

Testi del Syllabus

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

Docente **EDOMI PAOLO, 6 CFU**

Anno offerta: **2018/2019**

Insegnamento: **642SM - GENETICA APPLICATA**

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

Anno regolamento: **2016**

CFU: **6**

Settore: **BIO/18**

Tipo Attività: **B - Caratterizzante**

Anno corso: **3**

Periodo: **Secondo Semestre**



Testi in italiano

Lingua insegnamento

Italiano

Contenuti (Dipl.Sup.)

I PARTE: Vettori plasmidici. Biologia dei plasmidi. Trasformazione batterica.
II PARTE: Clonaggio tradizionale: ligazione. Clonaggio "seamless". Clonaggio mediante ricombinazione.
III PARTE: Phage display. Display in M13. Fagmidi. Applicazioni del phage display. Epitope mapping.
IV PARTE: Librerie genomiche. Concetto di copertura e numero di cloni. Sintesi del cDNA. Librerie di cDNA.
V PARTE: Librerie ORF. Editing genomico. Next Generation Sequencing.

Esercitazioni in laboratorio
Mutagenesi e subclonaggio di una forma deleta del gene GFP
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
- Materiale e link indicati sul sito Moodle del corso

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, utilizzare strumenti bioinformatici relativi ai contenuti del corso, consultare banche dati e siti dedicati all'ingegneria genetica; inoltre impareranno ad operare in laboratorio e ad interagire mediante attività di gruppo.

Autonomia di giudizio

L'autonomia di giudizio viene sviluppata tramite la preparazione all'esame, che necessita della rielaborazione e assimilazione individuale del materiale presentato in aula; questo obiettivo sarà raggiunto anche tramite la proposta di un lavoro di gruppo finalizzato alla soluzione di un esperimento di clonaggio e tramite le attività di laboratorio che consisteranno nello svolgimento di progetti scientifici in cui lo studente imparerà ad applicare un protocollo e analizzare criticamente i risultati di un esperimento.

Abilità comunicative

Le lezioni e le attività di laboratorio saranno svolte incentivando gli studenti a interagire ai fini di migliorare il lessico scientifico, sapere strutturare domande e argomentare le proprie tesi. Il test scritto prevede delle domande aperte in cui lo studente dovrà dimostrare capacità di rielaborazione delle conoscenze apprese. Durante le attività di laboratorio sono proposti dei quesiti volti a verificare la comprensione e la valutazione critica dei protocolli applicati. Inoltre il lavoro di gruppo previsto stimola le capacità di discussione e interazione con colleghi.

Capacità di apprendimento

La capacità di apprendimento è stimolata dall'approfondimento delle conoscenze apprese durante le lezioni frontali, dallo svolgimento delle attività di laboratorio mediante la lettura critica dei protocolli sperimentali e dalla proposta della soluzione di un problema scientifico tramite un lavoro di gruppo sotto la supervisione del docente. Le capacità di apprendimento saranno verificate nell'ambito delle diverse modalità di valutazione previste.

Prerequisiti

Genetica, biologia molecolare; concetti di base sugli enzimi di restrizione e sulla PCR.

Metodi didattici

Lezioni frontali in aula, lavoro di gruppo con la supervisione del docente e esperienze di laboratorio.

Altre informazioni

Informazioni dettagliate sono presenti sul sito Moodle del corso.

Modalità di verifica dell'apprendimento

Esame scritto con risposte a scelta multipla e domande aperte, valutazione del lavoro di gruppo, quesiti durante le esercitazioni di laboratorio sull'attività svolta. Il voto finale deriva da una media pesata delle tre modalità di valutazione come illustrato nel sito Moodle del corso.

Programma esteso

1. Vettori plasmidici. Caratteristiche dei plasmidi. Regione Ori. Spettro d'ospite. Numero di copie. Replicazione regolata da RNA. Instabilità plasmidica. Stabilità segregativa. Ripartizione e funzione par. Forme multimeriche. Incompatibilità plasmidica. Plasmidi come vettori di clonaggio. Selezione del vettore. Trasformazione. Competenza. Identificazione dei ricombinanti. Marcatori di selezione. Auxotrophic complementation. Selezione con ccdB. Alfa complementazione.

2. Clonaggio molecolare. Concetto di DNA ricombinante. Storia del clonaggio.

Procedimenti di clonaggio tradizionali. Teoria della ligazione. Efficienza di ligazione. Clonaggio direzionale. Clonaggio mediante PCR. Vettori TA. Clonaggio con topoisomerasi.

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 "seamless".

Biologia sintetica. Assemblaggio del DNA secondo Gibson. Pro e contro del clonaggio "seamless". Assemblaggio Golden Gate. Enzimi di tipo IIS. Librerie combinatoriali. Clonaggio seamless vs restrizione. Esempio: assemblaggio di genomi. Clonaggio di un genoma *M. genitalium*.

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. Librerie phage display in lambda e T7. Display in lievito. In vitro display. Applicazioni del phage display. Epitope mapping.

4. 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 di RNA non codificanti. Mammalian gene collection. Strategie attuali di clonaggio.

5. Applicazioni e aggiornamenti

Orfeoma. Problemi nel clonaggio di sequenze ORF. Metodi di clonaggio di sequenze ORF in phage display. ORF selection in T7. Sistema pJun-Fos. ORF enrichment in phage display. Selezione di ORF con beta-lattamasi. Genome editing. Sistema CRISPR/Cas. Genome editing con CRISPR/Cas9. Varianti di Cas9. Altri utilizzi di CRISPR/Cas9.

Next generation sequencing. Generazione di librerie per NGS. Emulsion PCR. Amplificazione in solido e liquido. Sequencing by ligation and by synthesis. Long-read sequencing.



Testi in inglese

Italian

I. Plasmid vectors. Biology of the plasmids. Bacterial transformation.
 II. Traditional cloning: ligation. "Seamless" Cloning. Cloning by recombination.
 III. Phage display. Display in M13. Phagemids. Phage display applications. Epitope mapping.
 IV. Genomic libraries. Coverage and number of clones. cDNA synthesis and libraries.
 V. ORF libraries. Genome editing. Next Generation Sequencing.

Laboratory exercises

Mutagenesis and Subcloning of a deleted GFP Gene.

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

- Material and links on Moodle site

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.

Applying knowledge and understanding.

By means of laboratory and group work, the students will be able to interpret and apply molecular cloning protocols, to design basic procedures for cloning, to choose the strategy for bacterial cloning, to use bioinformatics tools related to the contents of the course, to consult databases and sites dedicated to genetic engineering. They will also learn to work in a lab and to interact in a group.

Making judgements .

The independence of judgment is developed by the preparation for the exam, which requires the assimilation of the material presented in the classroom; these autonomy will be achieved by the work group in which the students will learn to solve a laboratory problem and by the activities in laboratory in which the students will learn to apply a protocol and to critically analyze the results of an experiment.

Communication skills

Lectures and laboratory activities are carried out by encouraging students to interact with the purpose of improving the scientific vocabulary, to structure questions and to argue their theses. The written test includes open questions in which the student will demonstrate the ability to rework the learned knowledge. During the laboratory activities, the students answer to questions to critically evaluate the applied protocols. In addition, the group work stimulates discussion and interaction skills with colleagues.

Learning skills

The ability to learn is stimulated by the deepening of the resources assimilated during the lectures, the carrying out of laboratory activities through the reading of the experimental protocols and the solution of a scientific problem through a group work under the supervision of the teacher. Learning skills will be tested by different evaluation methods.

Genetics, molecular biology, fundamentals of restriction enzymes and PCR.

Classroom lessons, working group, and laboratory practice.

Detailed information on the Moodle web site

Written exam with multiple choice answers and open questions, evaluation of group work, questions during the laboratory exercises. The final grade results from a weighted average of the three evaluation methods indicated on the Moodle website of the course.

1. Plasmid vectors. Features of the plasmids. Ori region. Host range. Number of copies. Replication regulated by RNA. Plasmid instability. Segregative stability. Par function. Multimeric forms. Plasmid incompatibility. Plasmids as cloning vectors. Vector selection. Transformation. Competence. Identification of recombinants. Selection markers. Auxotrophic complementation. Selection with ccdB. Alpha complementation.

2. Molecular cloning. Recombinant DNA. History of cloning. Traditional cloning procedures. Theory of ligation. Efficiency of ligation. Directional cloning. PCR cloning. TA vectors. Cloning with topoisomerase. 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). Seamless cloning. Synthetic Biology. Gibson DNA assembly. Pro and cons of the seamless cloning. Golden Gate assembly. Type enzymes IIS. Combinatorial libraries. Seamless vs Restriction. Application: assembling genomes; cloning of a M.genitalium genome.

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. Lambda and T7 phage display libraries. Yeast surface display. In vitro display. Applications of phage display. Epitope mapping.

4. 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. Short and long ncRNA cloning. Mammalian gene collection. Universal cloning strategies.

5. Applications and updating.

Orfeome. Problems in the cloning of ORF sequences. Cloning methodologies of ORF sequences in phage display. ORF selection in T7. pJun-Fos system. ORF enrichment in phage display. ORF selection by beta-lactamase.

Genome editing. CRISPR/Cas system. Genome editing with CRISPR/Cas9. Variants of Cas9. Other uses of CRISPR/Cas9 system.

Next generation sequencing. Libraries for sequencing. Emulsion PCR. Sequencing by ligation. Sequencing by synthesis. Long-read sequencing.