

# Testi del Syllabus

Resp. Did. **EDOMI PAOLO** **Matricola: 004722**

Docente **EDOMI PAOLO, 6 CFU**

Anno offerta: **2016/2017**

Insegnamento: **220SM - LABORATORIO DI GENETICA**

Corso di studio: **SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE**

Anno regolamento: **2014**

CFU: **6**

Settore: **BIO/18**

Tipo Attività: **B - Caratterizzante**

Anno corso: **3**

Periodo: **Secondo Semestre**

Sede: **TRIESTE**



## Testi in italiano

<b>Lingua insegnamento</b>	Italiano
<b>Contenuti (Dipl.Sup.)</b>	Clonaggio tradizionale e di nuova generazione. Vettori plasmidici, da fago lambda, cosmidi, YAC, PAC e BAC. Librerie genomiche e di cDNA. Phage display e fagmidi.. Esercitazioni in laboratorio: clonaggio in E. coli e display in M13.
<b>Testi di riferimento</b>	- Reece. Analisi di geni e genomi. Edises - Brown. Biotecnologie molecolari. Zanichelli - Primrose, Twyman, Old. Ingegneria genetica: principi e tecniche. Zanichelli
<b>Obiettivi formativi</b>	Il corso si prefigge di fornire le basi metodologiche del clonaggio molecolare in batteri approfondendo l'esempio del phage display anche tramite esercitazioni di laboratorio.
<b>Prerequisiti</b>	Genetica, biologia molecolare
<b>Metodi didattici</b>	Lezioni frontali in aula, lavoro di gruppo e esperienze di laboratorio
<b>Altre informazioni</b>	Informazioni dettagliate sul sito Moodle del corso
<b>Modalità di verifica dell'apprendimento</b>	Esame scritto con risposte a scelta multipla, valutazione del lavoro di gruppo, test sulle esercitazioni
<b>Programma esteso</b>	Clonaggio molecolare. DNA ricombinante. Processo del clonaggio. Storia del clonaggio. Procedimenti di clonaggio tradizionali. Teoria della ligazione. Efficienza di ligazione. Clonaggio direzionale. Clonaggio mediante PCR. Vettori TA. Clonaggio con topoisomerasi. Screening dei

cloni. Sistemi di clonaggio per ricombinazione. Ricombinasi. Costrutti da ricombinazione. Prodotti delle ricombinasi. Passaggi del clonaggio per ricombinazione. Clonaggio per ricombinazione: pro e contro. Sistema Cre - lox. Sistema FLP FRT. Clonaggio da PCR mediante ricombinasi. Sistema Gateway. Clonaggio Indipendente da Ligazione (LIC). Clonaggio Indipendente da Ligazione e sequenza (SLIC). Clonaggio "seamless". Biologia sintetica. Assemblaggio del DNA secondo Gibson. Clonaggio per estensione circolare della polimerasi (CPEC). Limitazioni SLIC / Gibson / CPEC. Clonaggio mediante GeneArt® e In-Fusion. Assemblaggio Golden Gate. Enzimi di tipo IIS. Librerie combinatoriali. Clonaggio seamless vs restrizione. Assemblaggio di genomi. Clonaggio di un genoma M.genitalium. Vettori plasmidici. Caratteristiche dei plasmidi. Regione Ori. Spettro d'ospite. Numero di copie. Replicazione regolata da RNA. Instabilità plasmidica. Stabilità segregativa. Ripartizione e superavvolgimento. Forme multimeriche. Incompatibilità plasmidica. Preparazione di DNA plasmidico. Separazione per dimensioni e per conformazione. Plasmidi come vettori di clonaggio. Selezione del vettore. Trasformazione. Competenza. Identificazione dei ricombinanti. Marcatori di selezione. Auxotrophic complementation. Selezione con ccdB. Alfa complementazione. Derivati di pBR322. Fago lambda. Genoma e ciclo di lambda. Vettori derivati da fago lambda. Clonaggio in fago lambda. Vettori per inserzione e per sostituzione. Impaccamento del fago lambda. Identificazione di fagi ricombinanti. Selezione con vettori di inserzione e di sostituzione. Cosmidi: caratteristiche, vantaggi e sistema di clonaggio. Librerie genomiche in fago lambda. Clonaggio in cosmidi. YAC (yeast artificial chromosome): assemblaggio, problemi Vettori basati sul fago P1 BAC (bacterial artificial chromosome): caratteristiche, selezione PAC (P1 artificial chromosome) Utilizzo di BAC e PAC. Librerie genomiche: finalità e principi. Caratteristiche delle librerie genomiche. Numero dei cloni. Problema della copertura. Dimensione e rappresentatività della libreria. Problemi legati al clonaggio di DNA genomico. Sistemi RM e metilasi in E. coli. Metilasi Dam e Dcm e clonaggio. Vettori, genomi e numero di cloni. Librerie di cDNA. Clonaggio classico del cDNA. Linker e Adattatori. Clonaggio di cDNA full-length. Sistema SMART. Normalizzazione. Librerie di cDNA da singola cellula. Clonaggio delle varianti dello splicing. Progetti EST. Clonaggio di RNA non codificanti. Mammalian gene collection. Strategie attuali di clonaggio. Tipi di display genico. Test di screening. Clonaggio di espressione. Phage display. M13. Vettori a singolo filamento. Librerie fagiche. Display in M13. Procedure di selezione. Vettori fagmidici. Fago helper. Librerie fagmidiche. Librerie fagmidiche vs fagiche. Sistemi fago helper alternativi. Vettore fagmidico. Applicazioni del phage display. Phage display: fagi filamentosi vs litici. Librerie phage display in lambda. T7 come vettore per Phage display. T7Select Phage Display System. Display in lievito. Display in batteri. In vitro display: display su ribosomi, mRNA e cDNA. Esempi applicativi: - editing genomico; - selezione di ORF; - epitope mapping nella sclerosi multipla.



## Testi in inglese

<b>Lingua insegnamento</b>	Italian
<b>Contenuti (Dipl.Sup.)</b>	Traditional and next-generation cloning. Plasmid vectors. Lambda vectors and cosmids. YAC, PAC e BAC. Genomic and cDNA libraries. Phage display and phagemids. Laboratory practice: cloning in E. coli and display in M13.
<b>Testi di riferimento</b>	- Reece. Analisi di geni e genomi. Edises - Brown. Biotecnologie molecolari. Zanichelli - Primrose, Twyman, Old. Ingegneria genetica: principi e tecniche. Zanichelli - Reece. Genes and genomes analysis. Edises - Brown. Molecular biotechnologies. Zanichelli - Human molecular genetics, Garland - Primrose, Twyman, Old. Genetic engineering: principles and techniques. Zanichelli

<b>Obiettivi formativi</b>	The course analyzes the themes of recombinant DNA technology regarding the cloning vectors in bacteria, and in particular the phage display technology, using practical examples in the laboratory.
<b>Prerequisiti</b>	Genetics, molecular biology
<b>Metodi didattici</b>	Classroom lessons, working group, and laboratory practice
<b>Altre informazioni</b>	Detailed information on the Moodle web site
<b>Modalità di verifica dell'apprendimento</b>	Written exam with multiple choice answers, evaluation of the work group, test on the laboratory experiences
<b>Programma esteso</b>	<p>Molecular cloning. Recombinant DNA. Fragment preparation. Recombinant vector. Basic cloning process. History of cloning. Traditional cloning procedures. Theory of ligation. Efficiency of ligation. Directional cloning. PCR cloning. Cloning of an insert of PCR. TA vectors. Cloning with topoisomerase. PCR cloning systems. Colony screening. Recombinational cloning systems. Recombinase. Constructs by recombination. Products of the recombinase. Recombinational cloning step. Recombinational cloning pros and cons. Cre - lox. Fip- FRT system. Cloning by PCR using recombinase. Gateway system. Ligation Independent Cloning (LIC). LIC pro and cons. Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC). SLIC advantages. Seamless cloning. Synthetic Biology. Seamless cloning pros and cons. Gibson DNA assembly. Circular polymerase extension cloning (CPEC). SLIC / Gibson / CPEC limitations. GeneArt® and In-Fusion® Seamless Cloning. Golden Gate assembly. Type enzymes IIS. Golden gate pro and cons. Combinatorial libraries. Seamless vs Restriction. Assembling genomes. Cloning of a M.genitalium genome. Plasmid vectors. Features of the plasmids. Classification of plasmids. Types of plasmids. Ori region. Host range. Number of copies. Replication regulated by RNA. Plasmid instability. Segregative stability. Maintenance and supercoiling. Multimeric forms. Plasmid incompatibility. Preparation of plasmid DNA. Separation by size and conformation. Plasmids as cloning vectors. Vector selection. Transformation. Competence. Identification of recombinants. Selection markers. Auxotrophic complementation. Selection with ccdB. Alpha complementation. Derivatives of pBR322. Lambda phage. Genome and cycle lambda. Forms of lambda DNA. Vectors derived from phage lambda. Cloning in lambda phage. Vectors for insertion and replacement. Introduction of phages in bacteria. Packing of lambda phage. Identification of recombinant phages. Selection with insertion vectors. Selection by Spi phenotype. Selection with replacemente vectors. Cosmids: features, benefits and system cloning. Genomic Libraries in lambda phage. Cloning in cosmids. YAC (yeast artificial chromosome): assembly, problems. Vectors based on phage P1. BAC (bacterial artificial chromosome): characteristics, selection. PAC (P1 artificial chromosome). Using BAC and PAC. Genomic libraries: purposes and principles. Features of genomic libraries. Number of clones. Coverage problem. Size and representativeness of the library. Problems related to the cloning of genomic DNA. RM systems and methylase in E. coli. Dam and Dcm methylase and cloning. Vectors, genomes and number of clones. cDNA libraries. Classical cDNA library cloning. Linker and adapters. Full-lenght cDNA cloning. SMART system. Normalization. Single cell cDNA libraries. Cloning of splicing variants. EST projects. Short and long ncRNA cloning. Mammalian gene collection. Universal cloning strategies. Display categories. Screening assays. Expression cloning. Phage display. M13. Vectors, single-stranded. Phage libraries. Display in M13. Selection procedures. Phagemid. Helper phage. Phagemid library. Phagemid vs phage libraries. Alternative helper phage systems. Phagemid vector. Applications of phage display. Filamentous vs. lytic phage display. Lambda phage display libraries. T7 as display vector.</p>

T7Select Phage Display System. Yeast surface display. Microbial cell display. In vitro display: ribosome, mRNA, and cDNA display. Specific examples: - Genomic editing; - ORF selection; - epitope mapping in multiple sclerosis.