



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Biofisica

Genova, Milano, Palermo, Pisa, Trento

OGGETTO: Relazione scientifica Short Term Mobility presso il laboratorio del Prof. T. Jentsch al Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC) a Berlino.

Titolo del Programma: Acquisizione della metodologia CRISPR-Cas9

Ho visitato il laboratorio del professor T. Jentsch per imparare ad usare correttamente il sistema CRISPR-Cas9 che permette il preciso editing di loci genomici e si basa sull'attività programmabile di una endonucleasi che opera su una sequenza specifica. Usando il sistema CRISPR-Cas9 è possibile apportare modifiche genomiche sia in linee cellulari sia in organismi. La tecnica si svolge in circa tre mesi obbligati, dovuti ai tempi di espressione genica e della crescita delle colture cellulari; quindi durante i 21 giorni della Short term mobility ho potuto apprendere i primi passaggi di biologia molecolare e il metodo di screening delle linee cellulari positive.

Nella prima settimana la dottoressa Felizia Voss, mia supervisor, mi ha introdotta a i protocolli di tutti passaggi fondamentali e ho progettato gli oligonucleotidi (sgRNA) sul sito target usando il *genome browsing tool* www.genome-engineering.org. Per il raggiungimento del nostro scopo, cioè ottenere una linea cellulare knockout per i canali del Na endogeni useremo come vettore il plasmide px330. Ho digerito il plasmide con l'enzima di restrizione specifico BbsI e nel frattempo ho anche completato i processi di *annealing*, fosforilazione e ligazione degli oligonucleotidi precedentemente progettati.

Nella seconda e terza settimana ho trasformato una linea di batteri elettrocompetenti con il costrutto derivante dalla ligation degli oligonucleotidi nel plasmide di riferimento, li ho selezionati con un antibiotico specifico, ho inoculato in coltura liquida 10 colonie per ogni mutazione knockout da introdurre nei canali al sodio che vogliamo eliminare (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6), ho estratto il DNA plasmidico e l'ho mandato a sequenziare per isolare i cloni positivi.

Nel frattempo sono stata istruita ai passaggi successivi seguendo il lavoro di un dottorando nello stesso laboratorio che stava ultimando lo screening dei cloni cellulari positivi trasformati con i costrutti plasmidici in grado di indurre stabilmente le mutazioni knockout di interesse in linee cellulari in coltura. Ho imparato a distinguere, in caso di cellule diploidi ma anche poliploidi, i cloni positivi da quelli negativi.

I passaggi intermedi di trasfezione, GFP FACS sorting e amplificazione della coltura cellulare da singola cellula, a cui non ho assistito per mancanza di tempo, sono passaggi standard e non presentano particolari difficoltà tecniche e non richiedono un training specifico. Nelle tre settimane di lavoro sperimentale e teorico ho, quindi, acquisito tutte le competenze necessarie per applicare la tecnica all'Istituto di Biofisica.

Ilaria Zanardi