

# WEBEX BIOLOGIA MOLECOLARE

mercoledì 17 giugno 2020 17.02

**ESAME:** 2h, 5 esercizi (non tutti con lo stesso peso), quello a peso maggiore è quello di mappa di restrizione, per tutti esercizi arrotondare a seconda cifra decimale, compila dichiarazione di impegno, alla fine dell'esame fai invia tutto e termina. Collegamento webex. Compilo file word e lo carico andando in corrispondenza del quiz.

## Lezione 1 - mappe di restrizione

- ★ **ESERCIZIO ESAME:** sarà sicuramente una mappa di restrizione, non disegno la mappa ma uso una convenzione che mi permette di esprimere le posizioni relative e le distanze. (vedi power ponit). Inoltre all'esame indicare anche le mappe parziali. Così es non tutto sbagliato.

Usando opportune serie di enzimi singolarmente o in modo combinato riusciamo a definire uno schema che ci fa capire dove nella molecola sono posizionati i siti di taglio. Punto di partenza sono le dimensioni di frammenti che ottengo con enzimi che uso. **Fare mappa di restrizione** vuol dire fare schema che rispecchi posizioni relative e distanze. **Regole** da seguire:

- se taglio molecola circolare in 1 punto ottengo un frammento, in 2 punti due frammenti quindi dalle digestioni singole posso capire quanti sono i siti di taglio dell'enzima usato.
- Una digestione che da solo un frammento fornisce le dimensioni totali del plasmide
- La somma delle dimensioni di ogni frammento deve dare il totale.

1) Un plasmide è stato digerito con una serie di enzimi: dalle dimensioni dei frammenti ottenuti riportate qui sotto, disegnatte la mappa di restrizione.

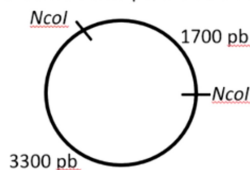
*Sall*: 5000 pb  
*NcoI*: 1700 pb + 3300 pb  
*EcoRI*: 1500pb + 3500 pb  
*Sall* + *NcoI*: 500 pb + 1200 pb + 3300 pb  
*Sall* + *EcoRI*: 600 pb + 900 pb + 3500 pb  
*NcoI* + *EcoRI*: 100 pb + 300 pb + 1400 pb + 3200 pb

Punto di partenza sono i dati relativi alle dimensioni dei frammenti visualizzati su un gel con le loro rispettive dimensioni.

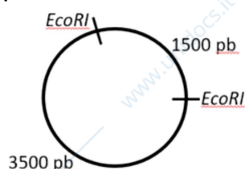
*Sall*: 5000 pb      1 frammento → 1 sito  
*NcoI*: 1700 pb + 3300 pb      2 frammenti → 2 siti  
*EcoRI*: 1500pb + 3500 pb      2 frammenti → 2 siti  
*Sall* + *NcoI*: 500 pb + 1200 pb + 3300 pb      3 frammenti → 3 siti (1 per *Sall* + 2 per *NcoI*)  
*Sall* + *EcoRI*: 600 pb + 900 pb + 3500 pb      3 frammenti → 3 siti (1 per *Sall* + 2 per *EcoRI*)  
*NcoI* + *EcoRI*: 100 pb + 300 pb + 1400 pb + 3200 pb  
                                          4 frammenti → 4 siti (2 per *NcoI* + 2 per *EcoRI*)

Prima info che ottengo è che ho 5 siti da posizionare di quelle singole, poi ho quelli combinati. In quelle combinate es sal1 e ecor1 vedo ho 3 siti di taglio, due saranno riconosciuti da *NcoI* e uno da *sall*. strategia più efficace è passare dalle **mappe parziali** (cioè relative a un solo enzima), all'inizio solo alcuni siti e poi man mano la vado ad arricchire.

E' conveniente partire da un enzima che da 2 frammenti, ad esempio *NcoI* ed *EcoRI*



Conviene partire da qui perché da sola posiziona già 2 dei 5 siti. Procedendo in modo analogo faccio quella di *ecoRI*.

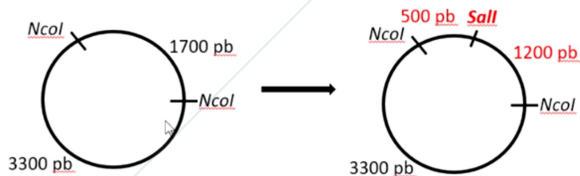


A questo punto procediamo cercando di integrare. Nelle due mappe parziali cerco di **mettere sal 1** sfruttando le doppie digestioni.

Provo a posizionare **sal1 rispetto a Nco1**. il testo mi dice che quando li combino ho 3 frammenti e mi da le varie dimensioni. Confronto con singola digestione Nco1, vedo che una banda è mantenuta mentre l'altra viene scissa in 2 frammenti. Riadatto un primo schema preliminare in cui ho posizionato i siti Nco1.

Confrontando le digestioni con *Nco1* e *Nco1/Sal1*,

1. la banda da 3300 è in comune
2. quella da 1700 viene divisa nella doppia digestione in 500 + 1200

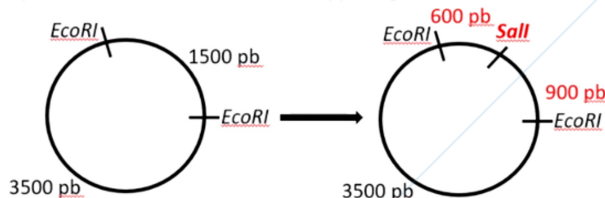


Abbiamo così  
posizionato 3 siti

procedo poi considerando l'altra combinazione, **sal1 ecor1**. nuovamente abbiamo una banda che si mantiene (3500pb) e quella più piccola che viene scissa in 2 pezzi aggiungendo il secondo enzima quindi abbiamo la possibilità di posizionare il sito sal 1.

Confrontando le digestioni con *EcoRI* e *EcoRI/Sal1*,

1. la banda da 3500 è in comune
2. quella da 1500 viene divisa nella doppia digestione in 600 + 900



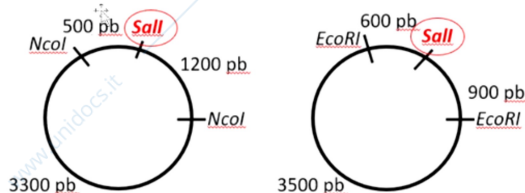
Abbiamo così  
posizionato altri 3 siti

punto finale è **riunire le nostre info contenute nelle mappe parziali**. Sono nella condizione in cui potrei fare 2 mappe. Provo a introdurre info contenute nella seconda mappa.

Per completare la mappa dobbiamo unire le informazioni delle due mappe parziali *EcoRI/Sal1* e *Nco1/Sal1*

Questo consiste nel prevedere tutte le combinazioni e individuare quella corretta cioè quella che rispetta anche la doppia digestione *EcoRI/Nco1*

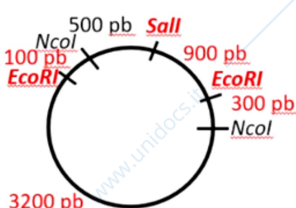
Come procediamo? Sfruttiamo l'elemento in comune alle 2 mappe parziali, il sito *Sal1*



Possiamo utilizzare la mappa parziale *Nco1/Sal1* e riportare qui le distanze dei siti *EcoRI* rispetto. Questo consiste nel prevedere le 2 combinazioni possibili

Teniamo fissa la prima e proviamo a inserire le info contenute nella seconda. Questa ci dice che tra sal1 e ecor1 abbiamo 600pb, se tengo fisso nella prima sal1 e provo a posizionare ecor1 muovendomi in senso antiorario devo individuare un punto a 600pb dal sito sal, fino a Nco1 ho 500pb, devo arrivare a 600 quindi supero nco1 e posiziono ecor1. il frammento più grande che andava da nco1 a nco1 era di 3300pb. Se ho posizionato ecor1 a 100pb da nco1 avrò un piccolo frammento di 100pb, il restante è di 3200pb (3300-100). Poi il secondo sito ecor1 so che dista 900pb da sal1 quindi nuovamente tengo fisso sal1 e mi sposto di 900pb per posizionare ecor1, da questa posizione fino a nco1 cisarà 1200-900pb, 300pb da ecor1 a nco1. questa è una possibilità.

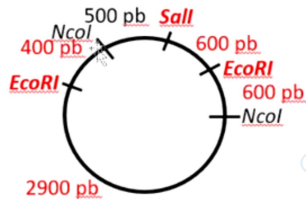
1° possibilità: posizioniamo il sito *EcoRI* distante 600 pd a **sinistra** di *Sal1*



Non è l'unica perché io potrei fare lo stesso ragionamento tenendo sempre fisso sal ma andando a mettere il sito ecor1 distante 600pb dalla parte opposta, da sal1 mi sposto di 600pb. Quindi distanza

tra sal1 e nco1 viene spaccata a metà, ottengo 2 frammenti di 600pb. Dall'altra parte devo mettere secondo sito ecor1 distante 900pb da sal1, se devo muovermi a sx di 900pb avrò un frammento inalterato poi devo procedere altre 400pb per sistemare il sito ecor1.

2° possibilità: posizioniamo il sito *EcoRI* distante 600 pb a destra di *Sall*

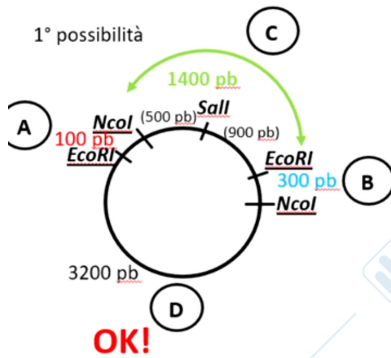


Sono entrambe plausibili, come stabilisco quella corretta? Fino ora **non ho considerato ultima digestione doppia Nco1+EcoR1**. Rileggo le due soluzioni che ho ottenuto e confronto gli schemi con il risultato dell'ultima doppia digestione.

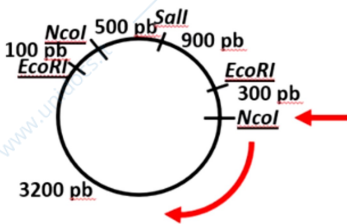
Consideriamo ora la digestione doppia *NcoI* + *EcoRI*

E confrontiamo le due mappe proposte per individuare quella che soddisfa il risultato di questa digestione

*NcoI* + *EcoRI*: 100 pb + 300 pb + 1400 pb + 3200 pb  
 A B C D



**COME INDICO IL RISULTATO?** Una convenzione, posso partire da uno qualsiasi dei siti, è una molecola circolare quindi indifferente.



Schematicamente possiamo rappresentare la mappa in questo modo:

Partendo da un sito (uno qualunque) indichiamo il nome dell'enzima seguito dalla distanza rispetto al successivo e procedendo sempre nello stesso verso (è indifferente se orario o antiorario) indichiamo tutti i siti e le loro distanze relative.

In questo caso, se scelgo di partire dal sito *NcoI* indicato dalla freccia e procedo in senso orario ottengo il seguente schema:

*NcoI*-3200-*EcoRI*-100-*NcoI*-500-*Sall*-900-*EcoRI*-300-*NcoI*

2) Un plasmide è stato digerito con una serie di enzimi: dalle dimensioni dei frammenti ottenuti riportate qui sotto, disegnatte la mappa di restrizione.

- Sall: 9500 pb
- BamHI: 3500 pb + 6000 pb
- EcoRI: 4500 pb + 5000 pb
- BamHI + EcoRI: 1500 pb + 2000 pb + 2 x 3000 pb
- BamHI + Sall: 2500 pb + 2 x 3500 pb
- EcoRI + Sall: 500 pb + 2 x 4500 pb

A) parto da considerazione di quanti frammenti ho ottenuto dalle **digestioni singole** per capire quanti siti devo posizionare, ne ho uno che mi dà solo un frammento (che saranno le dimensioni totali del plasmide 9500) poi bam H1 mi dà due frammenti (2 siti), controllo che somma rispecchi risultato ottenuto con sal1. poi altro enzima ecoR1 somma anche qui è corretta e ho 2 siti 2 frammenti.

- B) **guardo le combinazioni**, BAMH1 ECOR1, 2 punti ciascuno 4 frammenti corretto secondo le attese che potevo avere, poi BAMH1+SAL1 3 frammenti 2+1. poi SAL1+ECOR1 3 frammenti, 3 siti, totale sempre corretto.
- C) primo passo sviluppare **semplici mappe parziali** con un solo enzima per volta, lo faccio per BamH1 e per ECOR1.
- D) ora integro queste mappe parziali **inserendo quello che taglia in un solo punto**, comincio con coppia **SAL1 BamH1**, quando faccio doppia ho ancora un frammento da 3500 quello da 6000 scompare sostituito da 2. quindi SAL1 nell'arco della banda da 6000, ipotizzo una soluzione.
- E) **sal1+ECOR1**, scompare banda da 5000, verifico la somma. Posiziono sal1.
- F) **combinio le info delle 2 digestioni parziali**, prima mappa in cui ecor1 sal1 integrati, cerco di trasferire info dall'altro schema. Metto sal1 rispetto a bamH1.
- G) ottengo **2 possibilità** devo considerare anche posizionamento speculare
- H) valuto a questo punto **doppia BAMH1+ECOR1 per discriminare** tra le due possibilità quella corretta, vedo che nella seconda mappa è più coerente la dimensione delle bande.

### **AUMENTIAMO COMPLESSITÀ**

3) Un plasmide è stato digerito con una serie di enzimi: dalle dimensioni dei frammenti ottenuti riportate qui sotto, disegnatte la **mappa di restrizione**.

*HindIII*: 7500 pb

*SmaI*: 2300 pb + 5200 pb

*EcoRV*: 1000pb + 2700pb + 3800 pb

*HindIII* + *SmaI*: 1500 pb + 2300 pb + 3700 pb

*HindIII* + *EcoRV*: 1000 pb + 2000 pb + 1800 pb + 2700 pb

*SmaI* + *EcoRV*: 300 pb + 2x 1000 pb + 1700 pb + 3500 pb

- A) un solo frammento hind3 dimensioni plasmide 7500
- B) sma1 da solo e ECOR5 da solo (in eco 2700 e 100 potrebbero anche essere invertiti non so ancora come qui riportata quella che porta a risoluzione + veloce)
- C) mappa HIND+SMA e HIND+ECOR5 ( 3800 divisa in 1800 + 2000)
- D) metto **info di una nell'altra, lavoro sul sito presente in entrambi gli schemi parziali, HIND3**. inserisco sma1 in quella che ha già 4 siti quindi più complessa. Devo prevedere le 2 soluzioni possibili.

### **ESERCIZIO 4**

3) Un plasmide è stato digerito con una serie di enzimi: dalle dimensioni dei frammenti ottenuti riportate qui sotto, disegnatte la **mappa di restrizione**.

*HindIII*: 9900 pb

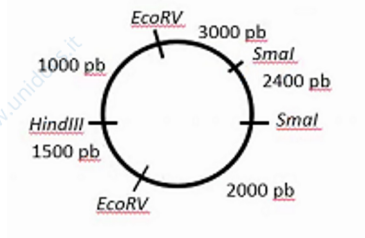
*SmaI*: 2400 pb + 7500 pb

*EcoRV*: 2500pb + 7400 pb

*HindIII* + *SmaI*: 2400 pb + 3500 pb + 4000 pb

*HindIII* + *EcoRV*: 1000 pb + 1500 pb + 7400 pb

*SmaI* + *EcoRV*: 2000 pb + 2400 pb + 2500 pb + 3000 pb



## Lezione 2

- 1) Dosate 50  $\mu$ l di una soluzione di DNA plasmidico B, ottenuta diluendo 1:2 una madre A, in un volume finale di 2 ml. L'assorbanza a 260 nm è risultata essere  $A=0.250$ , mentre l'assorbanza a 280 nm è risultata essere  $A=0.110$ .

Calcolate:

- la concentrazione del DNA nella soluzione dosata allo spettrofotometro (nella cuvetta)
- la concentrazione del DNA nella provetta madre A

Il dosaggio è affidabile?

**Nota: Per tutti gli esercizi se non indicato diversamente nel testo l'arrotondamento è alla seconda cifra decimale**

Di fondo abbiamo una relazione di proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione acido nucleico in soluzione in cuvetta. Il coefficiente che esprime questa proporzionalità è 260nm corrisponde a conc. di 50 microlitri. Imposto proporzione 1 unità : 50 = 0,250 unità : x ml

- a) concentrazione del DNA nella cuvetta:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml} \Rightarrow 1 \text{ OD} : 50 \mu\text{g/ml} = 0.250 \text{ OD} : X \mu\text{g/ml}$$

$$X = 50 \mu\text{g/ml} \times 0.250 \text{ OD} / 1 \text{ OD} = 12,5 \mu\text{g/ml}$$

- b) calcolo diluizione DNA dalla provetta B alla cuvetta:  $F=Vf/Vi = 2 \text{ ml}/50 \mu\text{l} = 40 \text{ X}$

concentrazione DNA nella provetta B:  $12,5 \mu\text{g/ml} \times 40 = 500 \mu\text{g/ml} = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

concentrazione DNA nella provetta A:  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 2 = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

- Il dosaggio è affidabile se  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$  ( $1.7 \div 1.9$ )

In questo caso  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 0.250/0.110 = 2,27$  -> il dosaggio non è affidabile

Se soluzione è contaminata dosaggio è poco affidabile. Finestra 1,7-1,9 tiene conto di possibile contaminazione da parte di aromatici. Rapporto sale sopra 2, anche se apparentemente ho poche proteine la soluzione è contaminata da molecole aromatiche quindi non affidabile.

per calcolo b): IN ALTERNATIVA:

$$C_i V_i = C_f V_f \Rightarrow C_i = C_f V_f / V_i \Rightarrow C_i = 12,5 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} / 0,05 \text{ ml} = 500 \mu\text{g/ml} (0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l})$$

$$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 2 = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

- 2) Volete assemblare una miscela di ligazione tra un vettore di 6500 bp ed un frammento di 1500 bp. Volendo limitare l'evento di ricircularizzazione del vettore, utilizzate un rapporto vettore: inserto 1:5. Quanti ng di frammento di DNA da clonare utilizzereste avendo deciso di aggiungere alla miscela di ligazione 40 ng di vettore?

Strategia è rendere più probabile ligazione che richiusura che termodinamicamente sarebbe

favorita. Se disponiamo di soluzioni di cui abbiamo la conc in massa/volume devo tenere conto delle differenze di dimensioni.

La formula è la seguente:  $ng_i = R \times ng_v \times bp_i / bp_v$

$$ng_i = 5 \times 40 \text{ ng} \times 1500 \text{ bp}_i / 6500 \text{ bp}_v$$

$$ng_i = 46,15$$

3) Considerate le seguenti sequenze riconosciute dai diversi enzimi di restrizione di classe II:

*Bam*HI: G/GATCC

*Eco*RV: GAT/ATC

*Pst*I: CTGCA/G

disegnate le estremità che ottenete dalle digestioni con questi enzimi ed indicate di che tipo di estremità si tratta.

3) Considerate le seguenti sequenze riconosciute dai diversi enzimi di restrizione di classe II:

*Bam*HI: G/GATCC

*Eco*RV: GAT/ATC

*Xho*I: C/TCGAG

*Cla*I: AT/CGAT

*Pst*I: CTGCA/G

*Sma*I: CCC/GGG

*Bgl*II: A/GATCT

*Sal*I: G/TCGAC

disegnate le estremità che ottenete dalle digestioni con questi enzimi ed indicate di che tipo di estremità si tratta.

<i>Bam</i> HI: G/GATCC	5' G 3' 3' CCTAG 5'	5'GATCC 3' 3'G 5' → 5' PROTRUDING
<i>Eco</i> RV: GAT/ATC	5' GAT 3' 3' CTA 5'	5'ATC 3' 3' TAG 5' → BLUNT
<i>Xho</i> I: C/TCGAG	5' C 3' 3' GAGCT 5'	5'TCGAG 3' 3'C 5' → 5' PROTRUDING
<i>Cla</i> I: AT/CGAT	5' AT 3' 3' TAGCT 5'	5'CGAT 3' 3'TA 5' → 5' PROTRUDING
<i>Pst</i> I: CTGCA/G	5' CTGCA 3' 3' G 5'	5'G 3' 3'ACGTC 5' → 3' PROTRUDING
<i>Sma</i> I: CCC/GGG	5' CCC 3' 3' GGG 5'	5' GGG 3' 3' CCC 5' → BLUNT
<i>Bgl</i> II: A/GATCT	5' A 3' 3' TCTAG 5'	5'GATCA 3' 3'T 5' → 5' PROTRUDING
<i>Sal</i> I: G/TCGAC	5' G 3' 3' CAGCT 5'	5'TCGAC 3' 3'G 5' → 5' PROTRUDING

4) Volete allestire 250  $\mu$ l di reazione di PCR in cui i componenti abbiano le concentrazioni finali indicate nella tabella. Determinare i volumi da prelevare dalle soluzioni stock.

Soluzioni stock	Concentrazioni o quantità finali
DNA plasmidico 25ng/ $\mu$ l	100 ng
Tampone per PCR 50X	1X
Miscela di dNTPs 10 mM	250 $\mu$ M
primer 1 20 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M →
primer 2 25 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M →
Taq polimerasi 0.5 U/ $\mu$ l	2U →

- a) DNA plasmidico:  $25 \text{ ng} : 1 \mu\text{l} = 100 \text{ ng} : X \mu\text{l} \Rightarrow X = 4 \mu\text{l}$
- b) Tampone PCR:  $F=C_i/C_f = 50 X/1 X = 50 X \Rightarrow 250 \text{ ul}/50 = 5 \mu\text{l}$
- c) miscela dNTP:  $F=C_i/C_f = 10 \text{ mM}/0,25 \text{ mM} = 40 X \Rightarrow 250 \text{ ul}/40 = 6,25 \mu\text{l}$
- d) primer 1:  $F=C_i/C_f = 20 \mu\text{M}/0,5 \mu\text{M} = 40 X \Rightarrow 250 \text{ ul}/40 = 6,25 \mu\text{l}$
- e) primer 2:  $F=C_i/C_f = 25 \mu\text{M}/0,5 \mu\text{M} = 50 X \Rightarrow 250 \text{ ul}/50 = 5 \mu\text{l}$
- f) Taq polimerasi:  $0,5 \text{ U}/\mu\text{l} : 1 \mu\text{l} = 2 \text{ U} : X \mu\text{l} \Rightarrow X = 4 \mu\text{l}$

5) Volete preparare 30 ml di gel di agarosio allo 0.7%. Il tampone TAE (soluzione stock) è pari a 100 X

Determinate:

- a) quantità di agarosio
- b) quantità di TAE
- c) quantità di H<sub>2</sub>O
- a)  $0,7 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 30 \text{ ml} \Rightarrow X = 0,21 \text{ g}$
- b)  $F=C_i/C_f = 100 X/1 X = 100 X \Rightarrow 30 \text{ ml}/100 = 0,3 \text{ ml} (300 \mu\text{l})$
- c)  $30 \text{ ml} - 0,3 \text{ ml} = 29,7 \text{ ml}$

6) Dati i seguenti oligonucleotidi:

5' CCACGAAAAGCAATATCGAGC 3'

5' AGCATTGTCCACATATACACG 3'

Determinate la temperatura di melting dei due oligonucleotidi. I due oligonucleotidi sono compatibili

Sono compatibili se le loro T di melting sono vicine.

La formula per calcolare la T<sub>m</sub> è:  $T_m = 69,3 + 0,41(\%G+C) - 650/N$

CCACGAAAAGCAATATCGAGC

$$T_m = 69,3 + 0,41 * (10/21 * 100) - 650/21 = 57,87^\circ\text{C}$$

AGCATTGTCCACATATACACG

$$T_m = 69,3 + 0,41 * (9/21 * 100) - 650/21 = 55,91^\circ\text{C}$$

- I due oligonucleotidi sono compatibili

7) Preparare una tabella di allestimento di una reazione di restrizione con l'enzima SmaI (buffer 4 la cui concentrazione stock è 10X, 24°C, 10 U/μl) per digerire un plasmide di 4000 pb (utilizzando una preparazione concentrata 2 μg/μl) ottenendo almeno 3 μg della banda da 2000 bp.

**a) volume soluzione di DNA:**

$$3 \mu\text{g} : 2000 \text{ bp} = X \mu\text{g} : 4000 \text{ bp} \Rightarrow X = 3 \mu\text{g} \times 4000 / 2000 = 6 \mu\text{g}$$
$$2 \mu\text{g} : 1 \mu\text{l} = 6 \mu\text{g} : X \mu\text{l} \Rightarrow X = 3 \mu\text{l}$$

**b) enzima SmaI:**

se si utilizzano 4U di enzima per digerire 1 μg di DNA:

$$4 \text{ U} : 1 \mu\text{g} = X \text{ U} : 3 \mu\text{g} \Rightarrow X = 4 \text{ U} \times 3 \mu\text{g} / 1 \mu\text{g} = 12 \text{ U}$$

poiché lo stock di SmaI è 10 U/μl:

$$10 \text{ U} : 1 \mu\text{l} = 12 \text{ U} : X \mu\text{l} \Rightarrow X = 1,2 \mu\text{l} \rightarrow \text{volume di reazione minimo } 12 \mu\text{l}$$

**c) volume buffer 4:**

$$F=C_i/C_f \Rightarrow F=10X/1X=10X \Rightarrow 12 \mu\text{l} / 10 = 1,2 \mu\text{l}$$

**d) volume dd H<sub>2</sub>O:**

$$12 \mu\text{l} - (3 + 1,2 + 1,2) \mu\text{l} = 6,6 \mu\text{l}$$