

Testi del Syllabus

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

Docente **EDOMI PAOLO, 6 CFU**

Anno offerta: **2017/2018**

Insegnamento: **642SM - GENETICA APPLICATA**

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

Anno regolamento: **2015**

CFU: **6**

Settore: **BIO/18**

Tipo Attività: **B - Caratterizzante**

Anno corso: **3**

Periodo: **Secondo Semestre**

Sede: **TRIESTE**



Testi in italiano

Lingua insegnamento Italiano

Contenuti (Dipl.Sup.) I PARTE: Tecnologie di clonaggio Vettori plasmidici Clonaggio tradizionale: ligazione Clonaggio "seamless" Clonaggio mediante ricombinazione Esempi: Clonaggio di genomi. Editing genomico II PARTE: Librerie geniche e genomiche Librerie genomiche Librerie di cDNA Librerie per sequenziamento e Next Generation Sequencing Esempio: ORF selection III PARTE: Phage display Display in M13 Cenni su altri sistemi di display Applicazioni del phage display Esempio: Epitope mapping Esercitazioni in laboratorio Mutagenesi e subclonaggio di una forma deleta del gene GFP: confronto tra metodologie di clonaggio Clonaggio e selezione di una minilibreria genica in phage display

Testi di riferimento - Reece. Analisi di geni e genomi. Edises- Brown. Biotecnologie molecolari. Zanichelli- Primrose, Twyman, Old. Ingegneria genetica: principi e tecniche. Zanichelli

Obiettivi formativi Il corso si prefigge di fornire le basi metodologiche del clonaggio molecolare e della generazione di librerie geniche in batteri approfondendo l'esempio del phage display anche tramite esercitazioni di laboratorio. Conoscenza e comprensione: - acquisire le basi metodologiche del clonaggio in batteri; - conoscere le componenti e le funzioni dei vettori per il clonaggio; - distinguere i diversi protocolli di clonaggio; - conoscere le basi metodologiche della generazione di librerie geniche; - conoscere i moderni sistemi di sequenziamento; - apprendere le basi del sistema phage display e suo utilizzo. Capacità di applicare conoscenza e comprensione: gli studenti anche tramite le attività di laboratorio e di gruppo sapranno interpretare ed applicare protocolli per il clonaggio molecolare, progettare procedure sperimentali di base per il clonaggio, scegliere strategie diverse di clonaggio in batteri; inoltre impareranno ad operare in laboratorio e ad interagire mediante attività di gruppo

Prerequisiti	Genetica, biologia molecolare
Metodi didattici	Lezioni frontali in aula, lavoro di gruppo e esperienze di laboratori
Altre informazioni	Informazioni dettagliate sul sito Moodle del corso
Modalità di verifica dell'apprendimento	Esame scritto con risposte a scelta multipla e brevi domande aperte, valutazione del lavoro di gruppo, test sulle esercitazioni
Programma esteso	<p>1. Clonaggio molecolare. Concetto di DNA ricombinante. Storia del clonaggio. 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. Procedimenti di clonaggio tradizionali. Teoria della ligazione. Efficienza di ligazione. Clonaggio direzionale. Clonaggio mediante PCR. Vettori TA. Clonaggio con topoisomerasi. Plasmidi come vettori di clonaggio. Selezione del vettore. Trasformazione. Competenza. Identificazione dei ricombinanti. Marcatori di selezione. Auxotrophic complementation. Selezione con ccdB. Alfa complementazione. Sistemi di clonaggio per ricombinazione. Costrutti da ricombinazione. 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. Assemblaggio Golden Gate. Enzimi di tipo IIS. Librerie combinatoriali. Clonaggio seamless vs restrizione. Esempi applicativi. Assemblaggio di genomi. Clonaggio di un genoma M.genitalium. Principio del gene editing. Sistema CRISPR-Cas9.2. Librerie. Librerie genomiche: finalità e caratteristiche. 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. Cenni su vettori fagici, cosmidi, YAC e BAC. 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. Esempio applicativo: Librerie ORF. Orfeoma.3. Phage display. Tipi di display genico. Clonaggio di espressione. Vettori M13. Display in M13. Procedure di selezione. Vettori fagmidici. Fago helper. Librerie fagmidiche e fagiche. Sistemi fago helper alternativi. Applicazioni del phage display. Librerie phage display in lambda e T7. Display in lievito. Display in batteri. In vitro display. Esempio applicativo: epitope mapping.</p>



Testi in inglese

	Italian
	<p>I. Cloning Technologies Plasmid vectors Traditional cloning: ligation "Seamless" Cloning Cloning by recombination Examples: Cloning of genomes. Genomic editing II. Gene and genomic libraries Genome libraries cDNA libraries Sequencing Libraries and Next Generation Sequencing Example: ORF selection III. Phage display Display in M13 Other</p>

display systems Phage display applications Example: Epitope mapping Laboratory exercises Mutagenesis and Subcloning of a deleted GFP Gene: comparison of cloning Methods Cloning and selection of a gene minilibrary in phage display

- Reece. Genes and genomes analysis. Edises- Brown. Molecular biotechnologies. Zanichelli- Primrose, Twyman, Old. Genetic engineering: principles and techniques. Zanichelli

The aim of the course is to provide the methodological bases for molecular cloning and generation of gene libraries in bacteria in particular by the example of the phage display technology, using practical examples in the laboratory. Knowledge and understanding:- to acquire the methodological bases of cloning in bacteria;- to know the components and functions of cloning vectors;- to distinguish between the different cloning protocols;- to know the methodological bases of generating gene libraries;- to know the modern sequencing systems;- to learn the basics of the phage display system and its use. Ability to apply knowledge and understanding: students will also be able to interpret and apply molecular cloning protocols, to design basic procedures for cloning, and to choose the strategy for bacterial cloning by means of laboratory and group activities. They will also learn to work in a lab and to interact in a group.

Genetics, molecular biology

Classroom lessons, working group, and laboratory practice

Detailed information on the Moodle web site

Written exam with multiple choice answers and short essay questions, evaluation of the work group, test on the laboratory experiences

1. Molecular cloning. Recombinant DNA. History of cloning. Plasmid vectors. Features of the plasmids. Ori region. Host range. Number of copies. Replication regulated by RNA. Plasmid instability. Segregative stability. Maintenance and supercoiling. Multimeric forms. Plasmid incompatibility. Traditional cloning procedures. Theory of ligation. Efficiency of ligation. Directional cloning. PCR cloning. TA vectors. Cloning with topoisomerase. Plasmids as cloning vectors. Vector selection. Transformation. Competence. Identification of recombinants. Selection markers. Auxotrophic complementation. Selection with ccdB. Alpha complementation. Recombinational cloning systems. Constructs by recombination. Recombinational cloning step. Recombinational cloning pros and cons. Cre - lox. FLP- FRT system. Cloning by PCR using recombinase. Gateway system. Ligation Independent Cloning (LIC). Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC). Seamless cloning. Synthetic Biology. Gibson DNA assembly. Circular polymerase extension cloning (CPEC). SLIC / Gibson / CPEC limitations. Golden Gate assembly. Type II enzymes. Combinatorial libraries. Seamless vs Restriction. Application: assembling genomes; cloning of a *M. genitalium* genome. Gene editing. CRISPR/Cas9 system. 2. Libraries. Genomic libraries: purposes and features. 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. Phage vectors, cosmids, YAC and BAC. Vectors, genomes and number of clones. cDNA libraries. Classical cDNA library cloning. Linker and adapters. Full-length 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. Application: ORF libraries. 3. Phage display. Display categories. Expression cloning. M13 Vectors. Display in M13.

Selection procedures. Phagemid. Helper phage. Phagemid vs phage libraries. Alternative helper phage systems. Applications of phage display. Lambda and T7 phage display libraries. Yeast surface display. Microbial cell display. In vitro display. Application: epitope mapping.