

Testi del Syllabus

Resp. Did.	EDOMI PAOLO	Matricola: 004722
Anno offerta:	2015/2016	
Insegnamento:	220SM - LABORATORIO DI GENETICA	
Corso di studio:	SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE	
Anno regolamento:	2013	
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.)	Vettori plasmidici. Vettori da fago lambda e cosmidi. Librerie genomiche e vettori YAC, PAC e BAC. Phage display e fagmidi. Clonaggio tradizionale e di nuova generazione. Esercitazioni in laboratorio: clonaggio in E. coli e display in M13.
Testi di riferimento	<ul style="list-style-type: none">- Reece. Analisi di geni e genomi. Edises- Brown. Biotecnologie molecolari. Zanichelli- Primrose, Twyman, Old. Ingegneria genetica: principi e tecniche. Zanichelli
Obiettivi formativi	Il corso approfondisce le tematiche della tecnologia del DNA ricombinante riguardanti i vettori per il clonaggio in batteri, il phage display e recenti sistemi di clonaggio molecolare, utilizzando degli esempi pratici in laboratorio.
Prerequisiti	Genetica, biologia molecolare
Metodi didattici	Lezioni frontali in aula e esperienze di laboratorio
Altre informazioni	Informazioni dettagliate sul sito Moodle del corso
Modalità di verifica dell'apprendimento	Esame scritto con risposte a scelta multipla
Programma esteso	Vettori plasmidici. Caratteristiche dei plasmidi. Classificazione dei plasmidi. Tipi di 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. Forme del DNA di lambda. Vettori derivati da fago lambda. Clonaggio in fago lambda. Vettori per inserzione e per sostituzione. Introduzione di fagi in batteri. Impaccamento del fago lambda. Identificazione di fagi ricombinanti. Selezione con vettori di inserzione. Selezione in base al fenotipo Spi. Selezione con vettori di sostituzione. Cosmidi: caratteristiche, vantaggi e sistema di clonaggio.

Librerie genomiche: finalità e principi. Caratteristiche delle librerie genomiche. Numero dei cloni. Problema della copertura. Dimensione e rappresentatività della libreria. Frammenti da restrizione. Frammentazione di DNA: metodi fisici e enzimatici PFGE (Pulse field gel electrophoresis) Utilizzo di istoni di archeobatteri per la frammentazione del DNA Problemi legati al clonaggio di DNA genomico 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 Vettori, genomi e numero di cloni.

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.

Clonaggio molecolare. DNA ricombinante. Preparazione del frammento. Vettore ricombinante. Processo di clonaggio di base. Storia del clonaggio. Procedimenti di clonaggio tradizionali. Teoria della ligazione. Efficienza di ligazione. Clonaggio direzionale. Modificazione dei terminali. Linker. Adattatori. Polimerasi. Formazione di terminali blunt. Clonaggio mediante PCR. Clonaggio di un inserto di PCR. Vettori TA. Clonaggio con topoisomerasi. Sistemi di clonaggio per PCR. Screening dei cloni. Sistemi RM e metilasi in E. coli. Metilasi Dam e Dcm e clonaggio. Restrizione e clonaggio Mcr / Mrr e clonaggio.

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. Recombineering.

Clonaggio Indipendente da Ligazione (LIC). LIC: pro e contro. Clonaggio Indipendente da Ligazione e sequenza (SLIC). Vantaggi della SLIC. Clonaggio "seamless". Biologia sintetica. Clonaggio "seamless": pro e contro. 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. Golden gate: pro e contro. Librerie combinatoriali. Clonaggio seamless vs restrizione. Assemblaggio di genomi. Clonaggio di un genoma M.genitalium.

Esempio applicativo: epitope mapping nella sclerosi multipla.



Testi in inglese

Lingua insegnamento	Italian
Contenuti (Dipl.Sup.)	Plasmid vectors. Lambda vectors and cosmids. Genomic libraries and YAC, PAC e BAC. Phage display and phagemids. Traditional and next-generation cloning. Laboratory practice: cloning in E. coli and display in M13.
Testi di riferimento	<ul style="list-style-type: none"> - 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

Obiettivi formativi The course analyzes the themes of recombinant DNA technology regarding the cloning vectors in bacteria, the phage display and the recent molecular cloning systems, using practical examples in the laboratory.

Prerequisiti Genetics, molecular biology

Metodi didattici Classroom lessons and laboratory practice

Altre informazioni Detailed information on the Moodle web site

Modalità di verifica dell'apprendimento Written exam with multiple choice answers

Programma esteso

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 replacement vectors. Cosmids: features, benefits and system cloning.

Genomic libraries: purposes and principles. Features of genomic libraries. Number of clones. Coverage problem. Size and representativeness of the library. Restriction Fragments. DNA fragmentation: physical and enzymatic methods. PFGE (Pulse field gel electrophoresis). Use of histones archaea for DNA fragmentation. Problems related to the cloning of genomic DNA. 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. Vectors, genomes and number of clones.

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. T7Select Phage Display System.

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. Modification of the terminals. Linker. Adapters. Polymerase. Formation of terminal blunt. PCR cloning. Cloning of an insert of PCR. TA vectors. Cloning with topoisomerase. PCR cloning systems. Colony screening. RM systems and methylase in E. coli. Dam and Dcm methylase and cloning. Restriction and cloning Mcr / Mrr and cloning.

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. Recombineering.

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. Application example: epitope mapping in multiple sclerosis. Laboratory practices:

- Mutagenesis and subcloning of a deleted form of the GFP gene;
- Cloning and selection of gene mini library in phage display.