

# GUIDA AL



# CLONAGGIO

ED ESPRESSIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

## INTRODUZIONE

Il Clonaggio Molecolare è una tecnica che consente di inserire un frammento di DNA (inserto) in un vettore/plasmide, da introdurre in un organismo/cellula ospite, dove verrà replicato per ottenere quantità maggiori del DNA d'interesse.

Un esperimento di clonaggio richiede 2 elementi, derivati da taglio con enzimi di restrizione, PCR o assemblaggio di oligonucleotidi:

- 1) l'inserto di DNA da replicare;
- 2) un plasmide/vettore che includa tutte le componenti per la replicazione nell'organismo ospite (gene, elementi regolatori, operoni, etc).

Le estremità del frammento di DNA e del vettore devono essere compatibili per l'unione con DNA ligasi, ricombinasi o meccanismi di riparazione *In Vivo* del DNA.

## 1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE (PLASMIDE, PCR AMPLICON, cDNA SYNTHESIS)

Inserto e Vettore possono essere preparati tramite digestione con Enzimi di restrizione (RE) o PCR. Per templati ad RNA, è necessario uno step di sintesi di cDNA.

### Sintesi di cDNA

| Descrizione                                     | Codice        | Dimensione cDNA | Caratteristiche   |
|---|---------------|-----------------|---|
| ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit | BE6560        | <10 kb          | Enzima con aumentata termostabilità e ridotta attività da RNasi H                                   |
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit    | RO04379012001 | <14 kb          | Termostabile, raccomandata per templati GC-rich o con strutture secondarie                          |
| Transcriptor HiFi cDNA Synthesis Kit            | RO05081955001 | <14 kb          | RT con attività proof-reading raccomandata per templati GC-rich o low-copy (10 pg). Reazione in 10' |

### Digestione Enzimatica

Approccio tipico del clonaggio tradizionale, richiede di identificare siti di restrizione unici e corrispondenti alle estremità di inserto e vettore.

Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA in corrispondenza di specifici siti di riconoscimento con 2 diverse modalità:

- **Taglio "Blunt"** (piatto): il DNA viene tagliato sui due strand nel medesimo punto, con la formazione di estremità piatte
- **Taglio "Sticky"** protrudente: l'enzima taglia il DNA in 2 punti diversi sui due strand, con la formazione di estremità protrudenti al 3' o 5' a singolo strand (da 1 a 4 nucleotidi)

Inserto di DNA e vettore devono presentare estremità compatibili; almeno uno degli RE deve tagliare in modalità "sticky" per assicurare che venga mantenuto l'orientamento corretto.

Consultate il sito NEB per la lista completa degli enzimi di restrizione disponibili:  
<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/enzyme-finder>

## PCR

L'inserto viene prodotto in PCR, con estremità blunt o con 1 base protrudente (secondo il tipo di polimerasi utilizzato). E' possibile disegnare primer per incorporare nel frammento specifici siti di restrizione.

L'inserto generato può essere utilizzato direttamente per il clonaggio o digerito con appositi RE prima dell'inserimento nel vettore. La PCR è il primo step per PCR cloning e Gene assembly.

## DNA Polimerasi disponibili

|                             | WonderTaq | SMART     | Q5      | LongAmp Taq  |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------|--------------|
|                             | EME020001 | EME012500 | BM0491  | BM0323       |
| <b>FIDELITY vs. Taq</b>     | 1X        | >20X      | >100X   | 2X           |
| <b>Amplicon Size</b>        | ≤5kb      | ≤7kb      | ≤20kb   | ≤30kb        |
| <b>Extension Rate</b>       | 2kb/min   | 4kb/min   | 6kb/min | 1.2kb/min    |
| <b>Resulting ends</b>       | A-tail    | blunt     | blunt   | A-tail/blubt |
| <b>Routine PCR</b>          | +         | -         | +       | +            |
| <b>Colony PCR</b>           | +         | -         | -       | -            |
| <b>GC/AT-rich Targets</b>   | +         | +         | +       | +            |
| <b>Hot Start Available</b>  | yes       | no        | yes     | yes          |
| <b>Master Mix Available</b> | no        | no        | yes     | yes          |

## DNA End Modification

Le DNA ligasi richiedono un 5' monofostato all'estremità donatrice, e un gruppo 3'OH all'estremità accettrice. Le necessarie modifiche sono già presenti nei frammenti/vettori ottenuti da digestione enzimatica.

Generalmente invece gli ampliconi di PCR non presentano la fosforilazione al 5', e necessitano di trattamento con una chinasi. In alternativa è possibile lavorare con primer che presentino il 5' fosfato.

| Descrizione                  | Codice   | Caratteristiche  |
|------------------------------|----------|--|
| <b>Polynucleotide Kinase</b> | BM0201T4 | Aggiunge un gruppo fosfato all'estremità 5' di DNA ed RNA. Enzima isolato da una fonte ricombinante. |

## Defosforilazione

Consente di evitare che il vettore ricircularizzi durante la ligazione, rimuovendo il 5' fosfato dal vettore. Richiede l'impiego di un inserto fosforilato.

| Descrizione                               | Codice |
|---|--------|
| <b>Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)</b> | BM0371 |

## Blunting / End-Repair / A-tailing

Per la ligazione di vettori e inserti con estremità non compatibili, è possibile modificare le estremità da "Blunt" a "Sticky" e viceversa. Le estremità protrudenti possono essere "riempite" per polimerizzazione, o la porzione eccedente può essere tagliata. Purchè non siano interessate regioni regolatorie o codificanti, il blunting non determina effetti rilevabili. Per il "riempimento" è possibile impiegare Klenow Fragment o DNA pol I e T4 DNA pol. Per la rimozione del 5' overhang è possibile impiegare una nucleasi.

Il Tailing consente di aggiungere un nucleotide all'estremità 3' di un'estremità blunt: utilizzato nelle procedura di TA cloning (paragrafo 2) per l'inserzione di un prodotto di PCR dotato di A-tail in un T-Vector.

| Descrizione               | Codice | Caratteristiche   |
|---------------------------|--------|---|
| <b>Quick Blunting Kit</b> | BE1201 | Converte le estremità 5' e 3' overhangs del DNA in estremità blunt 5' fosforilate, utilizzando una T4 DNA pol |
| <b>Mung Bean Nuclease</b> | BM0250 | Taglia le estremità protrudenti per generare estremità compatibili con la ligazione                           |

## 2 LIGAZIONE

### LIGASI

Per completare la giunzione tra vettore e inserto, indipendentemente dal metodo di clonaggio scelto, è necessario introdurre un legame fosfodiesterico tramite DNA ligasi.

|                                 | <b>Blunt/TA<br/>Ligase MM</b><br>BM0367 | <b>T4 DNA<br/>Ligase</b><br>BM0202 | <b>Quick<br/>Ligation Kit</b><br>BM2200 | <b>T7 DNA<br/>Ligase</b><br>BM0318 |
|---------------------------------|---|------------------------------------|---|------------------------------------|
| <b>Ligation of sticky Ends</b>  | ++                                      | ++                                 | +++                                     | ++                                 |
| <b>Ligation of blunt Ends</b>   | +++                                     | ++                                 | +++                                     |                                    |
| <b>T / A cloning</b>            | +++                                     | ++                                 | ++                                      | +                                  |
| <b>Repair of Nicks in dsDNA</b> | +++                                     | +++                                | +++                                     | +++                                |
| <b>Fast ( &lt; 15 min )</b>     | Yes                                     | Yes                                | Yes                                     | Yes                                |

### PCR Cloning

È un metodo di clonaggio rapido, che prevede l'amplificazione del frammento in PCR, poi unito al vettore tramite ligazione Blunt o single-base overhang (T-A cloning), prima della trasformazione delle cellule batteriche.

Il TA cloning utilizza la singola adenina introdotta al 3' dalla Taq Polimerasi, per la ligazione alla timina, che deve essere aggiunta all'estremità del vettore. Questa tecnica è non-direzionale e quindi soggetta a errori di orientamento della sequenza.

Il PCR Cloning Kit di NEB consente il clonaggio rapido di qualsiasi amplicone, indipendentemente dalla polimerasi utilizzata: un mini-gene tossico si genera quando il vettore si richiude su se stesso e consente il clonaggio diretto dalla reazione di PCR senza purificazione.

| <b>Descrizione</b>         | <b>Codice</b> | <b>Caratteristiche</b>                  |
|----------------------------|---------------|---|
| <b>NEB PCR Cloning Kit</b> | BE1202S       | With Competent Cells NEB 10-beta E.Coli |
| <b>NEB PCR Cloning Kit</b> | BE1203S       | Without Competent Cells                 |

### DNA Assembly

Il DNA di interesse viene amplificato in PCR e un'esonucleasi digerisce uno strand dell'inserto e l'estremità del vettore. Tramite ligasi, ricombinazione o *in vivo* repair, le due estremità vengono unite con legame fosfodiesterico.

Consente di evitare segni di giunzione e di unire fino a 5-10 frammenti in una sola reazione.

La metodica è ideale per applicazioni di sintesi o manipolazioni di ingegneria genetica/metabolica.

|   | <b>NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix</b><br>BE2621  | <b>NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit</b><br>BE5520<br>w/Comp. Cells | <b>Gibson Assembly Master Kit</b><br>BE2611  | <b>Gibson Assembly Cloning Kit</b><br>BE5510<br>w/Comp. Cells | <b>NEB Golden Gate Assembly Mix</b><br>BE1600  |
|---|--|---|--|---|--|
| <b>Descrizione</b>                                      | Unione error-free di frammenti di DNA, anche con mismatch al 5' o al 3'. Consente il clonaggio grazie alla HiFi Q5 Pol, in meno di 15'. Assembla fino a 12 frammenti da 20 kb. |   | Fusione (< 2h) con reazione isotermica di frammenti overlappanti. La Mix di esonucleasi, DNA polimerasi e ligasi agisce per il completamento del costruito, subito utilizzabile per la trasformazione batterica. |   | Unica reazione per digestione con Bsal e ligazione con T4 DNA ligasi. Consente l'assemblaggio one-step fino a 10 frammenti. Richiede la presenza di un Typell recognition site (Bsal GGTCTC) |
| <b>Rimozione mismatch 3' e 5'</b>                       | +++  | +++   | +  | +   | N/A  |
| <b>Assemblaggio HI-Fi alle giunzioni</b>                | +++  | +++   | ++   | ++  | +++  |
| <b>Compatibile con sequenze ripetute alle estremità</b> | +  | +   | +  | +   | +++  |
| <b>Giunzione dsDNA a ss-oligo</b>                       | +++  | +++   | ++   | ++  | NR   |
| <b>Low DNA amount</b>                                   | +++  | +++   | ++   | ++  | ++   |
| <b>Compatibile con frammenti in overlap</b>             | +++  | +++   | +++  | +++   | +  |
| <b>&gt; 6 frammenti</b>                                 | +++  | +++   | ++   | ++  | +++  |
| <b>Large Fragment &gt;10 kb assembly</b>                | +++  | +++   | +++  | +++   | +++  |
| <b>Multiple site directed mutagenesis</b>               | +++  | +++   | ++   | ++  | ++   |
| <b>shRNA cloning</b>                                    | +++  | +++   | ++   | ++  | +  |
| <b>gRNA library generation</b>                          | +++  | +++   | ++   | ++  | +  |

### 3 TRASFORMAZIONE CELLULE

La trasformazione è il processo tramite cui un organismo acquisisce DNA esogeno: può essere indotta trattando la cellula (batterica o di lievito) chimicamente, con cationi bivalenti (Calcium chloride) o per elettroporazione, per aumentare la permeabilità.

Cellule competenti pronte all'uso sono disponibili con diverse caratteristiche

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/competent-cell-product-comparison>

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/strain-properties>

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/neb-competent-e-coli-strain-selection>

#### CELLULE COMPETENTI

##### Cloning Strains

Sono disponibili ceppi E. Coli per il clonaggio ad alta efficienza, resistenti a fago T1 e endA deficient per consentire la produzione di plasmidi di alta qualità.

##### E. coli for Protein Expression

Disponibili diversi cloni con livelli variabili di controllo dell'espressione, ad alta efficienza di trasformazione e T1 fago-resistenti.

##### Yeast

Disponibili cloni competenti di K. Lactis e varianti di ceppo per specifiche esigenze di produzione proteica, per la trasformazione con qualsiasi vettore linearizzato del tipo pKLAC.

## 4 PURIFICAZIONE DNA PLASMIDICO

|      | Descrizione  | Codice    | E. coli culture volume | Elution volume | MAX yield          | DNA size | Vacuum/centrif. | Endotoxin Free |
|------|--|-----------|------------------------|----------------|--------------------|----------|-----------------|----------------|
| MINI | Zyppy Plasmid MiniPrep Kit 50 prep                   | ZYD4036   | 600 $\mu$ L -3 mL      | >30 $\mu$ L    | 2-15 $\mu$ g       | <25 Kb   | C               | Y              |
|      | EuroGOLD Plasmid MiniPrep Kit 50 prep                | EMR500050 | < 5 mL                 | 50-100 $\mu$ L | <25 $\mu$ g        |          | C               | N              |
|      | Monarch® Plasmid Miniprep Kit 50 prep                | BT1010S   | < 5 mL                 | 30 $\mu$ L     | <20 $\mu$ g        | <25 Kb   | C               | N              |
| MIDI | Zyppy Plasmid MidiPrep Kit 25 prep                   | ZYD4025   | 6-35 mL                | >150 $\mu$ L   | 20-80 $\mu$ g      | <25 Kb   | V/C             | Y              |
|      | ZymoPURE Plasmid MidiPrep Kit 25 prep                | ZYD4200   | 50 mL                  | >100 $\mu$ L   | <300 $\mu$ g       | <25 Kb   | V/C             | Y              |
|      | EuroGOLD X change Plasmid MidiPrep Kit 20 prep       | EMR508020 | 5-30 mL                | Various        | <100 $\mu$ g       | Various  | Precipitation   | N              |
| MAXI | ZymoPURE Plasmid MaxiPrep Kit 10 prep                | ZYD4202   | 150 mL                 | >200 $\mu$ L   | <1,2 mg            | <25 Kb   | V/C             | Y              |
|      | EuroGOLD X change Plasmid MaxiPrep Kit 10 prep       | EMR509010 | 30-150 mL              | Various        | $\leq$ 500 $\mu$ g | Various  | Precipitation   | N              |
|      | EuroGOLD X change Plasmid Maxi - EF Prep Kit 10 prep | EMR510010 | 30-150 mL              | Various        | $\leq$ 500 $\mu$ g | Various  | Precipitation   | Y              |
| GIGA | ZymoPURE Plasmid GigaPrep Kit 5 prep                 | ZYD4204   | 2.5 L                  | > 2 mL         | <10 mg             | <25 Kb   | V/C             | Y              |



## 5 VERIFICA: ANALISI DEL DNA – COLONY PCR – SEQUENZIAMENTO

La Colony-PCR consente di determinare la presenza dell'inserto di DNA nel vettore. La colonia viene "prelevata" e aggiunta direttamente alla reazione di PCR: la lisi avviene durante la denaturazione, con il rilascio in soluzione del DNA plasmidico. Possono essere usati primer specifici per l'inserto o per le regioni fiancheggianti, per poi verificare dimensioni e orientamento dell'inserto, tramite elettroforesi su gel. (Vedi Tab. Polimerasi Pag. 2)

L'elettroforesi su gel di agarosio o poliacrilammide consente di verificare, identificare e isolare frammenti di DNA. Oltre al campione di DNA, sul gel viene caricato, un marker di peso molecolare costituito da frammenti di peso (e concentrazione) nota, per confrontarlo con il campione. E' possibile purificare il frammento da gel excidendo la banda da cui isolare il DNA.

### Reagenti per Elettroforesi

| Codice                            | Descrizione   | Formato   |
|-----------------------------------|---|-----------|
| <b>Agarosio &amp; Acrilammide</b> |   |           |
| EMR013500                         | Acrylamide - Solution (40 %) Mix 19 : 1 Molecular biology grade | 500 mL    |
| EMR911100                         | GellyPhor <sup>®</sup> LM agarose – Low melting                 | 100 g     |
| EMR912100                         | GellyPhor <sup>®</sup> HR agarose – High Resolution             | 100 g     |
| EMR010500                         | GellyPhor <sup>®</sup> LE agarose                               | 500 g     |
| <b>DNA Ladders</b>                |   |           |
| EMR810100                         | SHARPMASS 50 Ready To Load DNA Ladder with reference bands      | 100 lanes |
| EMR815100                         | SHARPMASS 1 Kb Ready To Load DNA Ladder with reference bands    | 100 lanes |
| EMR814100                         | SHARPMASS 100 Ready To Load DNA Ladder with reference bands     | 100 lanes |



### Purificazione DNA

| Descrizione                                   | Codice     | Formato (rx) | Purificazione |              |            |
|---|------------|--------------|---------------|--------------|------------|
|   |            |              | Da Gel        | In soluzione | su colonna |
| EuroGold Gel Extraction Kit                   | EMR501050  | 50           | +             |              | +          |
| Monarch DNA Gel Extraction Kit                | BT1020S    | 50           | +             |              |            |
| ZymoClean Gel DNA Recovery Kit                | ZYD4007    | 50           | +             |              |            |
| ZymoClean Large Fragment Gel DNA Recovery Kit | ZYD4045    | 25           | +             |              |            |
| Select-a-Size DNA Clen& Concentrator          | ZYD4080    | 25           |               |              | +          |
| Illustra EXoProStar One Step                  | GEHUS77702 | 100          |               | +            |            |
| EuroSAP                                       | EMR520500  | 500          |               | +            |            |

Per migliorare la processività di analisi è possibile ricorrere a sistemi automatizzati di elettroforesi capillare (Fragment Analyzer).

Il DNA/RNA può essere quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop, per una quantificazione altamente attendibile e riproducibile da una micro goccia di 1 solo microlitro di campione. L'inserto può essere verificato anche per sequenziamento.



## 6 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

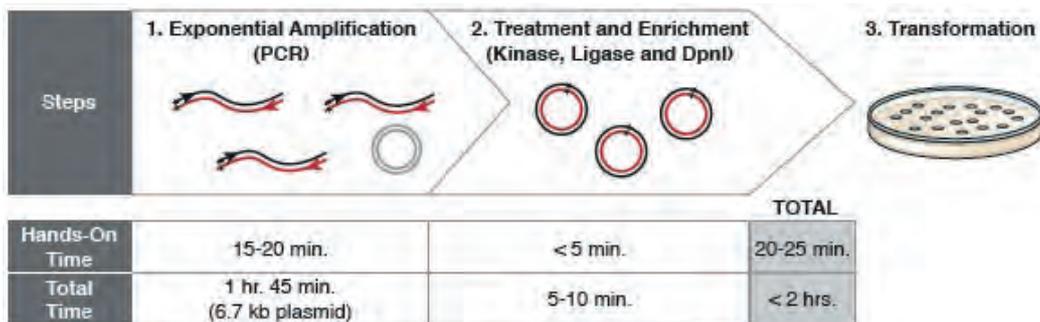
La mutazione sito-diretta permette di introdurre mediante design ad hoc dei primer variazioni a singola base, inserzioni o delezioni, tramite PCR in un sito specifico del DNA target.

### Q5® SITE-DIRECTED MUTAGENESIS STRATEGY

Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit BE0554S

Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Without Competent Cells) BE0552S

Questi kit utilizzano la Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase: dopo lo step di PCR, il template viene direttamente aggiunto a una mix enzimatica, (Kinase-Ligase- DpnI, KLD) per ottenere la circolarizzazione del plasmide. A questo punto è necessaria la trasformazione in cellule competenti per ottenere plasmidi fino a 20kb.



## 7 SCELTA DEL VETTORE

### Protein Expression – Functional Analysis

#### Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System

È il sistema semplice e versatile di GE Healthcare per l'espressione, la purificazione e l'analisi di proteine taggate con GST, prodotte in E. Coli.

Il sistema è composto da una varietà di vettori plasmidici pGEX con MCS (multiple cloning site) per il clonaggio del costrutto di interesse che si intende taggare con GST, con differenti reading frame e siti di riconoscimento per il cleavage (trombina, PreScission, Factor Xa).

| Descrizione        | Codice      | Caratteristiche   |
|--------------------|-------------|---|
| PGEX-4T-1          | GEH28954549 | Sito di riconoscimento per la trombina.   |
| PGEX-4T-2          | GEH28954550 |   |
| PGEX-4T-3          | GEH28954552 |   |
| PGEX-2T 25 UG W/DI | GEH28954653 |   |
| PGEX2TK            | GEH28954549 | Sito di riconoscimento per la trombina. Consente il rilevamento delle proteine ricombinanti tramite marcatura diretta <i>in vitro</i> . |
| PGEX-6P-1 VECTOR   | GEH28954648 | Sito di riconoscimento specifico per la PreScission Protease  |
| PGEX-6P-2 VECTOR   | GEH28954650 |   |
| PGEX-6P-3 VECTOR   | GEH28954651 |   |
| PGEX-3X 25 UG W/DI | GEH28954654 | Sito di riconoscimento per il Factor Xa   |

Informazioni complete al link: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-it/products/AlternativeProductStructure\\_16996/28954549](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-it/products/AlternativeProductStructure_16996/28954549)

## Vettori per Cellule Eucariotiche

Per ottenere l'espressione stabile del gene di interesse in cellule eucariotiche è possibile ricorrere a vettori lentivirali. System Biosciences offre un ampio pacchetto di vettori con caratteristiche ideali:

- Alti livelli di espressione
- Promotori Bi-direzionali per transgeni multipli
- Cassette di espressione singole o doppie con possibilità di scelta del gene reporter
- Possibilità di scelta del promotore come da tabella
- FIV o HIV-based vector

Informazioni dettagliate disponibili al link:

<https://www.systembio.com/lentiviral-technology/expression-vectors/cdna/overview>

TransOMIC offre una vasta collezione di cloni pre-disegnati (MGC Premier) che includono cDNA full-length (incluse le regioni UTR) o il corrispondente ORF, la cui sequenza è garantita e verificata al 100%. Sono disponibili anche vettori già pronti per l'espressione della proteina di interesse, con o senza Tag (Expression Ready Vector).

### MGC premier cDNA

Includono ORF + UTR. Ideale per l'espressione di proteine native di uomo, topo, ratto, bovino, Xenopus e Zebrafish, dopo sub-clonaggio all'interno di vettori di espressione.

### MGC premier ORFs

Contengono solo le regioni ORF e consentono la fusione con specifiche Tag dopo sub-clonaggio all'interno di vettori di espressione. Opzione di Stop-codon e introduzione di fusion-Tag con sub clonaggio al C-ter o N-ter. Disponibili per Human, Mouse e Zebrafish.

Le sequenze MGC premier possono essere sub-clonate nel vettore di interesse (disponibile anche come service).

### Expression Ready cDNA

Vettori pre-disegnati, includono la sequenza ORF+UTR, ideali per l'espressione della proteina nativa. Garantiscono alti livelli di espressione, con possibilità di scelta del promotore e del marker di selezione, Neomicina o Puomicina (vettori pTCN o pTCP rispettivamente).

### Expression Ready ORF

Vettori pre-disegnati e pronti per l'espressione di geni di uomo, topo e ratto, con la possibilità di scegliere usion tag Myc o FLAG.

Disponibili anche in versione lentivirale con tag V5, anche come particelle pronte alla trasduzione.

E' possibile verificare la disponibilità dei vettori per il gene di interesse, inserendo il gene ID o nome della proteina nel box "Fetch My Gene" di TransOMIC <http://www.transomic.com>

| Promoter | Expression Level | Applications   |
|----------|------------------|--|
| CMV      | High             | Commonly used in most cell lines (HeLa, HEK293, HT1080)          |
| MSCV     | High             | Hematopoietic and Stem Cells                                     |
| EF1      | Medium           | Robust in most cell types, primary cells and Stem cells          |
| PGK      | Medium           | Robust in most cell types, primary cells and Stem cells          |
| Ubc      | Low              | Low and steady in most cell types, primary cells and steam cells |

## 8 BIOPRODUZIONE

L'espressione delle proteine è un processo molto complesso e multifattoriale.

Ogni proteina richiede uno specifico ambiente intracellulare per ottenere una corretta struttura secondaria e terziaria.

Le proteine possono inoltre richiedere alcune modifiche post traduzionali o la collocazione in uno specifico comparto sub cellulare e, in alcuni casi, risultare tossiche per la cellula: per questo motivo non esiste una soluzione univoca per la produzione di proteine ricombinanti ed è possibile ricorrere a diversi sistemi che permettono di scegliere la strategia che meglio si adatta all'espressione e purificazione della proteina di interesse.

### PRODUZIONE DI PROTEINE IN BATTERI E LIEVITO IN VITRO

#### *E. Coli for Protein Expression*

Disponibili diversi cloni con livelli variabili di controllo dell'espressione, ad alta efficienza di trasformazione e T1 fago-resistenti.

#### *Yeast*

Disponibili cloni competenti di *K. Lactis* e varianti di ceppo per specifiche esigenze di produzione proteica, per la trasformazione con qualsiasi vettore linearizzato del tipo pKLAC.

|  | Descrizione  | Codice  | Vantaggi  |
|--|--|---------|---|
| <b>K. Lactis Protein Expression Kit</b>              | Per l'espressione di proteine in <i>K.Lactis</i> . Non richiede utilizzo di metanolo o antibiotici. Include <i>K.Lactis</i> competent cells. Facilmente scalabile.   | BE1000S | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alta resa</li> <li>Alta densità di crescita</li> <li>Methanol free</li> <li>Glycerol free per HPLC e MS</li> <li>Multiple Protein Expression</li> </ul>            |
| <b>pMAL Protein Fusion &amp; Purification System</b> | Impiego del promotore $P_{lac}$ in <i>E.Coli</i> . per una migliore solubilità e livello di espressione della proteina grazie al MBO initiation signal. Viene prodotta una proteina di fusione con MBP, successivamente purificabile per affinità. | BE8200S | <ul style="list-style-type: none"> <li>Resa fino a 100 mg/L</li> <li>Espressione in citoplasma o periplasma</li> <li>Miglior folding</li> </ul>   |
| <b>IMPACT Kit</b>                                    | Utilizza inteine (engineered protein splicing elements) fuse con CBD (chitin binding protein) come tag al C-ter o N-ter. La proteina può essere purificata in un unico step cromatografico.  | BE6901S | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alta resa con sequenza nativa</li> <li>Rilascio della proteina senza proteasi</li> <li>Purificazione One Step</li> <li>T7 promoter per alta espressione</li> </ul> |
| <b>PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit</b>     | Sistema rapido cell-free grazie all'impegno di componenti necessarie all'espressione di proteine purificate da <i>E. Coli</i> . Consente l'espressione di proteine senza modificazioni o degradazione in una procedura a 2 tubi.                   | BE6800S | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adatto a circDNA o linear DNA</li> <li>Espressione proteica in 2 ore</li> <li>Purificazione per cromatografia/affinità</li> </ul>                                  |

## PRODUZIONE DI PROTEINE IN CELLULE EUCARIOTICHE

La trasfezione di cellule eucariotiche è un metodo standard ampiamente utilizzato nella bioproduzione di molecole ricombinanti e anticorpi per generare cloni di produzione stabili.

Anche metodi di trasfezione transiente sono sempre più diffusamente impiegati per la bioproduzione su media scala, consentendo di ottenere un quantitativo di proteina sufficiente, senza necessità di produrre cloni cellulari stabili, e migliorando rapidità e flessibilità del metodo.

Le cellule eucariotiche più tipicamente utilizzate a questo scopo sono le HEK-293 e le CHO, generalmente cresciute in terreni specifici serum-free e supporti di crescita dedicati.

Per migliorare l'efficienza di trasfezione di cellule di mammifero, Polyplus ha sviluppato FectoPRO, un reagente di trasfezione specifico per applicazioni di bioproduzione: il reagente è fornito in associazione ad un Booster, ed è adatto all'impiego di cellule CHO e HEK-293 in sospensione in diversi terreni di coltura serum-free e diversi supporti di crescita, con l'impiego di quantità minime di DNA (<1 ug/mL di coltura cell).

**FectoPRO** garantisce elevate rese di proteine e anticorpi sia in CHO che HEK-293 cresciute in sospensione in terreni serum-free ed è facilmente implementabile in ogni laboratorio.

**FectoPRO** è stato sviluppato per assicurare la produzione di proteine per tempi più lunghi rispetto allo standard, mantenendo un'elevata stabilità e vitalità delle cellule.

**FectoPRO** è privo di componenti di origine animale (chemically defined), testato su ogni singolo lotto di produzione con severi controlli di qualità e prodotto in cGMP. I severi controlli di produzione garantiscono un'elevata riproducibilità sperimentale.

**FectoPRO** consente di ridurre i costi di produzione riducendo il quantitativo di DNA input, che rappresenta la voce di costo più rilevante.

**FectoPRO** è scalabile secondo i volumi di produzione e adatto all'impiego con cellule particolarmente resistenti alla trasfezione (CHO) e compatibile con ridotto input di DNA.

L'uso in combinazione con i CELLSTAR CELL Reactor di Greiner BioOne ha dimostrato vantaggi notevoli:

- Crescita migliore e aumento della qualità delle cellule, con incremento delle rese
- Possibilità di lavorare anche su piccoli volumi
- La compatibilità con sistemi di rotazione orbitale consente di ottimizzare lo spazio di lavoro, monitorando contemporaneamente la crescita cellulare anche in diverse condizioni
- Possibilità di centrifugare direttamente la coltura cellulare senza necessità di trasferimento in nuovi tubi

| Descrizione                                 | Codice   | Formato        |
|---|----------|----------------|
| FectoPRO reagent Kit (Fecto PRO + Booster)  | PP116001 | 1 mL           |
|   | PP116010 | 10 mL          |
|   | PP116100 | 100 mL         |
| CELLSTAR® CELLreactor™ Tube with Filter Cap | GR188240 | 15 mL (300 pz) |
|   | GR227245 | 50 mL (500 pz) |

La produzione di cellule su ampia scala necessita di sistemi di coltura specifici. Sia per cellule in adesione che per cellule in sospensione, Corning dispone di una tecnologia e di prodotti studiati appositamente: Roller Bottles, CellSTACK Chambers, CellCube and E-Cube, HYPERFlask Vessels, HYPERStack Vessels, Erlenmeyer Flasks, Spinner Flasks.

Scarica dal nostro sito la guida completa alla scelta del sistema di coltura più adatto alle tue esigenze: <http://www.euroclonergroup.it/page/catalogs>



Per la produzione e il processamento di proteine ricombinanti espresse in CHO o HEK293. Lonza e GE hanno sviluppato terreni privi di componenti di origine animale e protein- e/o serum-free: questi terreni presentano minimi livelli di insulina per facilitare la purificazione secondo cGMP.

|                                   | Descrizione   | Codice     | Applicazioni   |
|-----------------------------------|---|------------|--|
| <b>Lonza Pro- CHO™ 4</b>          | Protein Free CHO Medium                                 | LO04919Q   | Terreno protein-free di transizione da CHO in adesione a colture in sospensione.<br>Consente un doubling time più rapido; w/o Phenol Red.                  |
| <b>Lonza ProCHO 4 – CDM</b>       | Protein Free CHO Medium                                 | LO12029Q   | Terreno protein-free di transizione da CHO in adesione a colture in sospensione.<br>Consente un doubling time più rapido; with Phenol Red.                 |
| <b>Hyclone HyCell TransFx - C</b> | Liquid Medium CHO transient transfection                | SH3094102  | Per trasfezione transiente e crescita.<br>Animal-derived component free.<br>Consente rapido adattamento delle cellule alla sospensione e alta vitalità.    |
| <b>Lonza Pro 293™</b>             | Serum free Medium Chem Defined for 293 suspension cells | LO12765Q   | Terreno per cellule 293 in sospensione o da adattare alla sospensione.   |
| <b>Pro293S- CDM</b>               | Serum free Medium Chem Defined for 293 suspension cells | LOBE02025Q | Terreno per cellule 293 in sospensione o da adattare alla sospensione; w/o galactose.  |
| <b>Hyclone HyCell TransFx - H</b> | Liquid Medium HEK-293 transient transfection            | SH3093902  | Per trasfezione transiente e la crescita.<br>Animal-derived component free.<br>Consente rapido adattamento delle cellule alla sospensione e alta vitalità. |

## GLICOPROTEOMICA

Nelle cellule eucariotiche la maggior parte delle proteine presenta modificazioni post-traduzionali. Una di tali modificazioni, essenziali per la vitalità cellulare, è la coniugazione con glicani: la glicoproteomica è lo studio della struttura, funzione e biologia dei carboidrati (glicani) che contribuiscono all'attività e funzione delle proteine eucariotiche. La presenza di glicosilazione conferisce alle proteine proprietà adesive ed è essenziale nelle interazioni proteiche tra cellule e tra cellule e patogeni. Lo studio dei glicani nei sistemi biologici si basa sull'impiego di tecniche enzimatiche ed analitiche per la correlazione tra la struttura di queste molecole e la loro funzione.

NEB offre un pacchetto di Endo- ed Exo-Glicosidasi per lo studio della glicosilazione, prevalentemente di origine ricombinante, ad alto livello di purificazione e ridotta variabilità da lotto a lotto.

La deglicosilazione di una proteina spesso richiede più di un enzima per rimuovere completamente tutti i residui.

La PNGase F rimuove pressoché tutti i glicosaccaridi N-linked, ma altri residui monosaccaridici O-linked, richiedono l'attività di specifici enzimi.

La digestione con PNGase F determina la deaminazione del residuo di asparagina in acido aspartico, lasciando l'oligosaccaride intatto per eventuali ulteriori analisi.

La Protein Deglycosylation Mix contiene tutti i reagenti necessari per rimuovere residui N-linked o O-linked, semplici o complessi.

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| Protein Deglycosylation Mix           | BP6039S   |
| PNGase F                              | BP0704S/L |
| PNGase F, Recombinant                 | BP0708S/L |
| PNGase F (Glycerol-free)              | BP0705S/L |
| PNGase F (Glycerol-free), Recombinant | BP0709S/L |

Oltre agli enzimi citati, sono disponibili Endoglicosidasi D, S e H, O-Glicosidase e varie Esoglicosidasi e proteasi.

Visita il sito [www.nebglycosidase.com](http://www.nebglycosidase.com) per una lista completa degli enzimi e dei reagenti disponibili.

## 9 PURIFICAZIONE E ANALISI DELLE PROTEINE ESPRESSE

Dopo l'estrazione, i campioni di proteine possono essere sottoposti direttamente ad analisi funzionale o a passaggi "preparativi" che consentono di generare un campione finale che contenga la singola proteina d'interesse.

Per la purificazione preparativa delle proteine spesso si ricorre alla cromatografia che può essere effettuata tramite metodi manuali o sistemi automatizzati.

Le procedure manuali di purificazione di proteine possono essere automatizzate con l'uso del sistema cromatografico **AKTA start**, dotato di un sistema di raccolta delle frazioni e di un software di controllo.

<http://proteins.gelifsciences.com/products-for-proteins/protein-purification-systems/akta-start/>

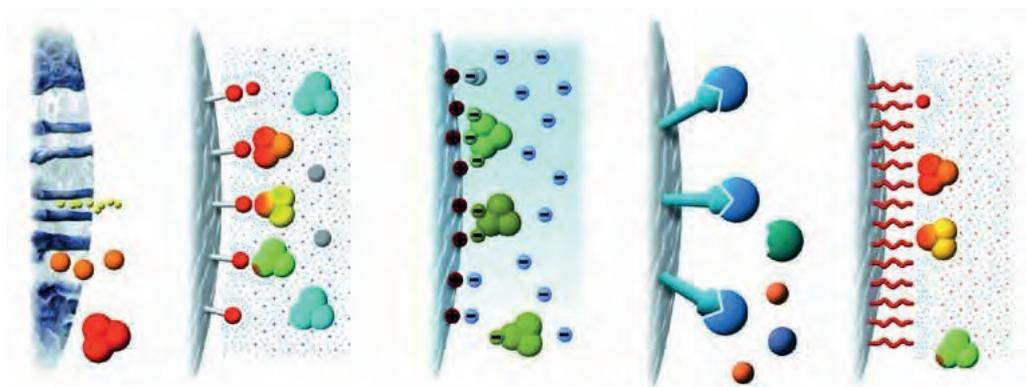


Di seguito è illustrata una selezione delle più usate tipologie di colonne cromatografiche pre-impaccate, nonché matrici magnetiche, per una purificazione semplice ed efficiente.

| Descrizione  | Codice      | Formato  | Applicazioni   |
|--|-------------|----------|--|
| <b>Protein A Mag Sepharose Xtra "magnetic beads"</b> | GEH28967056 | 2x1ml    | Biglie magnetiche per la purificazione e lo screening di anticorpi; utilizzano le proteine A o G native come ligando.  |
| <b>Protein G Mag Sepharose Xtra "magnetic beads"</b> | GEH28967066 | 2x1ml    |  |
| <b>HITRAP PROTEIN A HP</b>                           | GEH17040203 | 2x1ml    | Colonne pre-impaccate con la resina Sepharose HP, legata alla proteina A, per la purificazione preparativa di anticorpi monoclonali.                                   |
| <b>HITRAP PROTEIN G HP</b>                           | GEH17040403 | 2x1ml    |  |
| <b>His Mag Sepharose Ni "magnetic beads"</b>         | GEH28967388 | 2x1ml    | Biglie magnetiche per la purificazione e lo screening di proteine taggate con istidina; utilizzano nichel come ligando.  |
| <b>HISTRAP HP</b>                                    | GEH17524701 | 5x1ml    | Colonne pre-impaccate con Ni Sepharose HP per la purificazione di proteine taggate con istidina.   |
| <b>GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B 10 M</b>                 | GEH17075601 | 10mL     | Colonne pre-impaccate con Ni Sepharose HP per la purificazione di proteine taggate con istidina  |
| <b>GSTRAP FF</b>                                     | GEH17513101 | 1 x 5 ml | Colonne pre-impaccate con resina Gluathione Sepharose Fast Flow, per la purificazione di proteine taggate con GST.   |
| <b>Superdex 200 Increase 10/300 GL</b>               | GEH28990944 | 1 column | Colonne pre-impaccate per cromatografia ad esclusione di massa (gel filtration) per caratterizzazione e l'analisi di proteine con peso molecolare tra 10.000 e 600.000 |
| <b>Superose 6 Increase 10/300 GL</b>                 | GEH29091596 | 1 column | Colonne pre-impaccate per cromatografia ad esclusione di massa (gel filtration) per caratterizzazione e l'analisi di proteine con peso molecolare tra 5000 e 5.000.000 |
| <b>Superdex 75 Increase 10/300 GL</b>                | GEH29148721 | 1 column | Colonne pre-impaccate per cromatografia ad esclusione di massa (gel filtration) per caratterizzazione e l'analisi di proteine con peso molecolare tra 3000 e 70.000    |

**L'analisi funzionale** può essere effettuata direttamente nell'estratto proteico o nelle cellule in cui la proteina è espressa mediante tecniche immunologiche (Western Blot, ELISA, Immunofluorescenza, Immunoprecipitazione) con anticorpi specifici per la proteina stessa o per l'eventuale Tag fuso alla proteina.

Cell Signaling Technology ha una vasta gamma di anticorpi primari tra cui anche una selezione di anticorpi tag-specifici. (<http://cellsignal.com/tag>)



## **Primo® Cell Culture Consumable, Microplates, Mechanical Pipettes and Tips**

Primo® is the new series of products developed by EuroClone to satisfy high demanding scientists' needs. The entire line of Primo®'s product is manufactured in 100,000 grade clean-room environment under a ISO 9001-2008 and ISO 13485 Quality System.

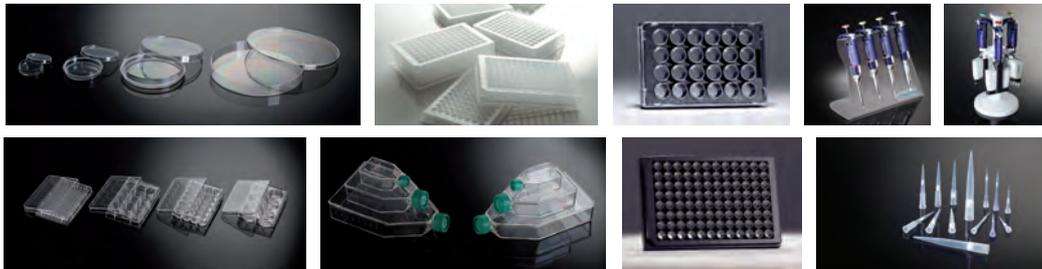
Primo® Cell Culture products are manufactured with 100% USP VI crystal class virgin polystyrene and high quality polyethylene to ensure optimal surface for your cells.

Primo® Flasks and Plates are vacuum-plasma treated to create a negatively charged and hydrophilic surface; this treatment ensures a more even and consistent cell attachment together with optimal cell growth.

Primo® screening plates are polystyrene plates designed for cell based high content screening, confocal microscopy, FRET and homogeneous assays where an optimum signal-to-noise ratio and high consistency are essential.

Primo® polypropylene storage plates have very low biomolecular binding properties, tolerate high temperature and are resistant to many standard laboratory chemicals.

Primo® mechanical pipettes are high quality devices that guarantee maximum precision and reproducibility of measurement. Pipettes are fully autoclavable and UV-resistant; are CE IVD marked with 3 years warranty. Primo® tips are compatible with the great majority of pipettes available in the market, are DNase/RNase certified, DNA & Pyrogen free.



## **EuroClone - Manufacturer of CCE since 1972**

*Your Safety is our commitment*

EuroClone - BioAir is one of Europe's leading manufacturers and suppliers of highest quality Microbiological Safety Cabinets, Laminar Flow Cabinets and Recirculating Fume Cupboards, with more than 35 years of experience in the field!

Our range of 14 different models of Class II Biological Safety Cabinets realized according to the EN12469 European Standard, meets any quality or budget requirement!

The product range is completed by Laminar Flow Cabinets for manipulation of non toxic samples, Recirculating Fume Hoods for easy managing of chemicals and volatiles and a series of equipments designed for automation and industrial applications.

The experience deriving from decades of sales and support to Cell Biologists, allowed EuroClone® to bring into the market an extremely innovative CO2 Incubator, the S@fegrow 188, which is the result of a deep knowledge of the best conditions required by the most critical tissue culture methods, supported by the suggestions received from the scientists involved in growing cells in vitro.



*S@femate Eco*



*S@felow Two*



*Aura HZ*

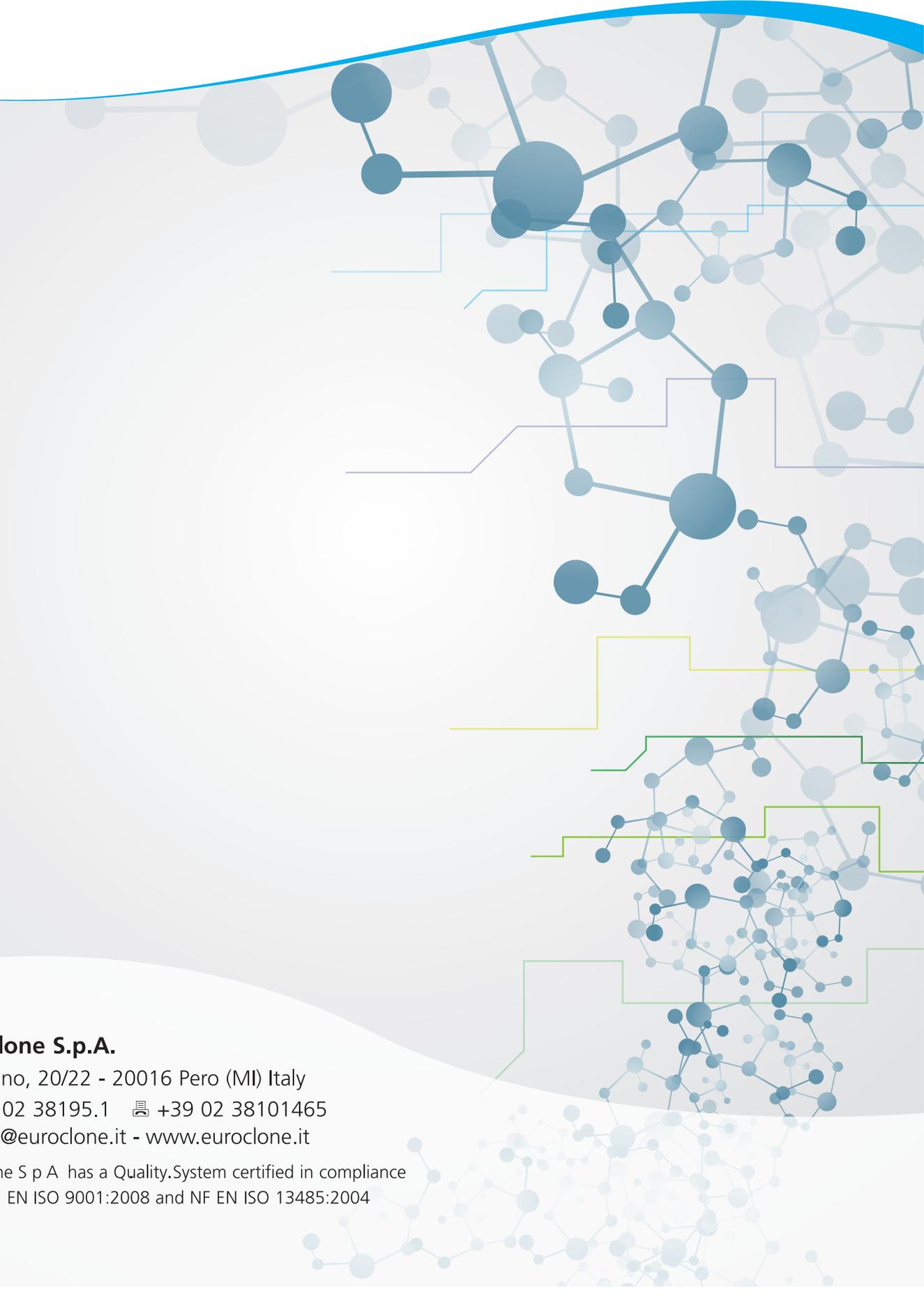


*S@fegrow 188*



### **Italian Quality**

*All the cabinets and the incubator are completely made in Italy using components of Italian or european origin!  
We use only the best for our equipment!*



## **EuroClone S.p.A.**

Via Figino, 20/22 - 20016 Pero (MI) Italy

☎ +39 02 38195.1 📠 +39 02 38101465

✉ info@euroclone.it - www.euroclone.it

EuroClone S p A has a Quality.System certified in compliance  
with UNI EN ISO 9001:2008 and NF EN ISO 13485:2004