

Data: _____ Studente: _____

ESERCITAZIONE II

Disciplina: Biologia e genetica (CI) – Docente: A. Piovesan – Tutor: L. Pampanella

1) Quali frammenti sono attesi dalla digestione di questo plasmide con i seguenti enzimi di restrizione?

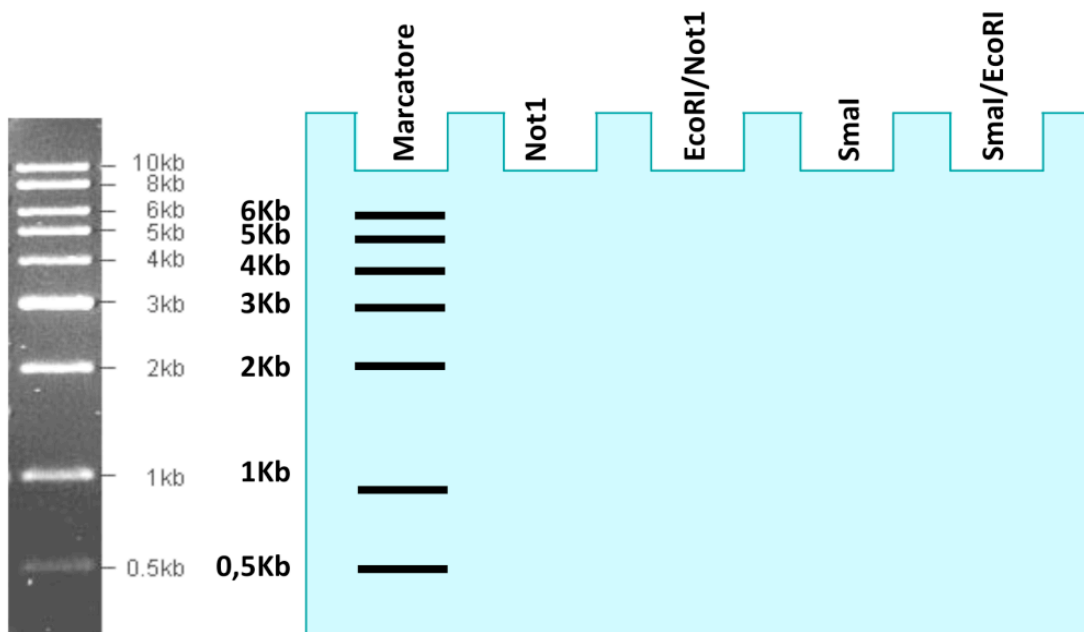
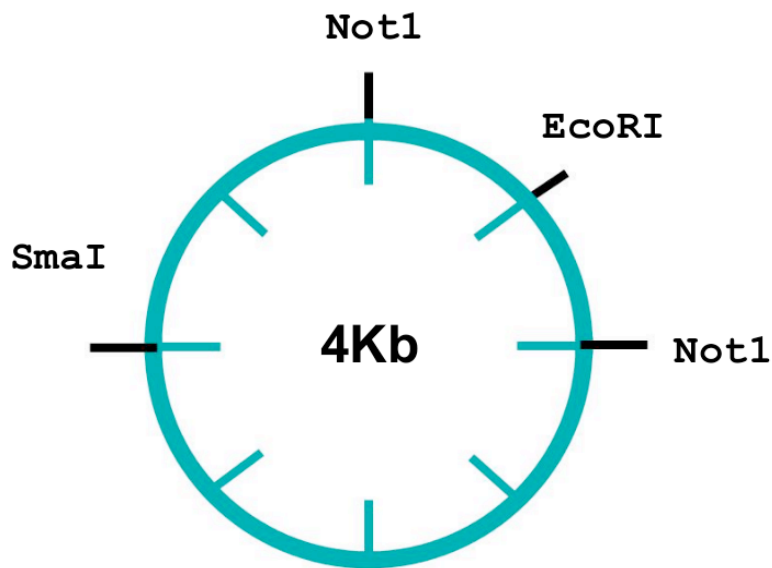
Not1

Not1/EcoRI

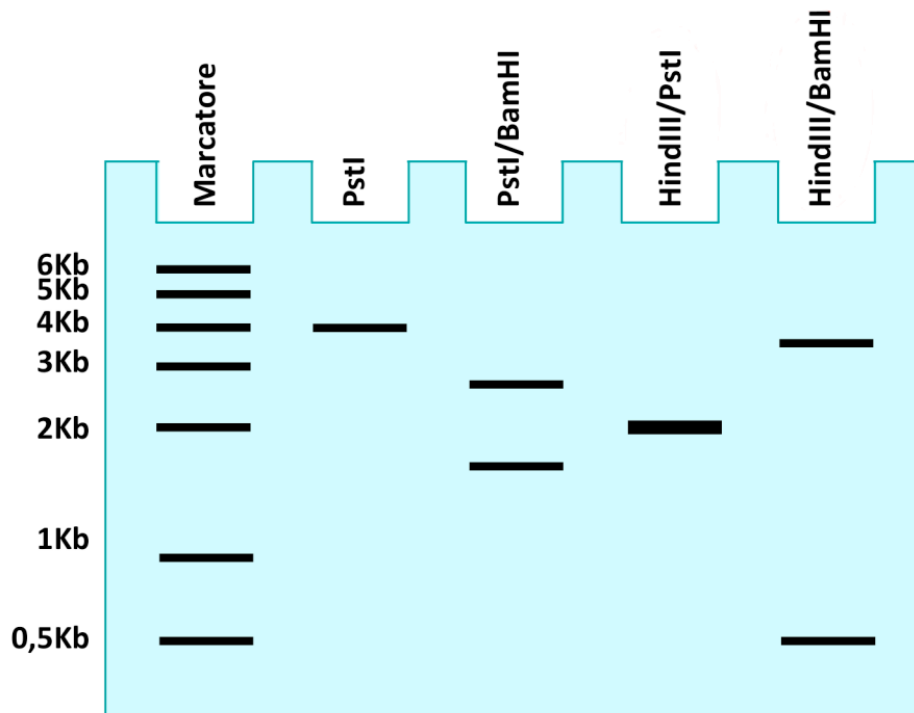
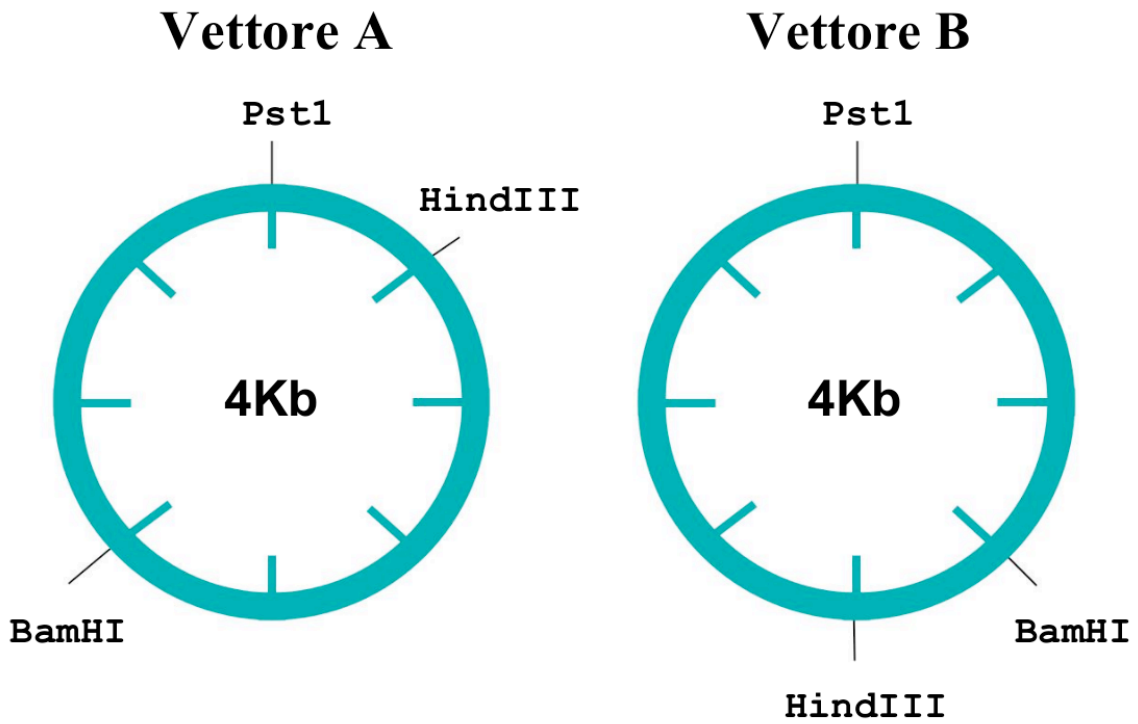
SmaI

SmaI/EcoRI

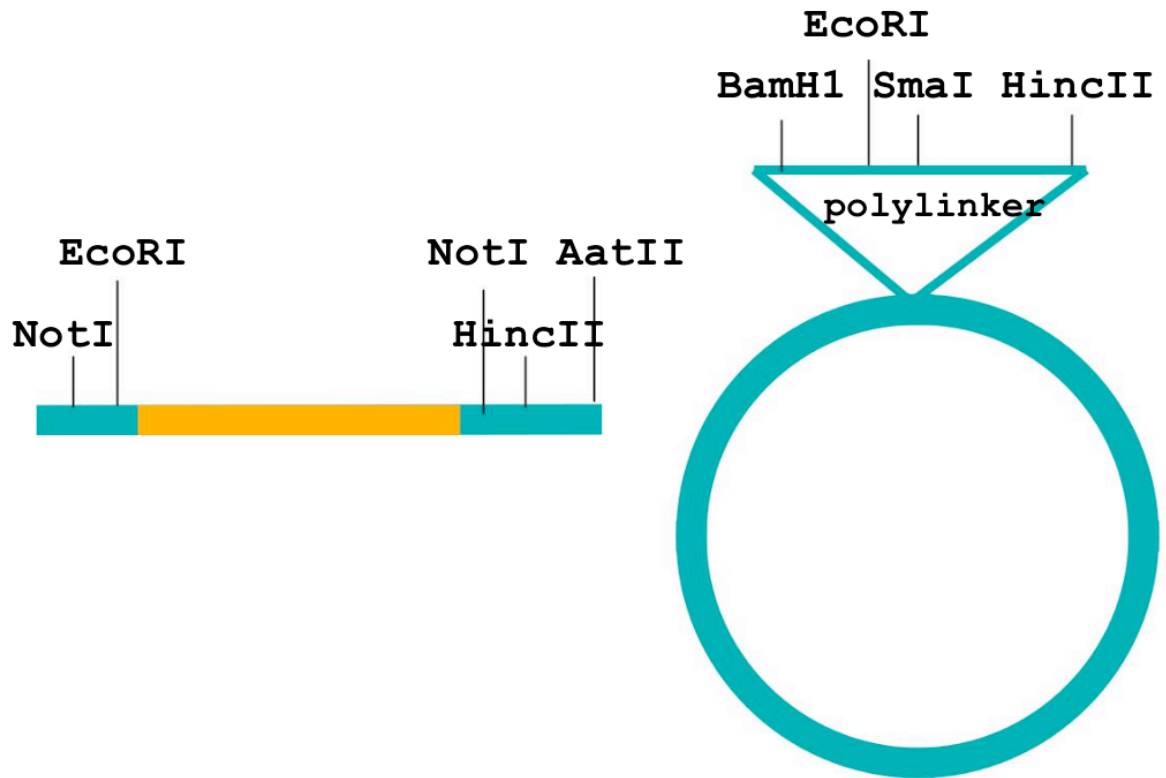
Disegna i frammenti attesi sul gel.



2) Abbiamo il dubbio di aver scambiato le provette contenenti i due vettori disegnati sotto. Per distinguerli (sono della stessa dimensione) dobbiamo fare una mappa di restrizione. Quale digestione mi permette di discriminare tra i due vettori?

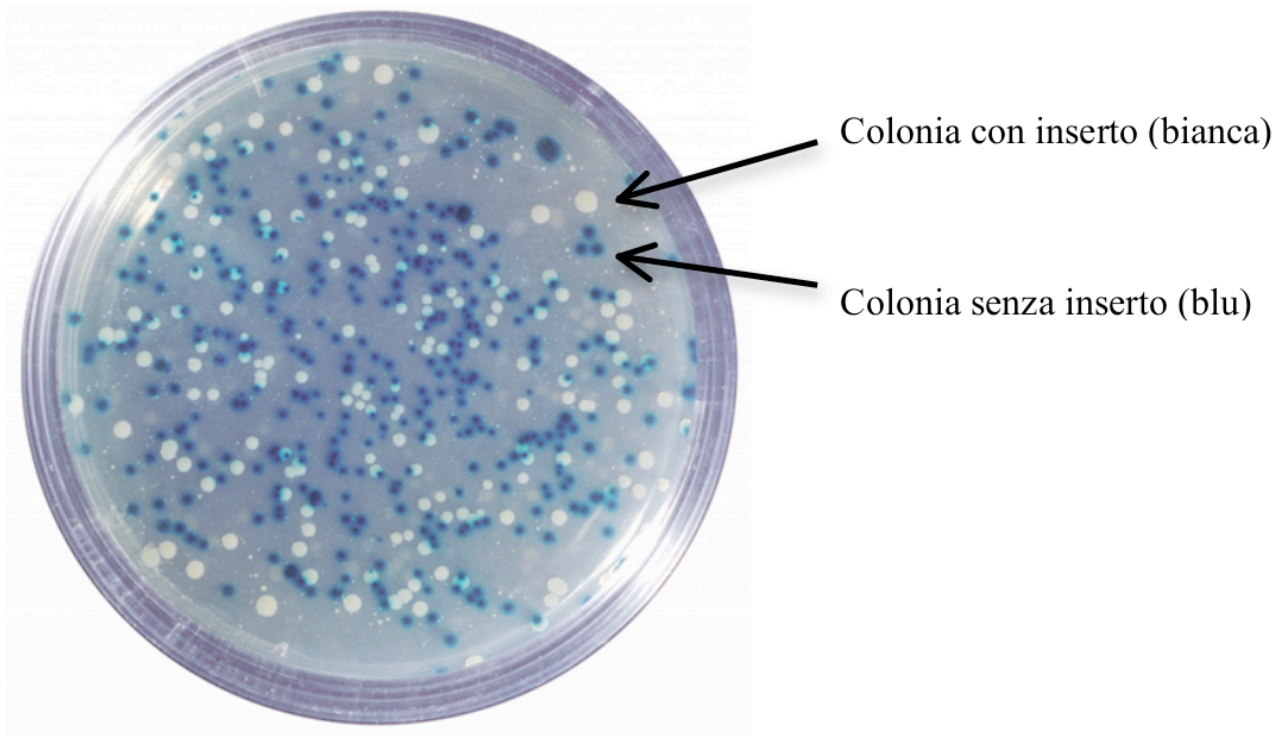


3) Dobbiamo clonare il frammento indicato nel vettore sottostante. Quali digestioni ci permettono il clonaggio?



Problema biologico posto:

Clonaggio del gene della tubulina beta umana (**simbolo genico *TUBB***) in un vettore di espressione contenente ***lacZ* (Beta-galattosidasi)**. La selezione sull'avvenuto clonaggio deve essere effettuata utilizzando il **sistema X-gal** colonie bianche/blu:



Scopo dell'attività:

Comprendere i principi e affrontare alcuni dei problemi metodologici del **clonaggio molecolare *in vivo*** proposto.

STUDIO DEL CLONAGGIO DEL GENE *TUBB* IN VETTORE CON *lacZ*

Seguendo le indicazioni di seguito riportate, utilizzare il [software SnapGene Viewer](#) (icona con una provetta azzurra) indicato per lo studio del clonaggio *in vivo* e utile nella scelta dell'enzima di restrizione più idoneo. **Prima si studierà il plasmide scelto e poi, reperita la sequenza dell'RNA messaggero (mRNA) della tubulina, si progetterà il clonaggio.**

Procedura:

Avviare il *programma SnapGene Viewer* aprendo il file "pBluescript SK (-).dna"; questo contiene nel campo *Sequence*, la sequenza completa del **plasmide pBluescript SK (-)**.

- 1) **Studiare il plasmide pBluescript SK (-)** visibile nel campo *Map* del programma (vedi stringa in basso a sinistra). In questa scheda è possibile osservare la mappa del plasmide, le due sequenze codificanti (*Open Reading Frame*, ORF) presenti nella sequenza e i siti di restrizione, oltre al sito di clonaggio multiplo (*Multiple Cloning Site*, MCS). Una delle due ORF rappresenta la **sequenza codificante di LacZ che va dal nucleotide in posizione 454 a quello in posizione 816** della sequenza del plasmide (rappresentata in violetto), selezionandola con il *mouse* si ha conferma delle coordinate che compaiono in alto a sinistra in una stringa subito sotto le icone di comando operativo del programma.
- 2) Rimanendo sulla scheda *Map* si vede una seconda ORF. Cliccando due volte sopra ORF2 si ottiene la sequenza aminoacidica corrispettiva che va copiata e incollata in **BLASTP** di allineamento proteico,

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) per confrontarla con tutte le sequenze proteiche depositate nella banca dati e scoprire cosa sia.

Di cosa si tratta? Annota di seguito il risultato, la sequenza proteica per cosa specifica?

- 3) Selezionare dalla scheda *Enzymes* (tasto in basso a sinistra) gli enzimi di restrizione che consentono un clonaggio puntuale (selezionare gli enzimi **unique cutters** che fanno un singolo taglio nel plasmide) mediante il menù a tendina accanto a “Chosen Enzymes”. Nel medesimo menù a tendina selezionare anche “Set Enzyme Preferences” e spuntare la casella “Show blunt cutters in green” **al fine di evidenziare in verde gli enzimi che generano estremità piatte (blunt ends) da quelli che, invece, generano estremità “appiccicose” (sticky ends)**. Chiudere quindi la tendina. Osservando ora con attenzione la mappa del plasmide, in base alle caratteristiche funzionali presenti nel vettore plasmidico e alle osservazioni fatte su ORF2, dove sarà più utile effettuare il taglio?
-
-

Partendo dalla osservazione della posizione dei siti di restrizione nella mappa del plasmide e le caratteristiche del tipo di taglio e della sequenza di restrizione, quali di questi enzimi *non* si dovrà scegliere? Motiva brevemente la risposta.

- 4) Cercare quindi **in rete** sulla **banca dati Gene** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), la sequenza dell’*mRNA* della **tubulina beta di *Homo sapiens*, digitando *TUBB* ovvero il simbolo genico della sequenza che specifica per la tubulina beta umana**. Nella scheda **Gene** del gene umano *TUBB*, fare click su “Go to [reference sequence details](#)”, selezionare il codice **NM dell’*mRNA*** della tubulina beta umana corrispondente **all’isoforma più lunga** (porre attenzione alla descrizione indicata sotto l’etichetta “NM” di ogni isoforma). Cliccando sul codice NM si aprirà la relativa scheda della banca dati **Nucleotide**. Annotare il codice **NM dell’*mRNA*** della tubulina beta umana, le coordinate di **inizio e di fine della sequenza codificante (CDS, presenti nella scheda dell’NM)** e la lunghezza in paia di basi:
-
-

Come si può vedere la lunghezza della CDS non corrisponde all’intera lunghezza dell’*mRNA* copiato. A cosa corrispondono le sequenze al di fuori della CDS?

- 5) Aprire ora un nuovo file dall’interno del programma SnapGene Viewer selezionando “File” e “New DNA File”, si aprirà così una nuova finestra di dialogo “New DNA File”, mantenendo la possibilità di avere aperta anche la prima che conteneva il plasmide. A questo punto si incolli la sequenza dell’intero *mRNA* della tubulina beta umana e si preme OK.

Al fine di evidenziare la sequenza codificante (CDS) della tubulina beta, si considerino le coordinate trovate al punto 4; successivamente selezionare la sequenza così individuata sul programma SnapGene Viewer selezionando il menù “Edit” e il comando “Select Range”. Digitare quindi il numero della prima e dell’ultima base della CDS e cliccare il pulsante “select”. In questo modo verrà evidenziata la sola CDS della tubulina beta. A questo punto cliccare sul menù “Features” e la funzione “Add Features”. Rinominare quindi la “Feature” come “CDS TUBB” e premendo sul pulsante “Color” assegnare un colore a piacere. Infine, cliccare il pulsante OK.

- 6) Selezionare quindi dal menù a tendina in alto “Enzymes” e “Choose enzymes”, a questo punto spuntare la casella “Choose from” e dal menù a tendina accanto selezionare “Unique & Dual Cutters” aumentare il numero di “Cut Sites” in basso con le frecce accanto portandolo da 0 a 2 e selezionare dal menù a tendina in basso “Overhang” solo “Sticky” e cliccare OK. In questo modo verranno selezionati solo i “**double cutters**” cioè **enzimi di restrizione che riconoscono un sito che è presente due volte nella sequenza dell’mRNA in esame e che generano estremità “appiccicose”**. Osservare quindi i siti di taglio degli enzimi selezionati tornando alla scheda *Map*, scorrendo con il puntatore uno a uno i **double cutters** sulla mappa, **la coppia dei siti di taglio verrà identificata in rosso**. Per selezionare entrambi i membri della coppia tenere premuto il pulsante *Cmd* (macOS) o *Ctrl* (Windows) e cliccare su entrambi i siti di taglio.

Verificare se ci sono *double cutters* utili al clonaggio di espressione motivando brevemente la risposta. Prendere nota degli enzimi *eventualmente* scelti come *più adatti* esplicitando il criterio di scelta.

- 7) Verificare se gli enzimi appena identificati (punto 6 di questo foglio) siano in grado di digerire il plasmide creando estremità compatibili all’interno della regione plasmidica prescelta per il clonaggio.

- 8) Se non si è trovato nessun enzima **double cutters** che permetta di preservare l’intera CDS di *TUBB*, formulare una possibile **ipotesi di lavoro per superare il problema**
