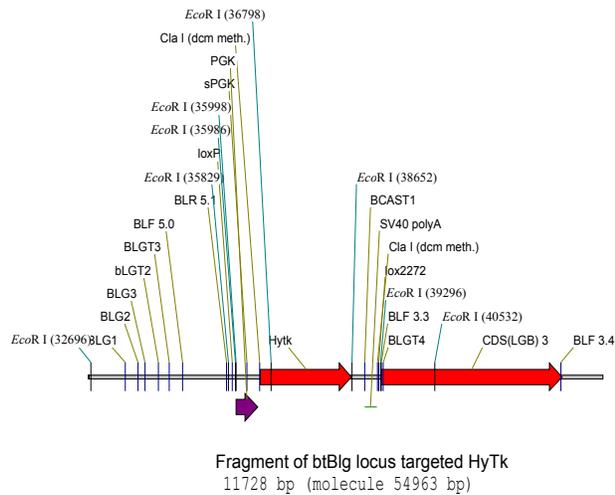
Nel caso di allele wild-type, la digestione con *EcoRI* dei DNA dei fibroblasti trasfettati e la successiva ibridazione con sonda BLG1+BLG3 determina la visualizzazione di una banda di 4334 pb.



**Fig. 3.21**

Ipotetico locus della  $\beta$ tattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-neo/pCXEGFP

Nel caso invece di ricombinazione omologa con il plasmide BLG-HyTk/pCXEGFP o BLG-neo/pCXEGFP, l'allele digerito *EcoRI* e ibridato con sonda BLG1+BLG3 genera una banda di 3133 pb.



**Fig. 3.22**

Ipotetico locus della  $\beta$ tattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-HyTk /pCXEGFP

### 3.4 ANALISI RMCE (RECOMBINASE-MEDIATED CASSETTE EXCHANGE)

Come ultimo lavoro, abbiamo voluto valutare l'efficienza di RMCE da parte della ricombinasi Cre, che, riconoscendo i siti *lox* eterospecifici (*loxP* e *lox2272*), determina lo scambio della cassetta di DNA posizionata sul cromosoma con una cassetta presente su un plasmide (entrambe fiancheggiate dai medesimi siti di riconoscimento).

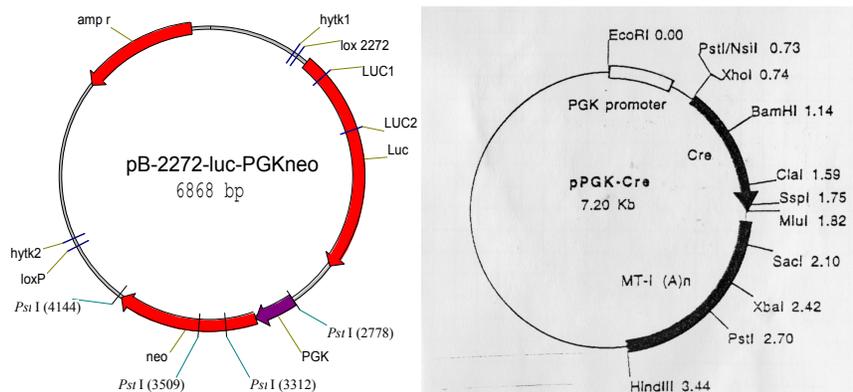
#### 3.4.1 RMCE in HC11

Per valutare l'efficienza di scambio di cassette mediato dalla ricombinasi Cre (RMCE), un isolato espanso di HC11 precedentemente trasfettate col costrutto  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup> e risultante fluorescente (F8) è stato sottoposto a cotrasfezione dei plasmidi pPGKCre e pB-2272-luc-PGKneo (precedentemente forniti da Kolb) (1  $\mu$ g ciascuno) con 3  $\mu$ l di FuGENE (Roche), secondo il protocollo. In questo modo ci aspettiamo che, sebbene il plasmide  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup> si sia integrato casualmente nelle HC11 precedentemente trasfettate, sia possibile comunque effettuare uno scambio di cassette di selezione comprese tra i *lox* (HyTk scambiato con luc-PGKneo) ad opera della ricombinasi Cre.

Il pool di HC11 è stato successivamente espanso, si è estratto il DNA con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico, precipitato con isopropanolo e digerito con l'enzima di restrizione *Pst*I. Su tale DNA tagliato abbiamo eseguito il Southern blot mediante la sonda LUC1+2 (468 pb) marcata con digossigenina, preparata con PCR sul plasmide pB-2272-luc-PGKneo con primer LUC1 e LUC2. La rilevazione del segnale è stata eseguita con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

**LUC1** CGCGGAATACTTCGAAATGTCC

**LUC2** GCCACACCCTTAGGTAACCCAG

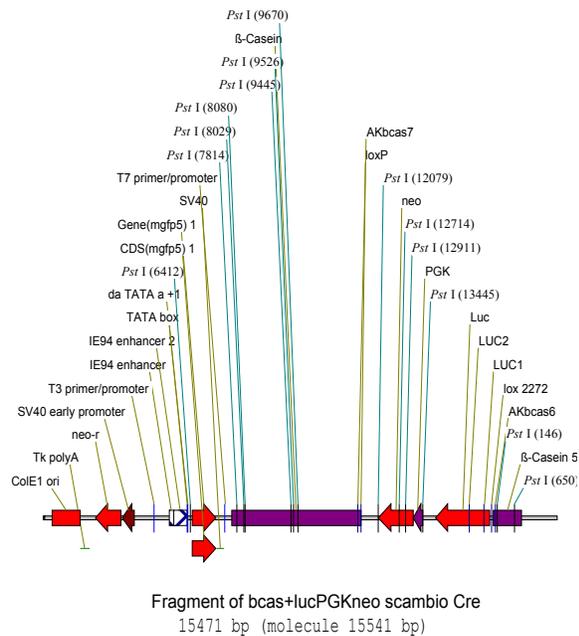


**Fig. 3.23**

Plasmidi cotrasfettati per RMCE su clone di HC11 trasfettate  $\beta$ -loxTK<sup>rev</sup>/GFP<sup>rev</sup>  
Il plasmide di sinistra è stato usato anche per la messa a punto della sonda LUC1+2

La PCR per l'allestimento della sonda è stata realizzata su termociclature Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
		x 35 cicli
72°C	5 min	



**Fig. 3.24**  
Ricostruzione dell'avvenuto scambio di cassette (RMCE)

In caso di realizzazione dello scambio di cassette, la digestione del DNA con l'enzima *PstI* e successiva ibridazione con la sonda LUC1+2 genera una banda di 2242 pb; mentre nel caso d'integrazione casuale del plasmide pB-2272-luc-PGKneo nel genoma murino, si ha una banda di 5502 pb.

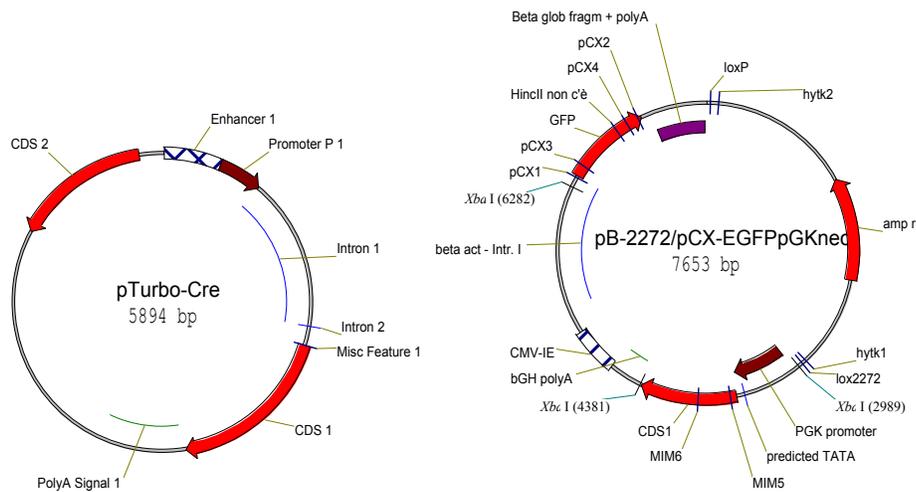
### 3.4.2 RMCE in fibroblasti bovini

Abbiamo cercato di valutare l'efficienza di RMCE anche in fibroblasti bovini. Per questo motivo, un isolato espanso di cellule precedentemente trasfettate col costrutto BLG-HyTk/siRNA è stato sottoposto a cotrasfezione dei plasmidi pTurboCre e pB2272/pCXEGFP-PGKneo (precedentemente allestito nel nostro laboratorio) (1 µg ciascuno) con 10 µl di Effectene (Qiagen), secondo il protocollo. In questo modo ci aspettiamo che, sebbene il plasmide BLG-HyTk/siRNA si sia integrato casualmente nei fibroblasti precedentemente trasfettati, sia possibile comunque effettuare uno scambio di cassette di selezione comprese tra i *lox* (HyTk scambiato con pCXEGFP-PGKneo) ad opera della ricombinasi Cre.

Il pool di fibroblasti è stato successivamente espanso, si è estratto il DNA con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico, precipitato con isopropanolo e digerito con l'enzima di restrizione *Xba*I. Su tale DNA tagliato abbiamo eseguito il Southern blot mediante la sonda pCX 3+4 (522 pb) marcata con digossigenina, preparata con PCR sul plasmide pB2272/pCXEGFP-PGKneo con primer pCX3 e pCX4. La rilevazione del segnale è stata eseguita con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

**pCX3:** TGGAGAGGGTGAAGGTGATGC

**pCX4:** TGTGTGGACAGGTAATGGTTG

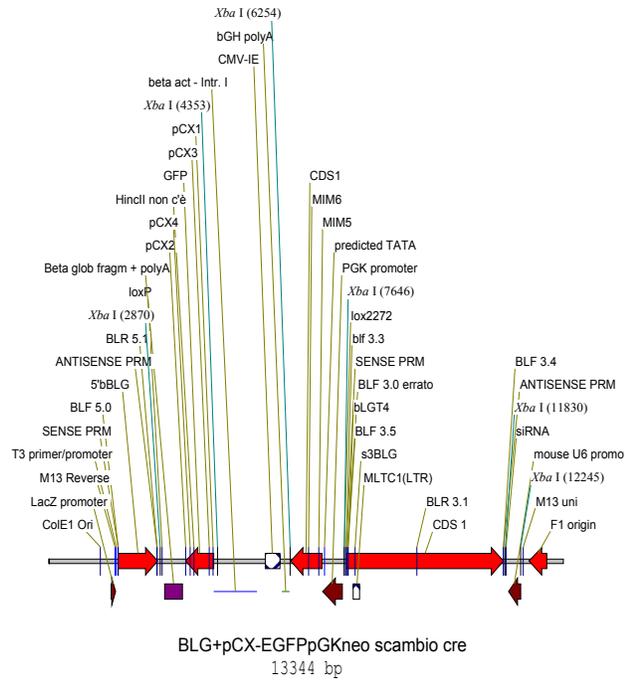


**Fig. 3.25**

Plasmidi cotrasfettati per RMCE su clone di fibroblasti trasfettati BLG-HyTk/siRNA  
 Il plasmide di destra è stato usato anche per la messa a punto della sonda pCX3+pCX4

La PCR è stata realizzata su termociclatore Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	x 40 cicli
60°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72°C	5 min	



**Fig. 3.26**  
Ricostruzione dell'avvenuto scambio di cassette (RMCE)

In caso di realizzazione dello scambio di cassette, la digestione del DNA con l'enzima *XbaI* e successiva ibridazione con la sonda pCX3+4 genera una banda di 1483 pb; mentre nel caso d'integrazione casuale del plasmide pB2272/pCXEGFP-PGKneo nel genoma bovino, si ha una banda di 4360 pb.