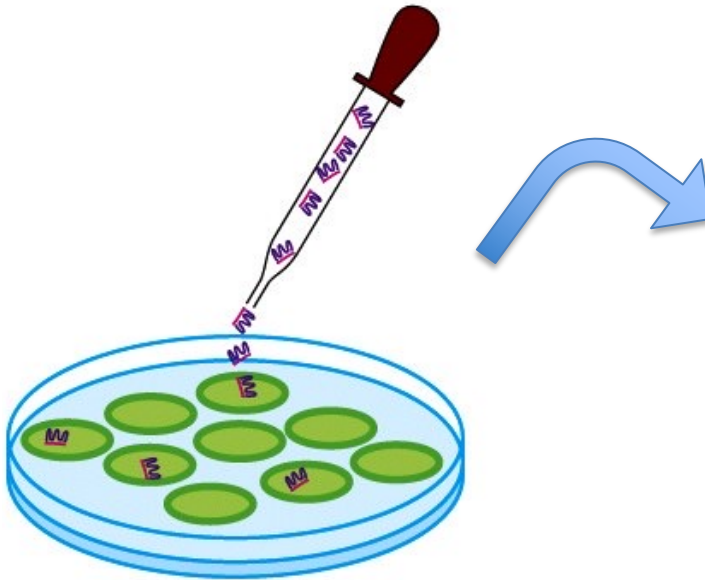


**CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche**  
**Corso di Biotecnologie Cellulari 2025-26**  
**Lezione 5**

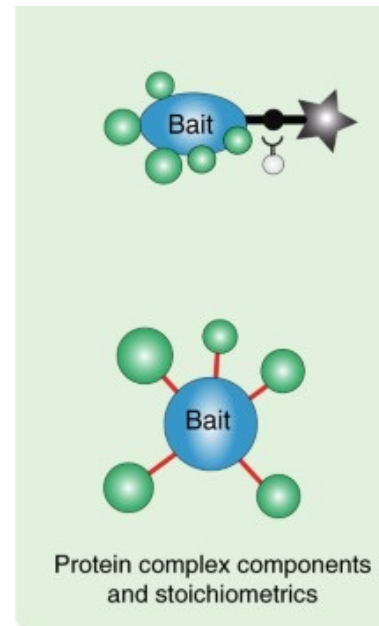
**Sovraespressione transiente di proteine virali  
in cellule di mammifero**

# DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

1) Sovraespressione  
di proteine virali in cellule umane

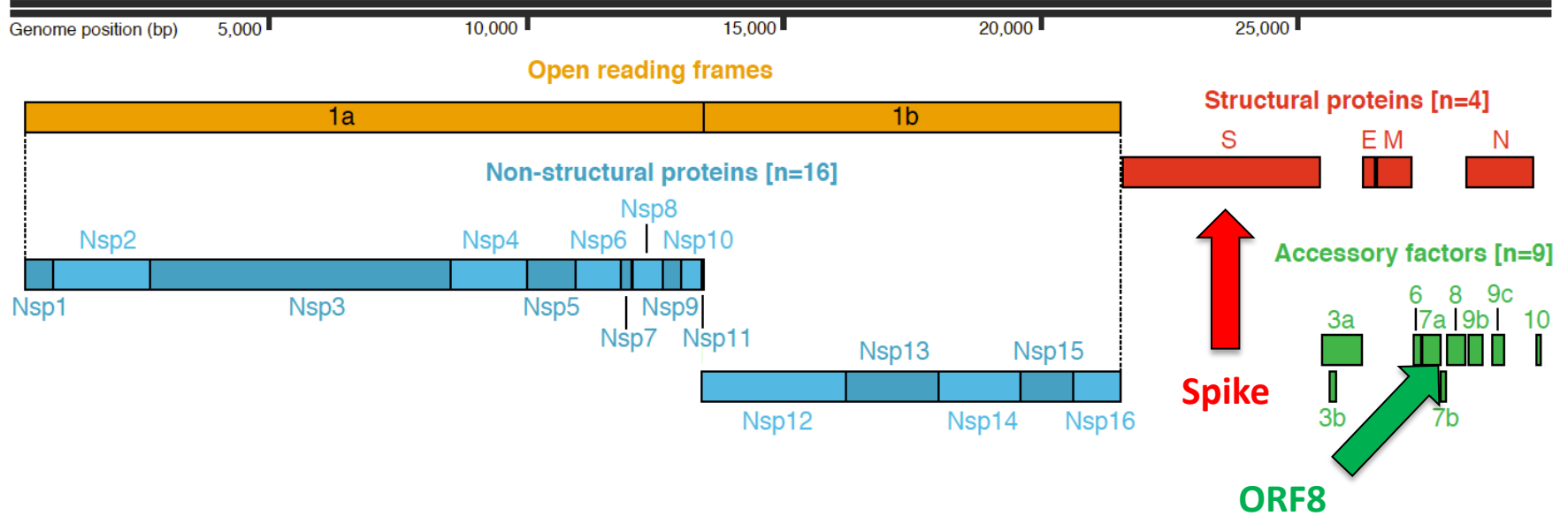


2) Analisi dell'interattoma  
(proteine cellulari associate)  
delle proteine virali



= recuperare la proteina virale dalle  
cellule ed analizzare le proteine cellulari  
ad essa legate

# SARS-CoV-2 Genome



## DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

1. **Ottengo il cDNA** inserito in un vettore “shuttle”
2. Procedo al **subclonaggio** in un **vettore di espressione** adatto al mio scopo
3. Scelgo la **tecnica** appropriata per introdurre il costrutto nelle cellule scelte per l'esperimento

### VETTORE:

molecola di DNA utilizzata per trasferire materiale genetico esogeno da una cellula ad un'altra: può essere **plasmidico**, **virale**, etc.



# Come faccio a procurarmi i DNA?

- a) Cerco il clone in una “banca”
- b) Invio una richiesta agli autori di pubblicazioni rilevanti

 addgene

[Browse Catalog -](#)

[Deposit -](#)

[Education & Tools -](#)

[Help Center -](#)



e.g. 74218, Cas9, transformation protocol

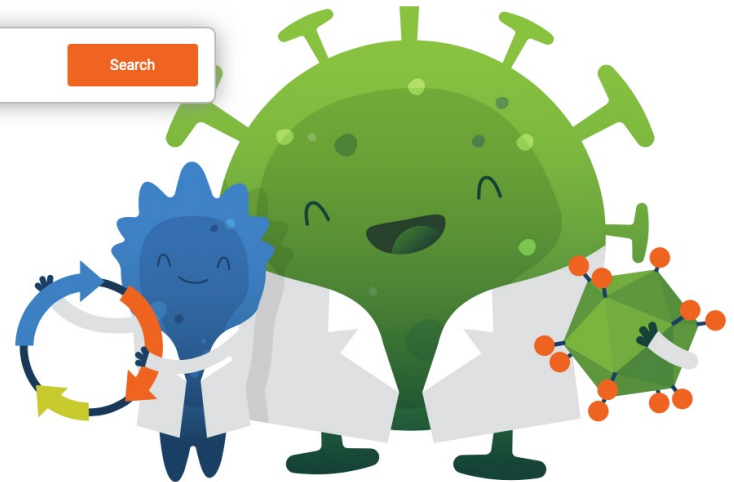
Search

## A Better Way to Share Science

We distribute 97,124 plasmids on behalf of 4,596 labs from around the world. We also produce 588 ready-to-use viral vectors from our plasmid collection. Find what you need for your next experiment.

[View Collections](#)

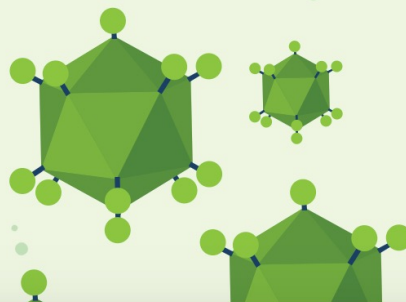
[Deposit a Plasmid](#)



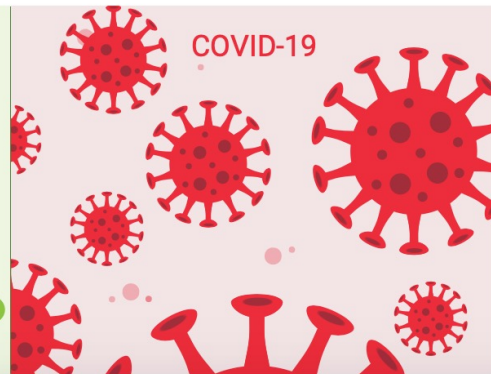
CRISPR



AAV



COVID-19



All Collections



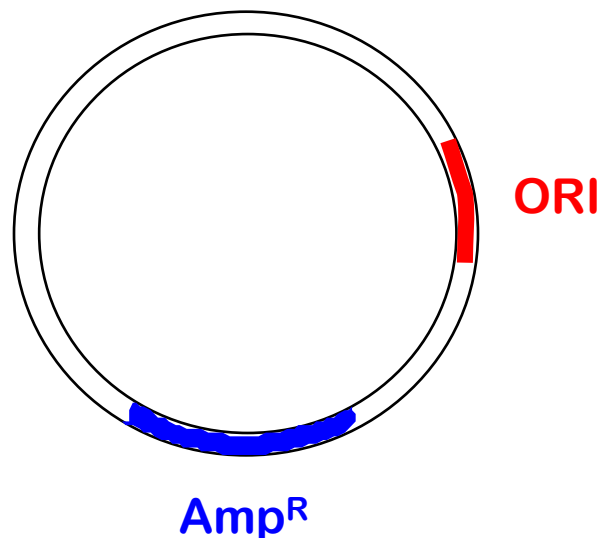
[Help Center](#)

## Caratteristiche dei vettori plasmidici

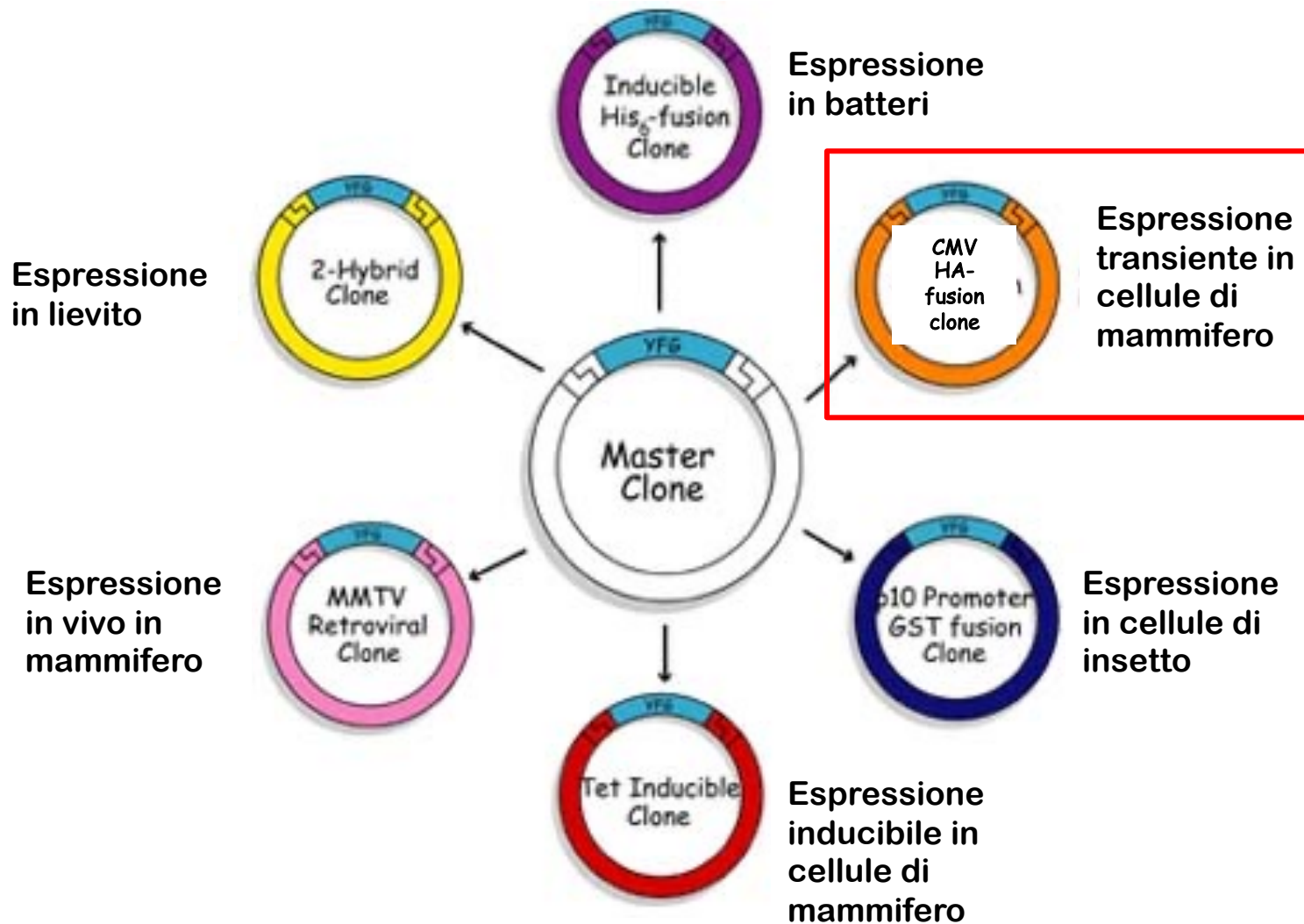
molecole di DNA batteriche extracromosomiche, solitamente circolari,  
in grado di replicarsi autonomamente nei batteri,  
spesso contengono geni che conferiscono antibiotico-resistenza

1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

- **Origine di replicazione batterica (ColE1 ori)**
- **Marker per la selezione dei batteri trasformati:**  
di solito un gene per la resistenza ad un antibiotico (antibatterico)



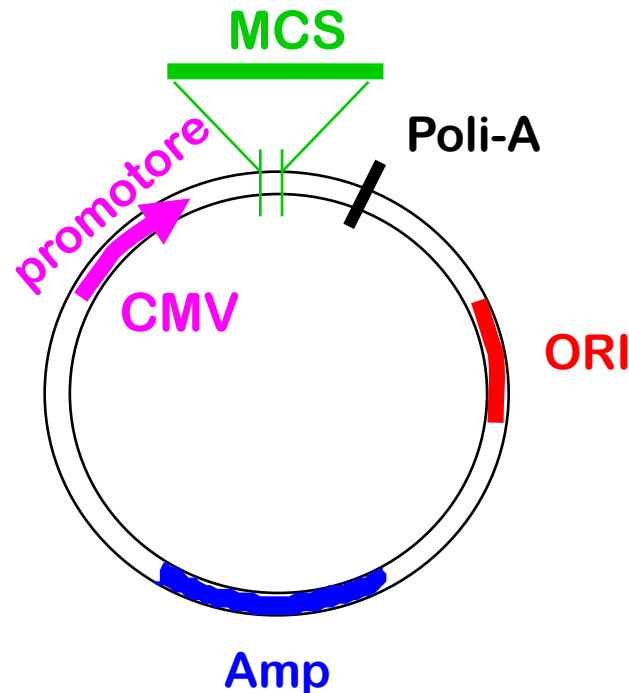
# Subclonaggio del cDNA nel vettore prescelto



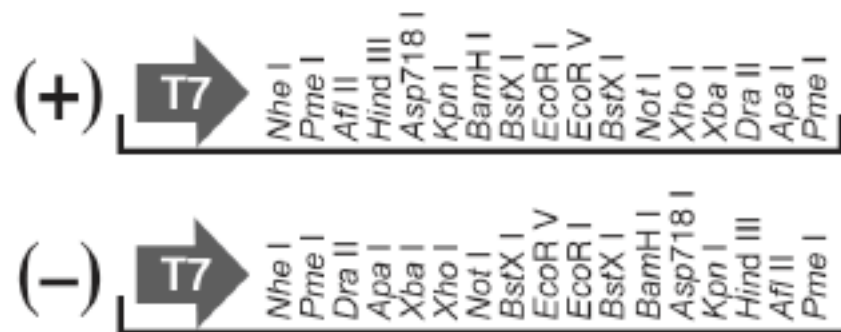
## Caratteristiche dei vettori di espressione per cell mammifero

2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **di mammifero**:

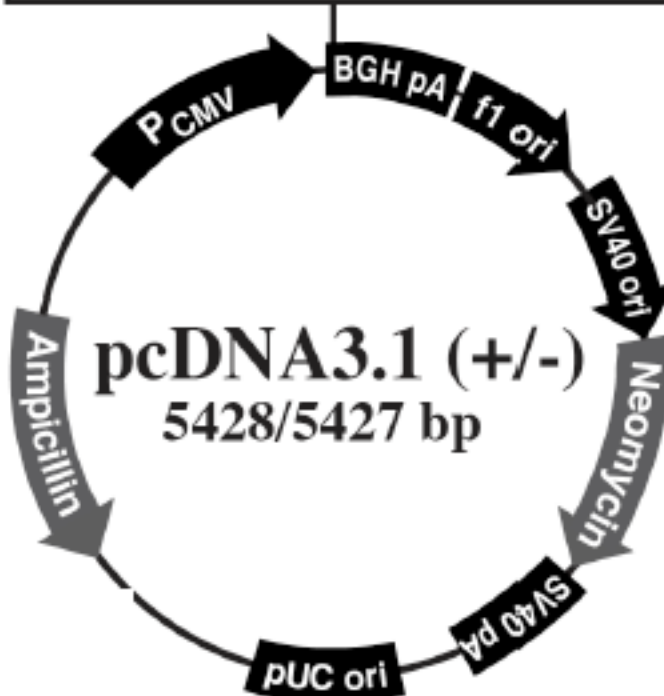
- **MCS** (sito di clonaggio multiplo)
- **promotore** forte virale (CMV, SV40...)
- segnale di poliadenilazione



## Il vettore di espressione pCDNA3



P<sub>CMV</sub>: CMV enhancer-promoter  
 BGHpA: BGH polyadenylation  
 signal and termination sequence  
 f1 origin  
 SV40 origin  
 SV40 polyadenylation signal  
 ampicillin resistance gene  
 pUC origin



# Espressione di proteine di fusione e TAGs

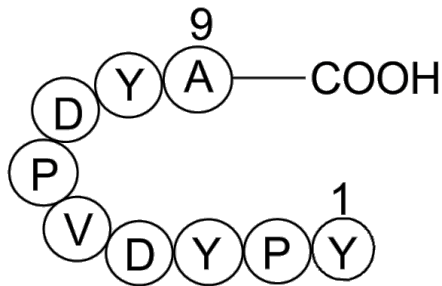
allo scopo di **VISUALIZZARE** o **PURIFICARE** la proteina sovraespressa

è possibile sovraesprimere la **proteina in fusione** con un **corto peptide detto TAG** (es. HA, FLAG, 6-His, Myc tag)

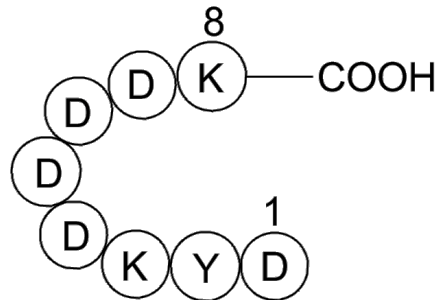
oppure con un **polipeptide** come **GFP, MBP etc.**

La sequenza codificante il TAG viene **clonata** in un **vettore di espressione nella stessa cornice di lettura (in frame)** al **cDNA** codificante la proteina, a monte o a valle.

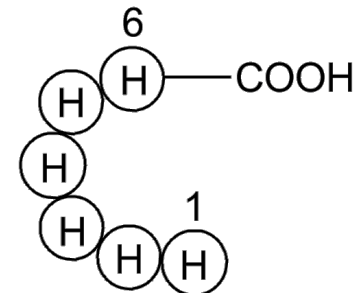
Quindi il TAG può essere fuso all'**N-** o al **C-terminale** della proteina:



Human Influenza hemagglutinin (HA)

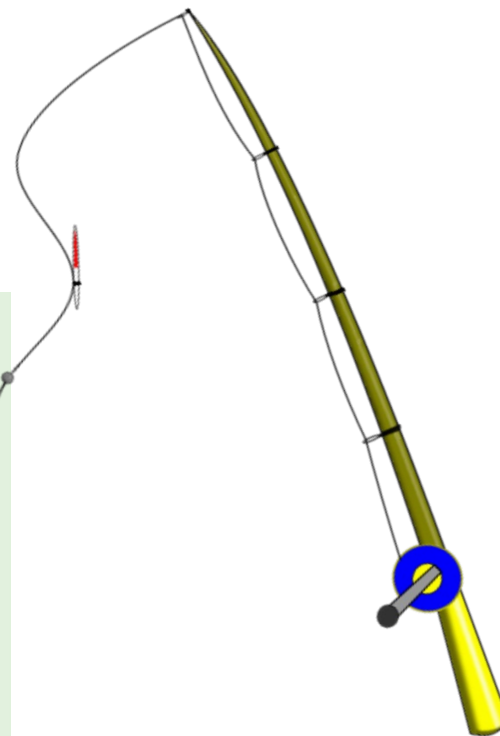
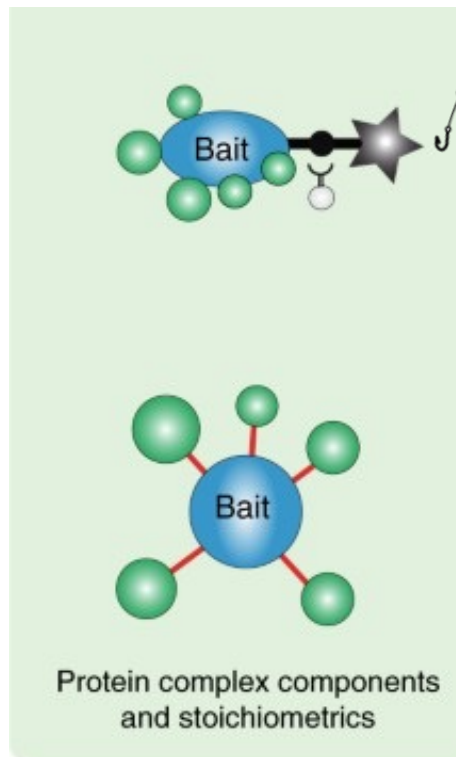


FLAG

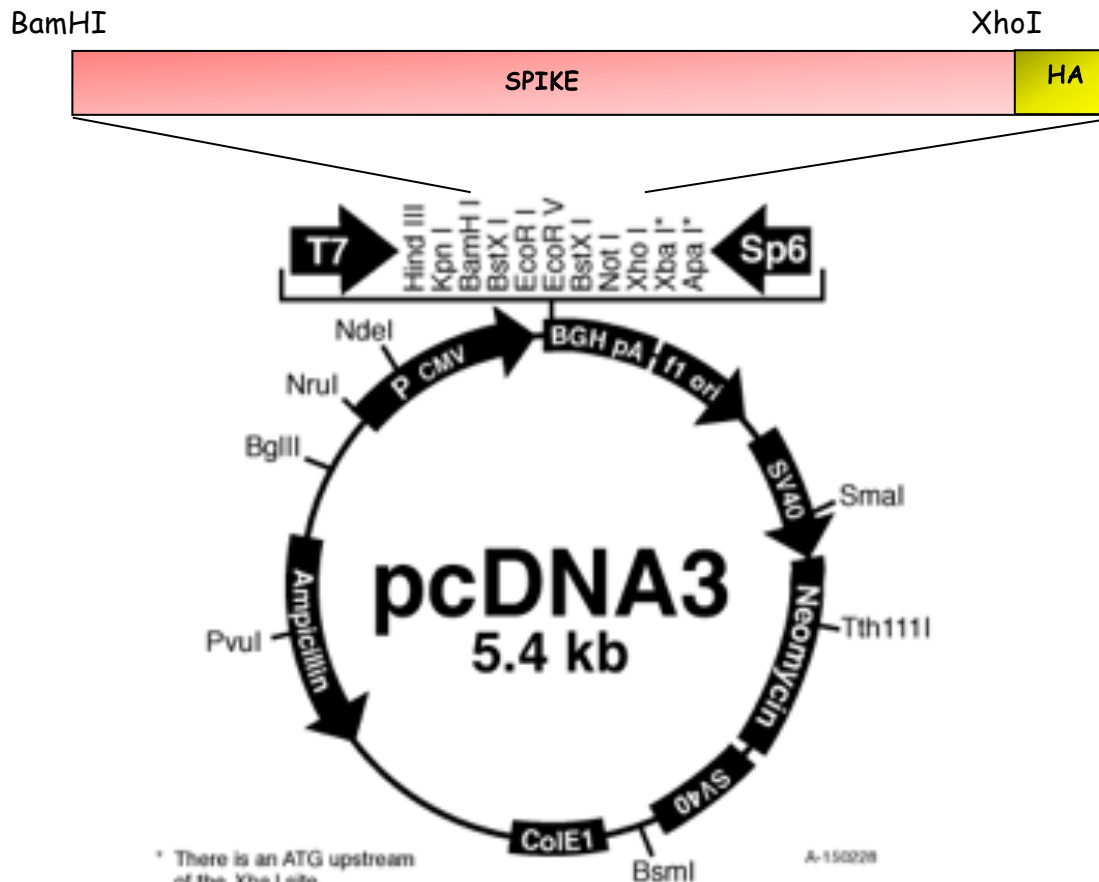


# Utilizzo del TAG come ESCA per “pescare” = PURIFICARE

Analisi dell'interattoma  
(proteine cellulari associate)  
della proteina esca sovraespressa

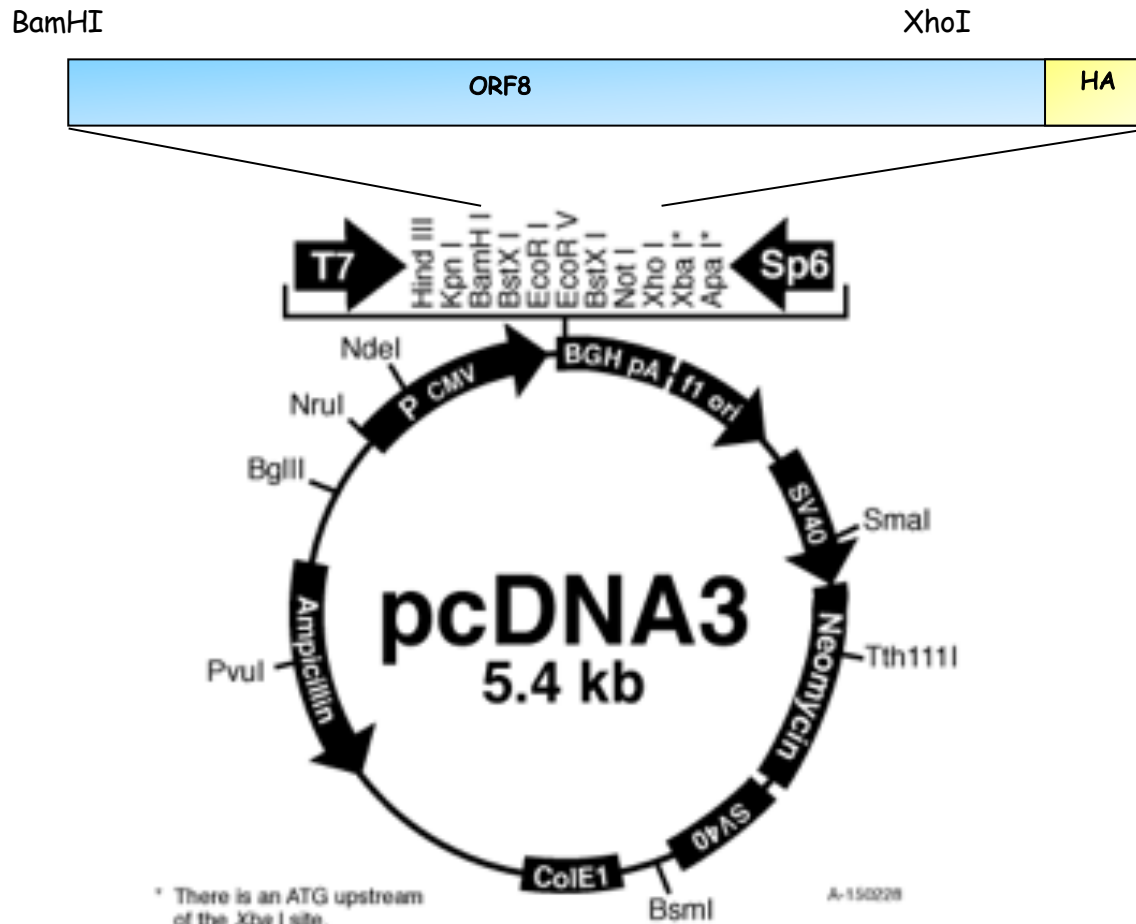


**Step 1a (eseguito dai docenti):**  
**clonaggio del cDNA di Spike nel vettore di espressione**  
**pcDNA3 *in fusione con il TAG HA* al C terminale**

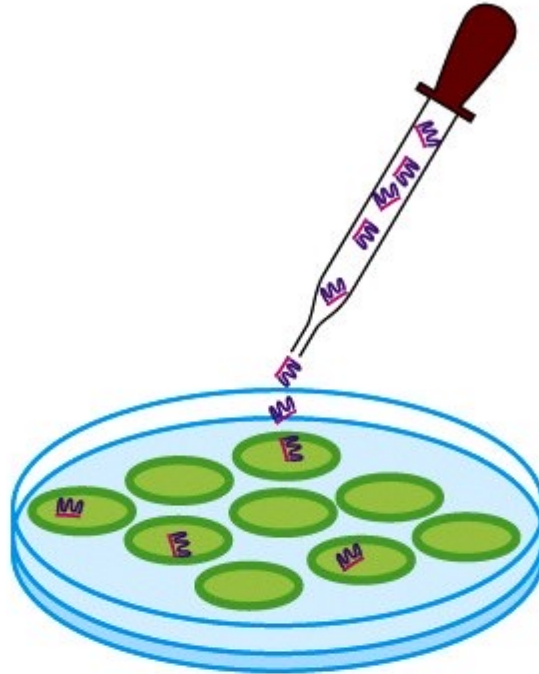




**Step 1b: (eseguito dai docenti):**  
**clonaggio del cDNA di ORF8 nel vettore di espressione**  
**pcDNA3 in fusione con il TAG HA al C terminale**



**Step 2: trasferimento dei vettori di espressione  
in cellule di mammifero**



**Step 3: Analisi della localizzazione subcellulare  
delle proteine virali.**

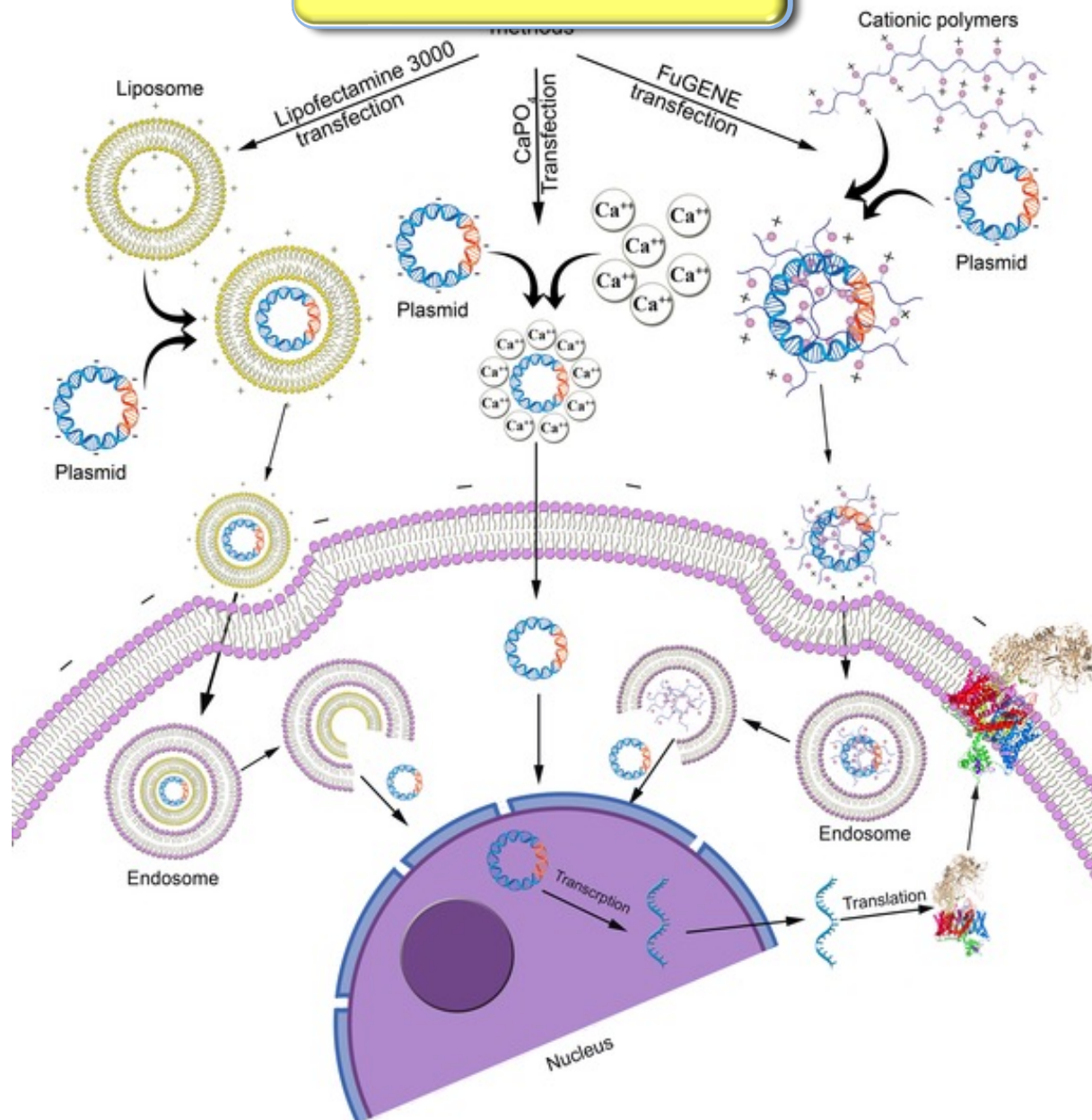
## **TRASFEZIONE:**

**Trasferimento di acidi nucleici (DNA o RNA) in cellule eucariotiche (in coltura o in vivo) mediante metodi fisici o chimici**

## **INFEZIONE:**

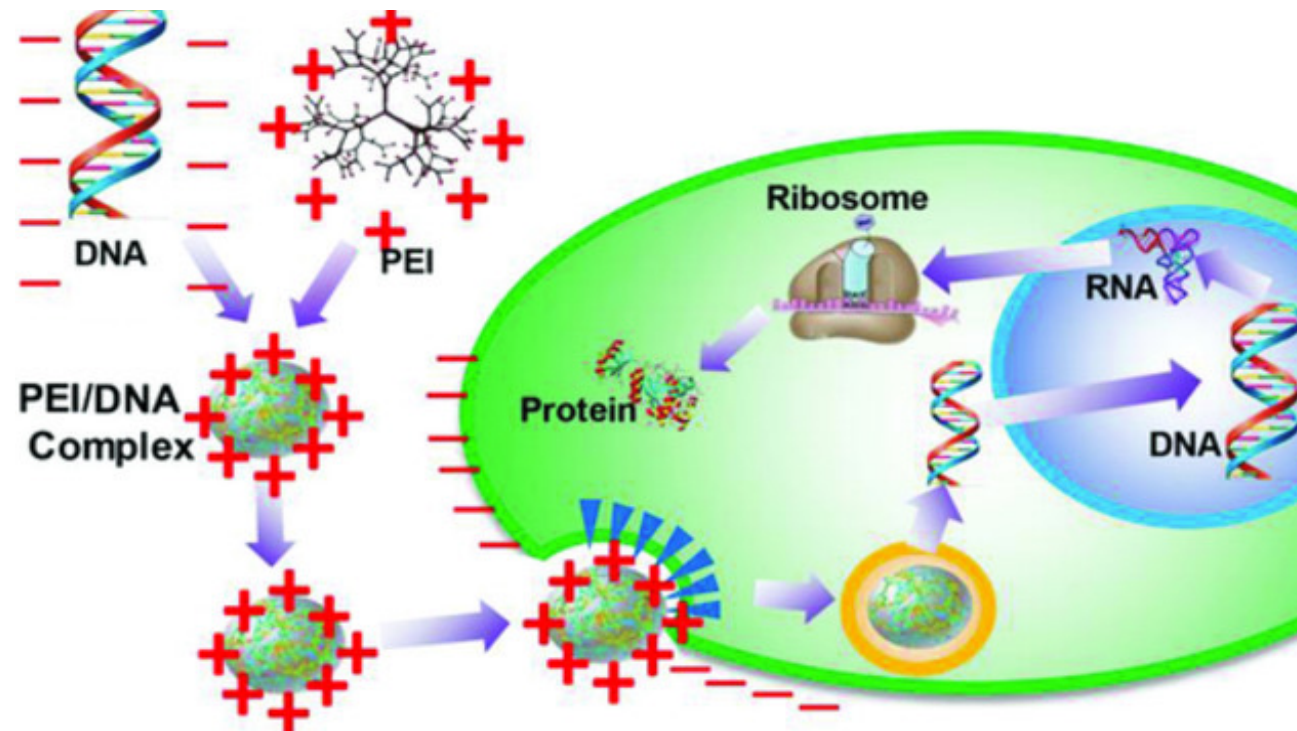
**Procedura per il trasferimento di acidi nucleici mediante infezione di cellule (in coltura o in vivo) con particelle virali contenenti vettori basati su genomi virali modificati (non replicanti)**

# METODI CHIMICI



## Trasfezione con PEI (polietilenimmina)

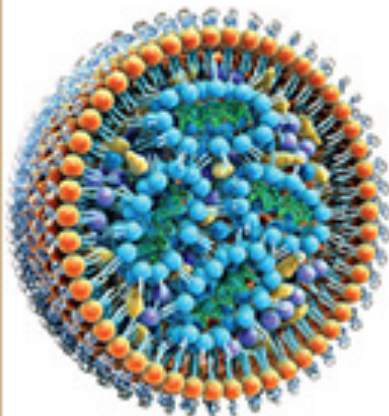
Il DNA viene mescolato al PEI (cationico), si formano dei complessi che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e entrano nelle cellule per **endocitosi**.



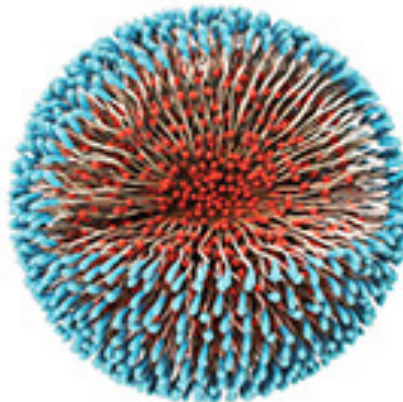


# Trasfezioone mediante LIPOSOMI o NANOPARTICLES

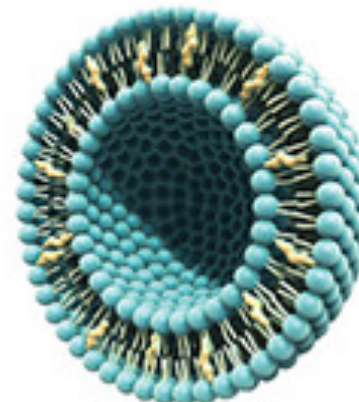
## Versatile Nanomedicine Production



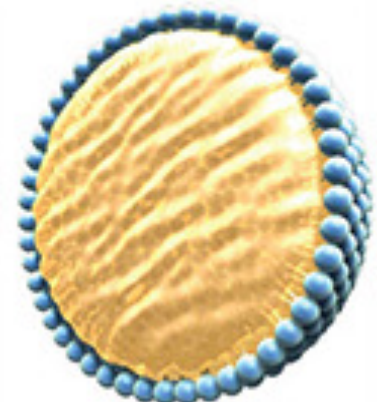
Nucleic Acid  
Lipid Nanoparticles



Polymeric  
Nanoparticles



Liposomes



Emulsions

| sett | data  | Teoria tutti                            | Lab gruppo 1           | Lab gruppo 2           |
|------|-------|-----------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1    | 25-09 | 14-16 Lez 1                             |                        |                        |
|      | 26-09 | 8-10 Lez 2                              | 13-14.30               | 15-16.30               |
| 2    | 02/10 |                                         | 14-18 colture 2D       |                        |
|      | 03/10 | 8-10 Lez 3                              | 13-14 colture 2D       |                        |
| 3    | 9/10  |                                         |                        | 14-18 colture 2D       |
|      | 10/10 | 8-10 Lez 4                              |                        | 13-14 colture 2D       |
| 4    | 16/10 |                                         | 14-18 colture 3D       |                        |
|      | 17/10 | 8-10 Lez 5                              |                        | 14-18 colture 3D       |
| 5    | 23/10 |                                         | 14-15 colture 3D       | 15-16 colture 3D       |
|      | 24/10 | 8-10 Lez 6<br>13-15 Lez 7               |                        |                        |
| 6    | 30/10 |                                         | 14-18 trasfezione      |                        |
|      | 31/10 | 8-10 Lez 8                              | 13-17 IF               |                        |
| 7    | 06/11 |                                         | 14-18 microscopia (1A) | 14-18 trasfezione      |
|      | 07/11 | 8-10 Lez 9                              | 14-18 microscopia (1B) | 13-17 IF               |
| 8    | 13/11 |                                         | 14-18 chemotx          | 14-18 microscopia (2A) |
|      | 14/11 | 8-10 recupero?                          | 13-17 chemotx          | 14-18 microscopia (2B) |
| 9    | 20/11 |                                         |                        | 14-18 chemotx          |
|      | 21/11 | 8-10 Lez 10                             |                        | 13-17 chemotx          |
| 10   | 27/11 |                                         | 14-15.30 morte cell    |                        |
|      | 28/11 | 8-10 Lez 11                             | 13-17 morte cell       |                        |
| 11   | 04/12 |                                         |                        | 14-15.30 morte cell    |
|      | 05/12 |                                         |                        | 13-17 morte cell       |
| 12   | 12/12 | 8-10 Lez 12<br>conclusioni e<br>ripasso |                        |                        |

## Elettroporazione/nucleofezione

La membrana cellulare e quella nucleare sono permeabilizzate mediante l'applicazione di un **campo elettrico**: si formano dei **pori** del diametro di alcuni nm, attraverso i quali può passare il DNA.

Tipo di **cellule**: in adesione e in sospensione

**Efficienza**: alta

**Tossicità** : dipende dallo strumento e dal tipo cell





## Espressione transiente

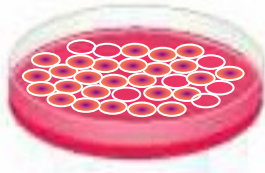
- Il plasmide trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

## Espressione stabile

- Il DNA trasfettato può venir **integrato** nel genoma della cellula ed essere replicato con esso,
- **oppure** può essere mantenuto come **episoma stabile** (se il vettore ha un'**ORI**)
- **L'efficienza** di integrazione varia a seconda del vettore e del tipo cellulare.
- Omogeneità di espressione (ottenimento di cloni stabili)
- Possibilità di effettuare **saggi a lungo termine**.

## Ottenimento di trasfettanti stabili

Per ottenere cellule trasfettate stabilmente è necessario **subclonare** il cDNA di interesse in un **vettore** di espressione per cell eucariotiche che contenga un **gene codificante** per un **marcatore selezionabile**, ad es. **resistenza** ad un **antibiotico** (es. Neomicina).



1. **Trasfezione**



2. **Selezione**: le cellule non trasfettate moriranno



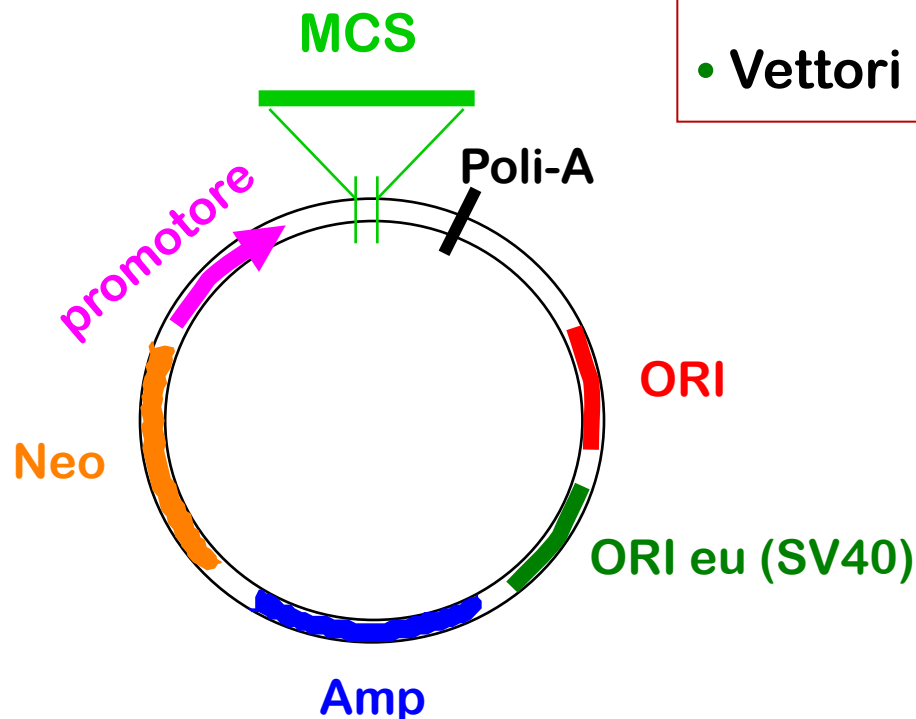
Cloni

Dopo 2 o più settimane...

3. Isolamento di **cloni** di cellule che esprimono la proteina

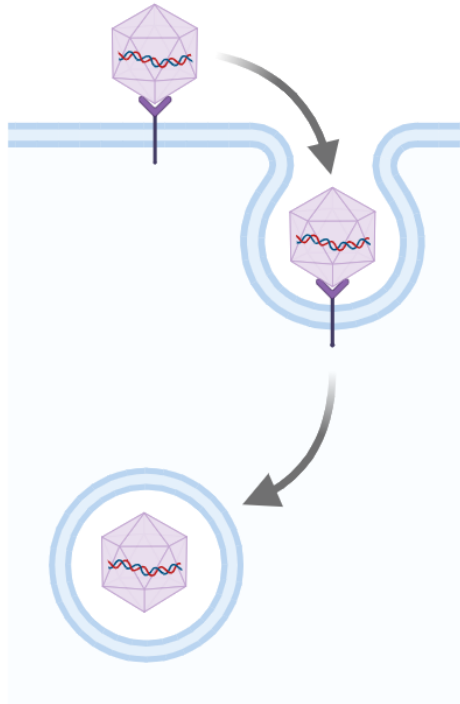
### 3) Caratteristiche facoltative:

- Marker di **selezione** (geni per la resistenza a Neomicina –G418, Puromicina, Hygromicina) per l'ottenimento di cloni stabili
- Sequenze per la **replicazione autonoma** in cellule eucariotiche (**origine** virale)



- Vettori ad integrazione
- Vettori episomiali

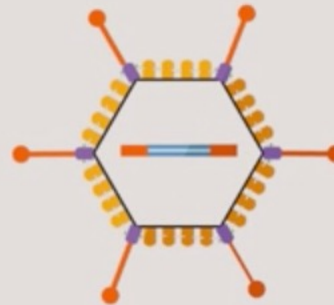
## Trasferimento genico mediato da virus



Retrovirus



Lentivirus



Adenovirus



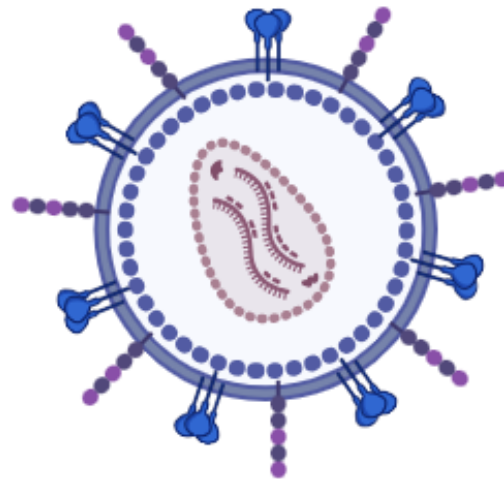
Adeno-associated Virus

**Retrovirus** – possono **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

**Lentivirus** – si integrano anche in cellule **quiescenti**

**Adenovirus e AAV** – infettano anche cellule quiescenti, ma **non** possono **integrarsi** nel genoma cellulare.

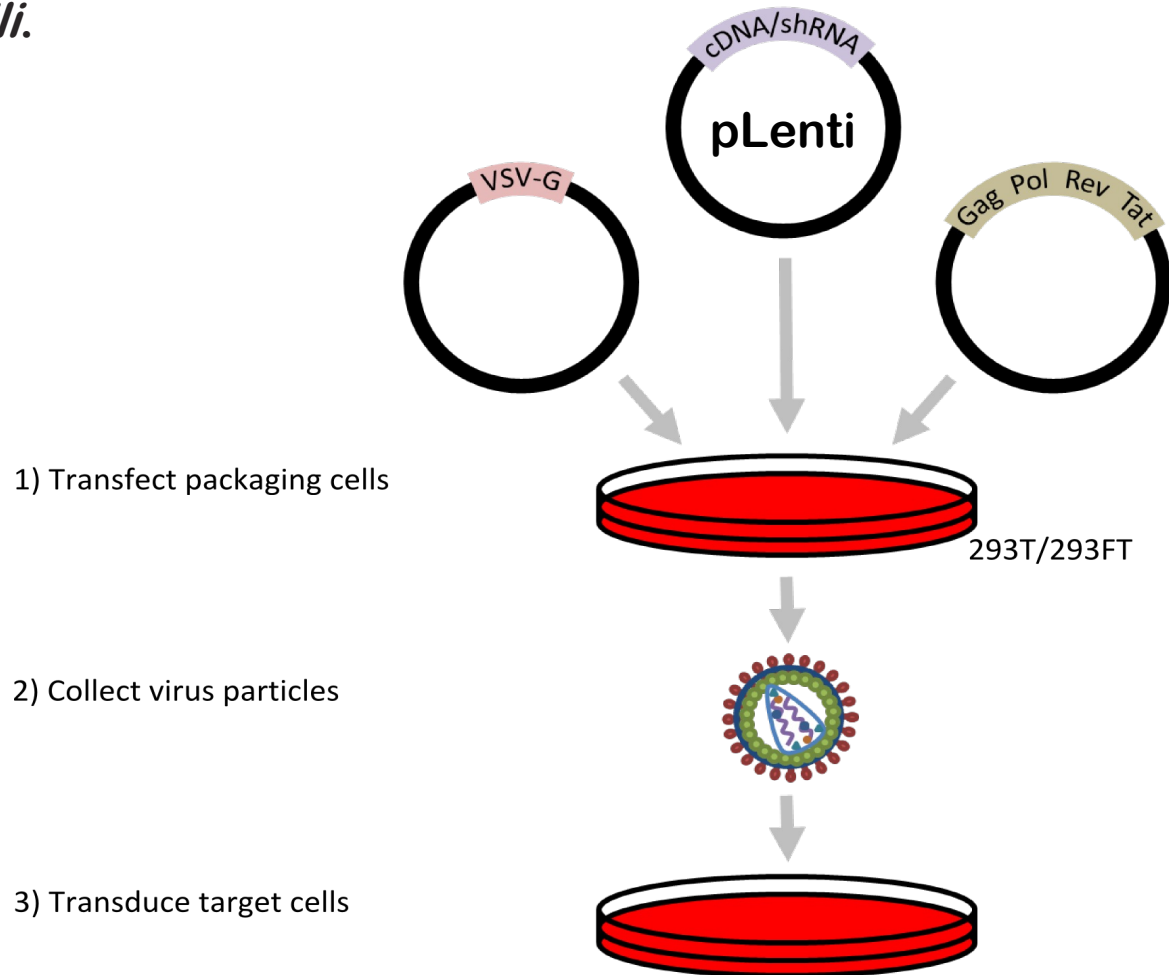
## Vettori derivati da Lentivirus



Lentivirus

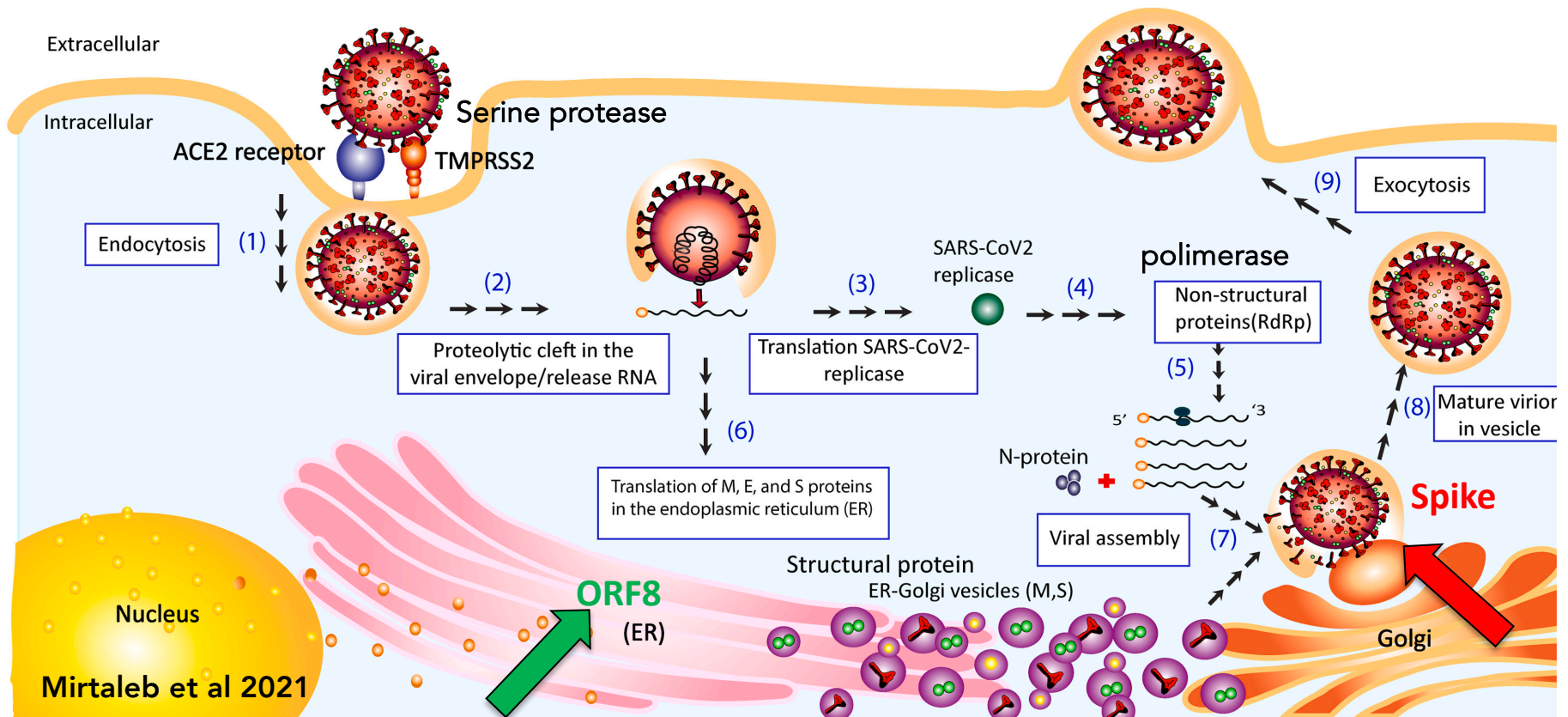
## Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati in particelle infettive** facendo esprimere a cellule “packaging” le proteine del capside virale e la componente enzimatica per la retrotrascrizione o usando *packaging cell lines stabili*.





## Step 3: Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine virali.



## **Alterazione della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.**

**Step 1c:**

**mutagenesi del vettore di espressione di ORF8:**

**generazione dei vettori di espressione**

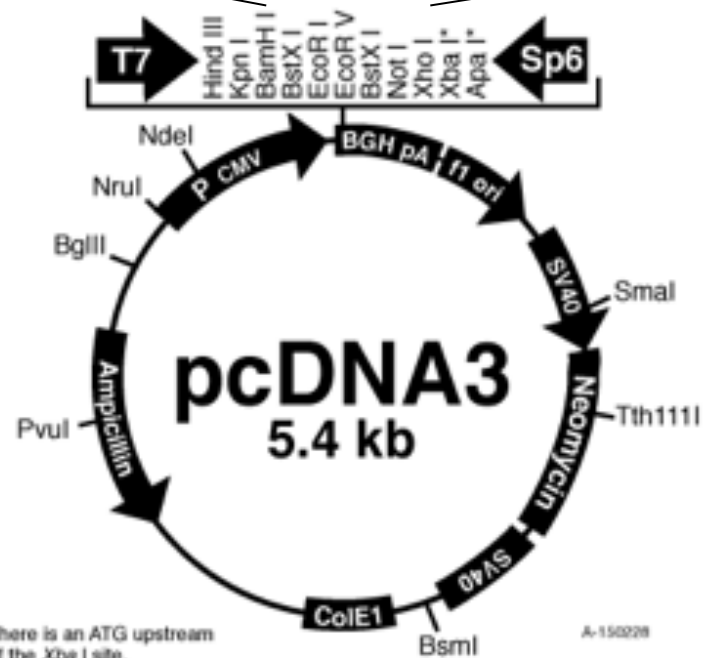
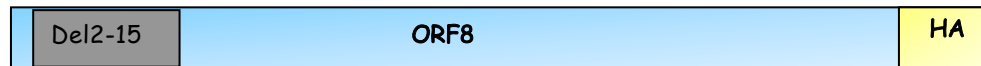
**ORF8  $\Delta$ SS**

**ORF8  $\Delta$ SS-NLS**

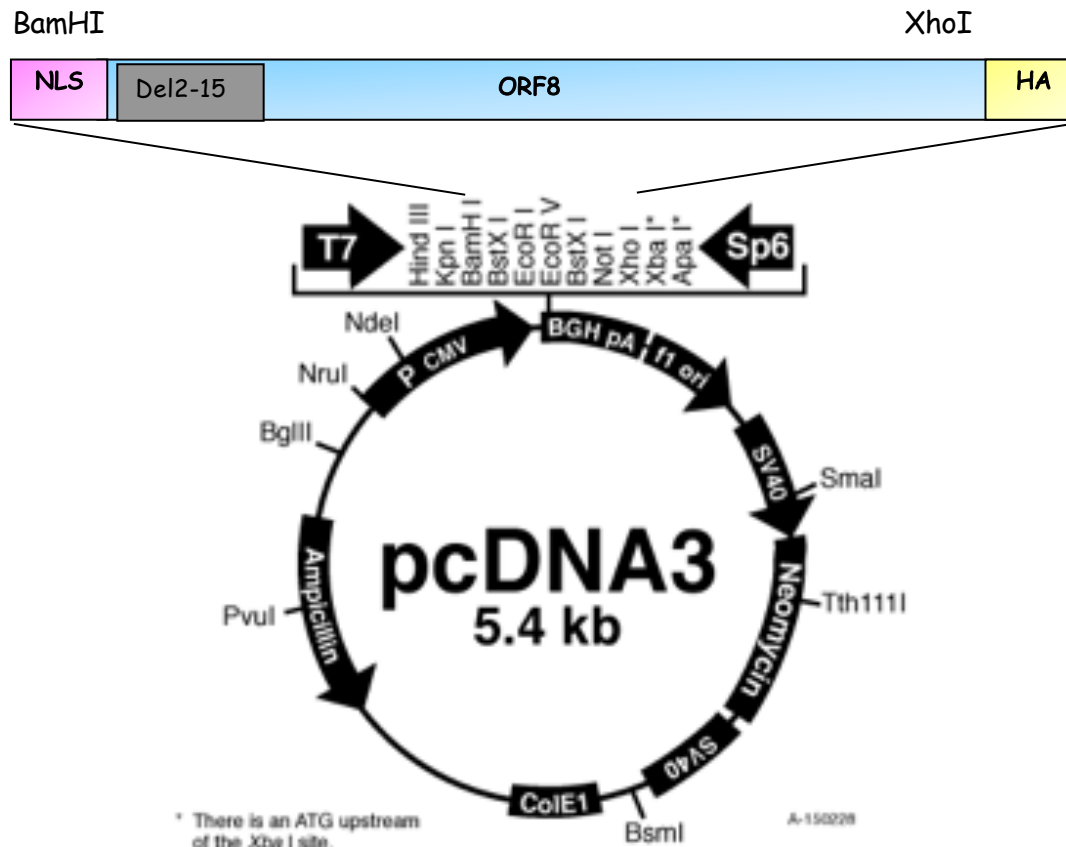
# pcDNA3 ORF8 ΔSS-HA

BamHI

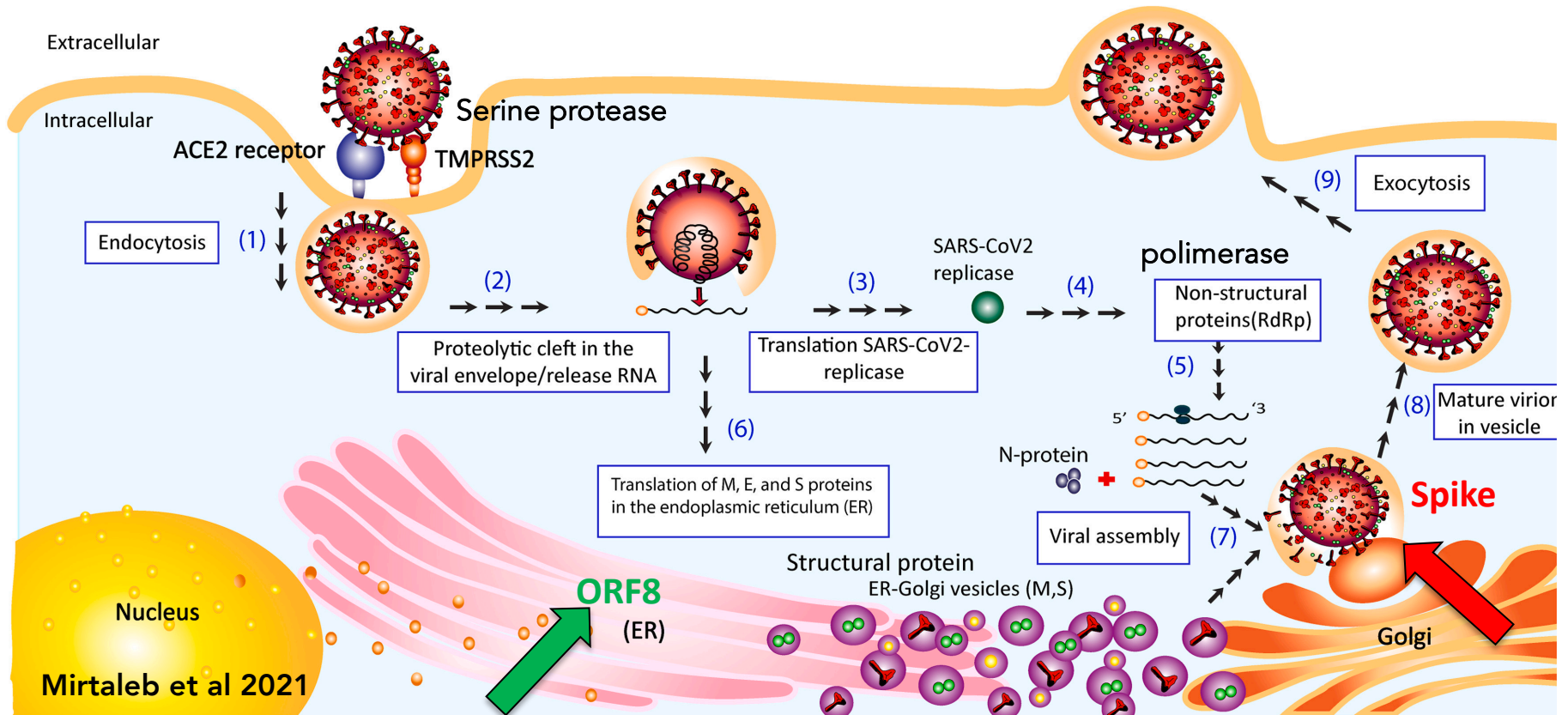
XhoI



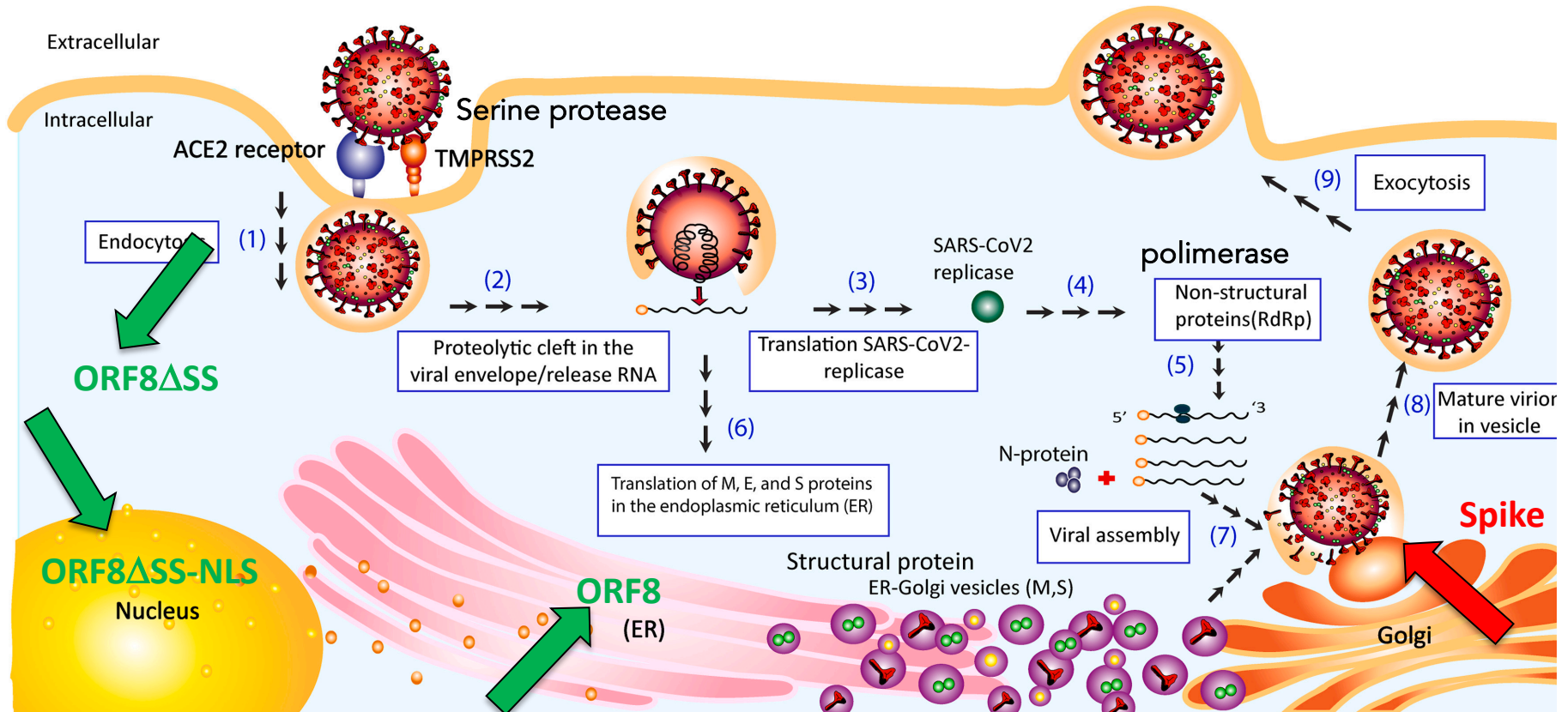
# pcDNA3 NLS ORF8 $\Delta$ SS-HA



# Alterazione della localizzazione subcellulare delle proteine virali.

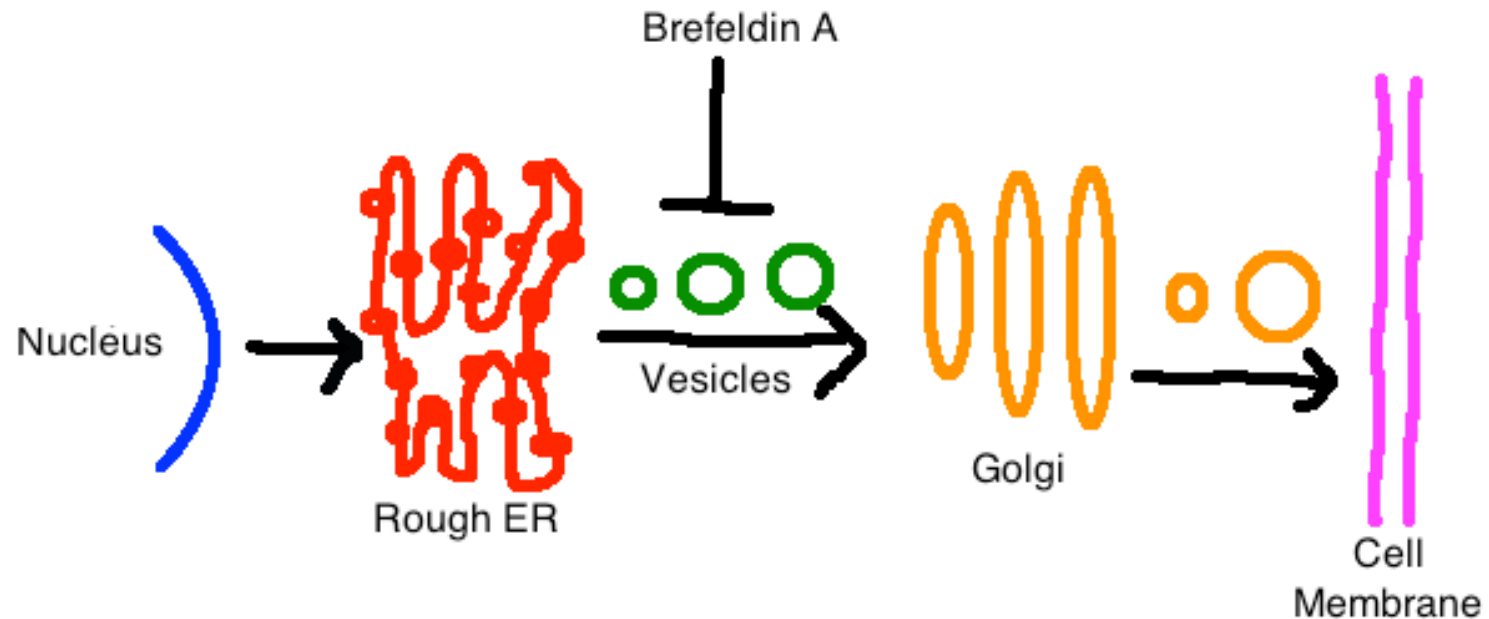


# Alterazione della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.

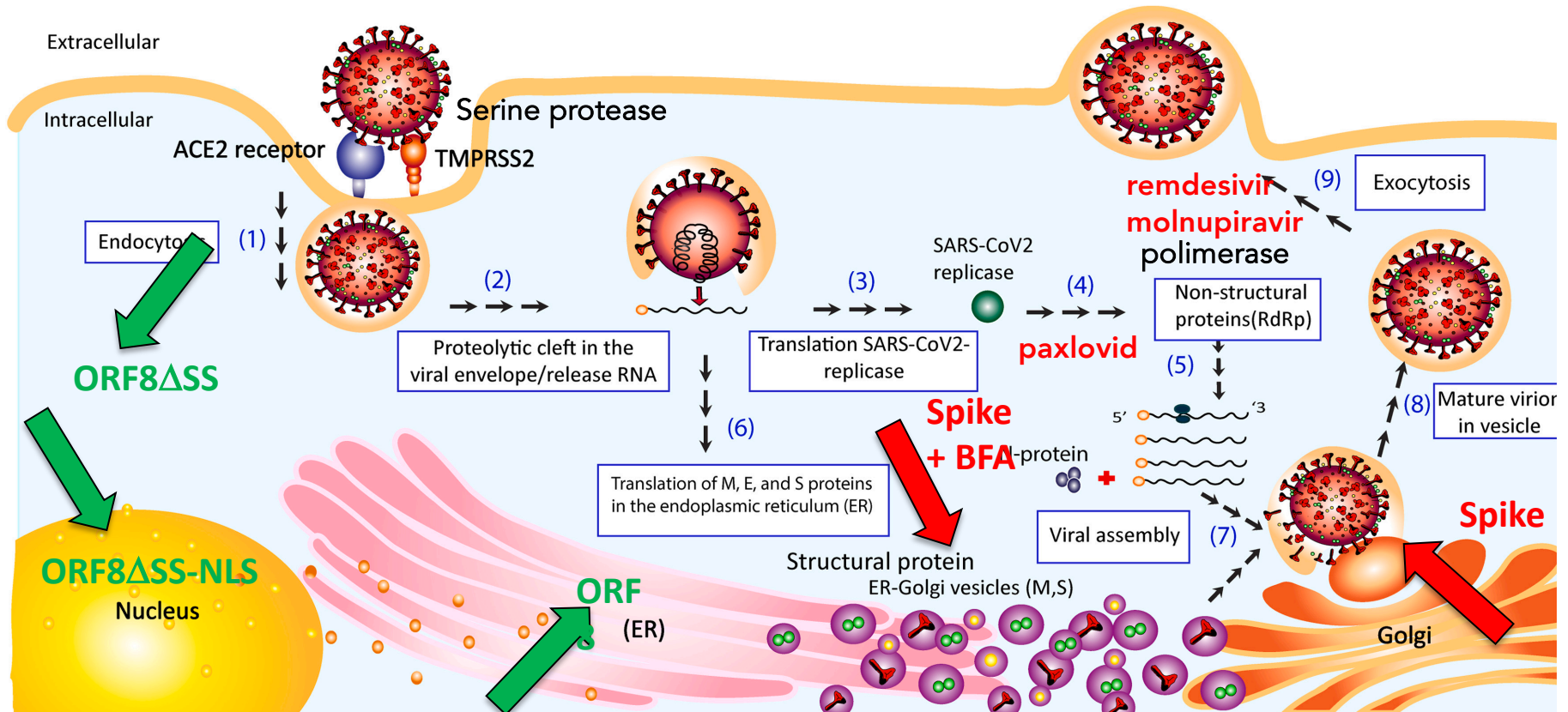




**Step 2b: trattamento del trasfettante SPIKE con inibitori del trasporto vescicolare ER-GOLGI (Brefeldin A)**

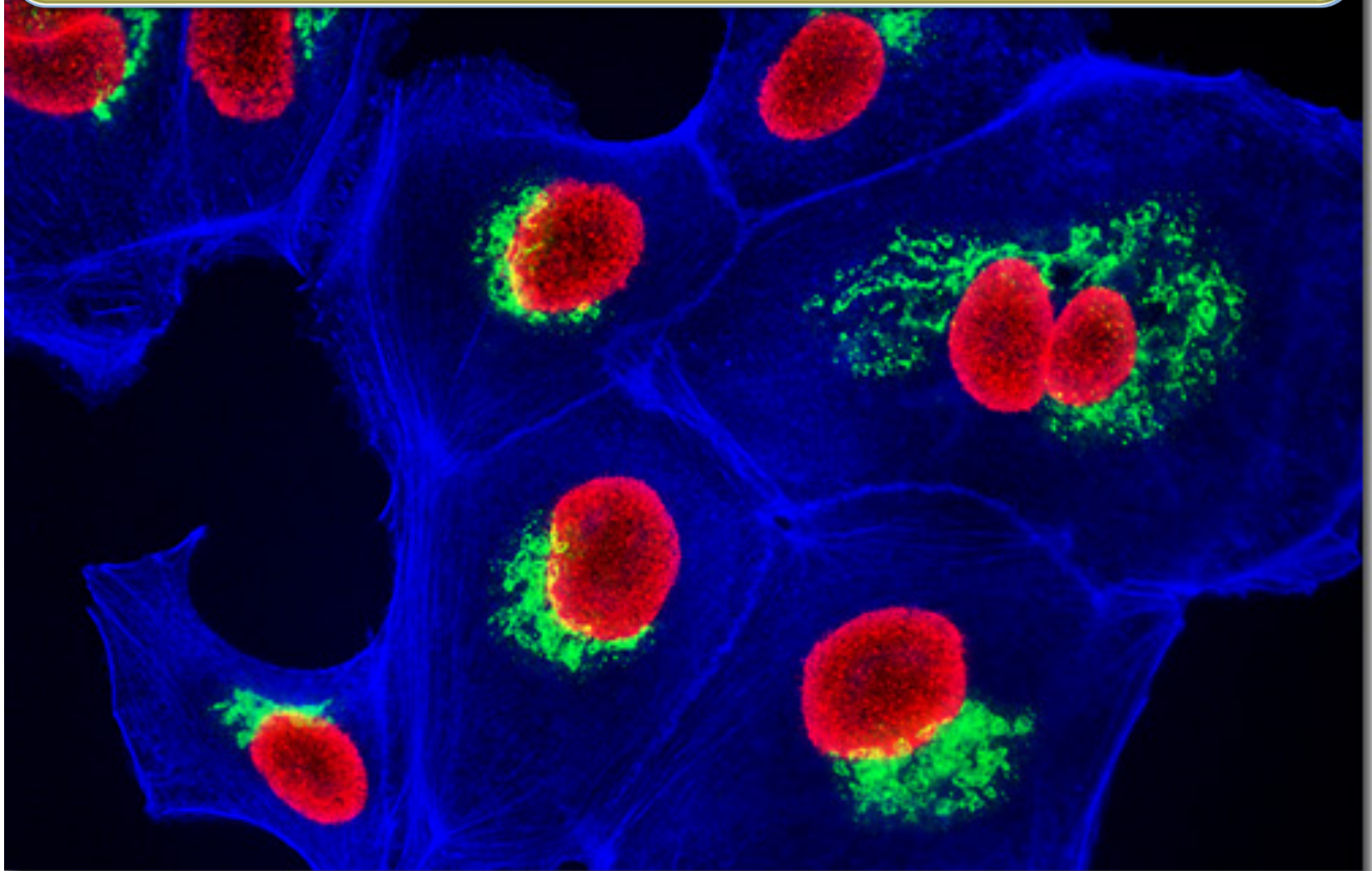


# Analisi della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.





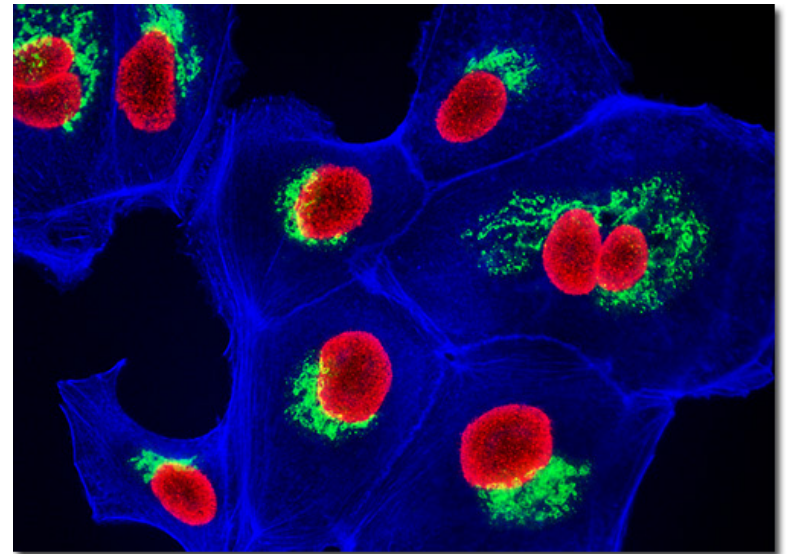
## **Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine virali in situ**



# APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

---

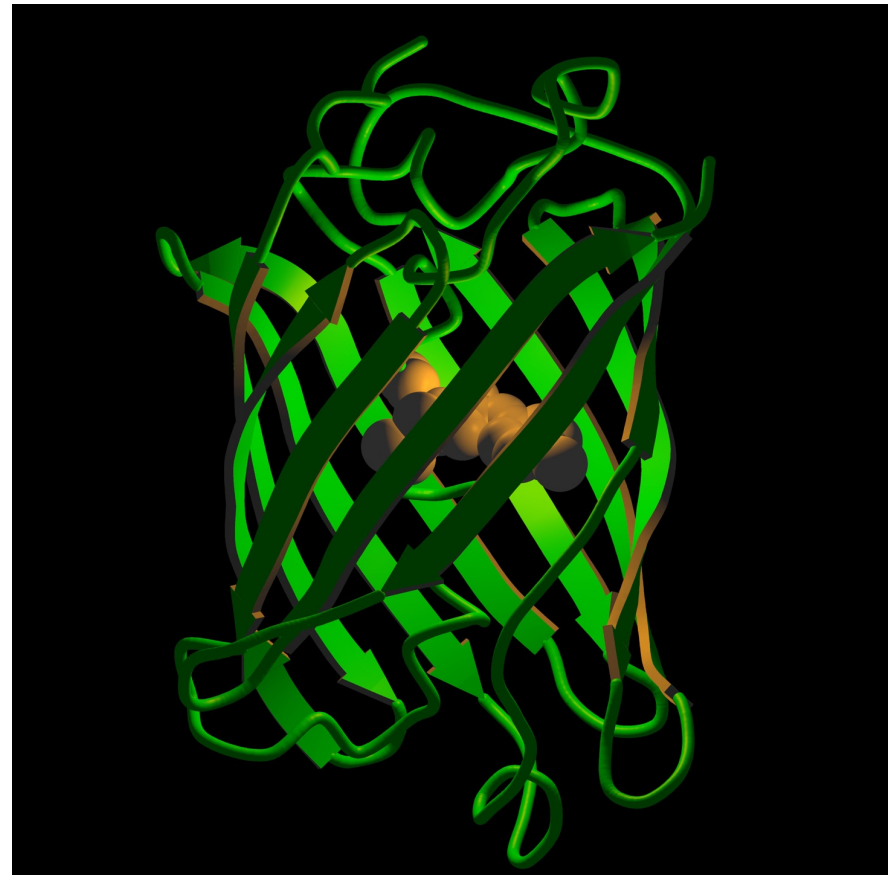
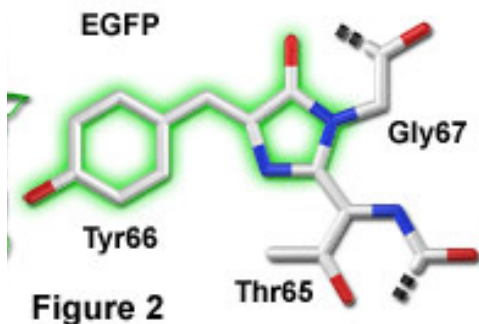
1. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
2. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE
3. SCELTA DEI SAGGI e STRUMENTI



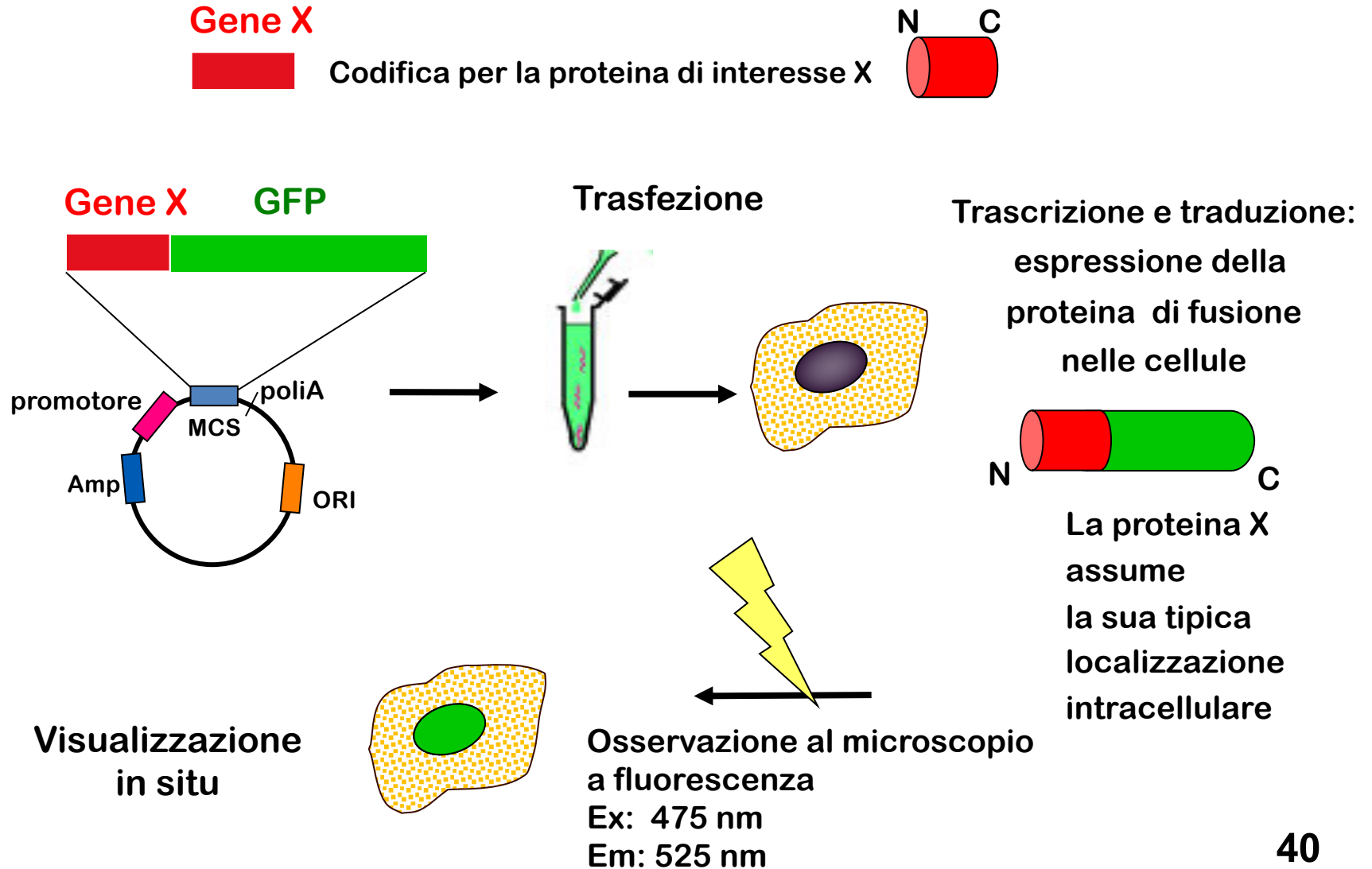
# APPROCCIO #1: Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter

## GFP = Green Fluorescent Protein

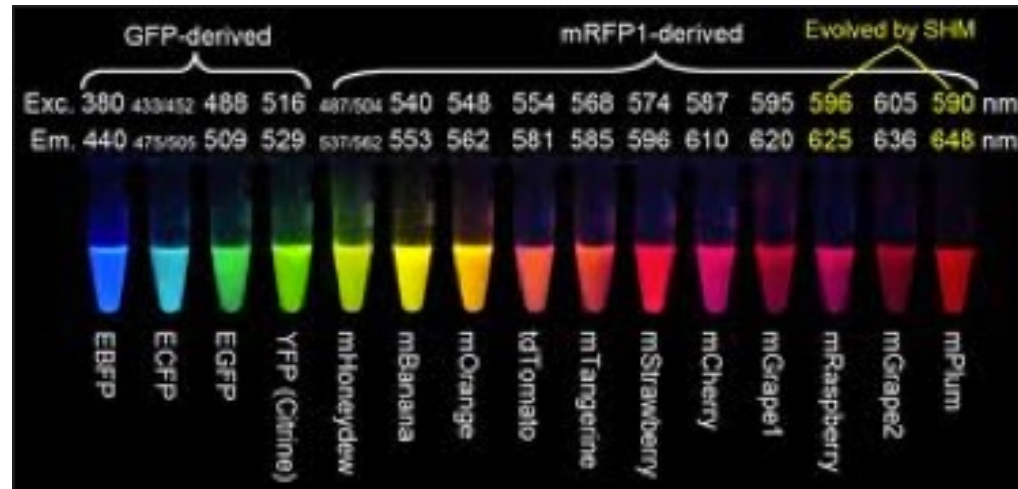
- ◆ Proteina di circa 27 Kda isolata dalla medusa *Aequora victoria*
- ◆ Assorbe ed emette nel **visibile**  
Osservazione al microscopio a fluorescenza  
Ex: 475 nm  
Em: 525 nm
- ◆ Il cromoforo è un  
**TRIPLEPTIDE CICLICO**  
codificato nella  
sequenza primaria



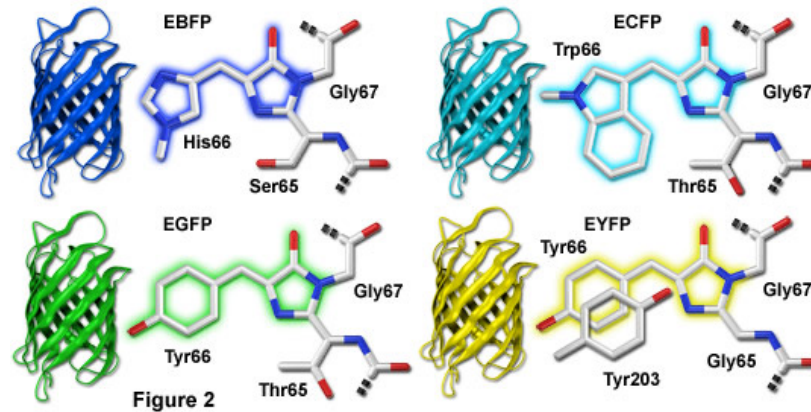
# Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter



# Imaging con reporters fluorescenti (fotoproteine)



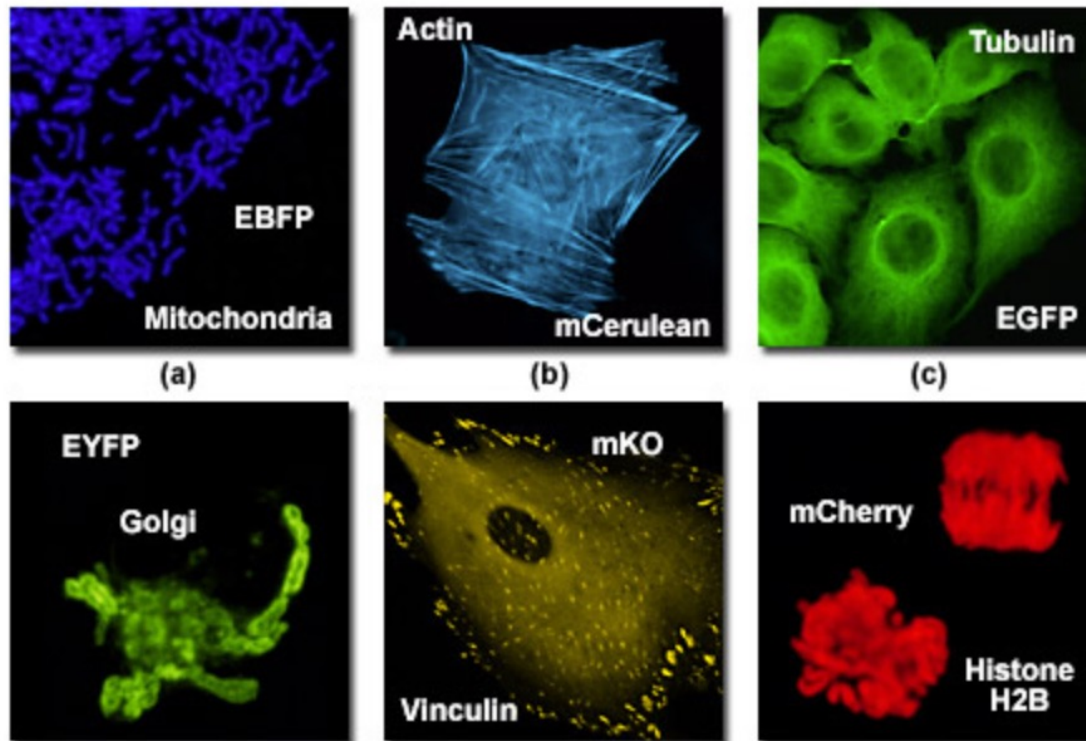
Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants



<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>



## APPROCCIO #1: Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter



Vantaggi:

- 1) Approccio semplice: la proteina chimerica è direttamente visualizzabile
- 2) La proteina chimerica generalmente mantiene la localizzazione subcellulare (GFP non ha segnali propri)
- 3) Possono essere analizzate contemporaneamente molte diverse molecole in base alle caratteristiche dello strumento scelto