

1. Si vuole eseguire una digestione preparativa di 10 µg di un plasmide con i due enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI*.

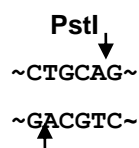
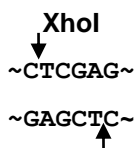
Completa il protocollo sotto riportato sapendo che:

- 1) Il plasmide ha una concentrazione di 0.5 µg/µl.
- 2) I due enzimi scelti funzionano bene nello stesso tampone H.
- 3) L'enzima *EcoRI* ha una concentrazione di 10U/µl e *XhoI* di 20U/µl
- 4) Si vogliono usare per ciascun enzima 4U per µg di DNA da digerire.
- 5) Il tampone di reazione H è 10X
- 6) Si è scelto un volume totale di reazione di 80µl

DNA plasmidico	µl
Tampone di reazione H 10X	µl
Enzima <i>EcoRI</i>	µl
Enzima <i>XhoI</i>	µl
H ₂ O	µl

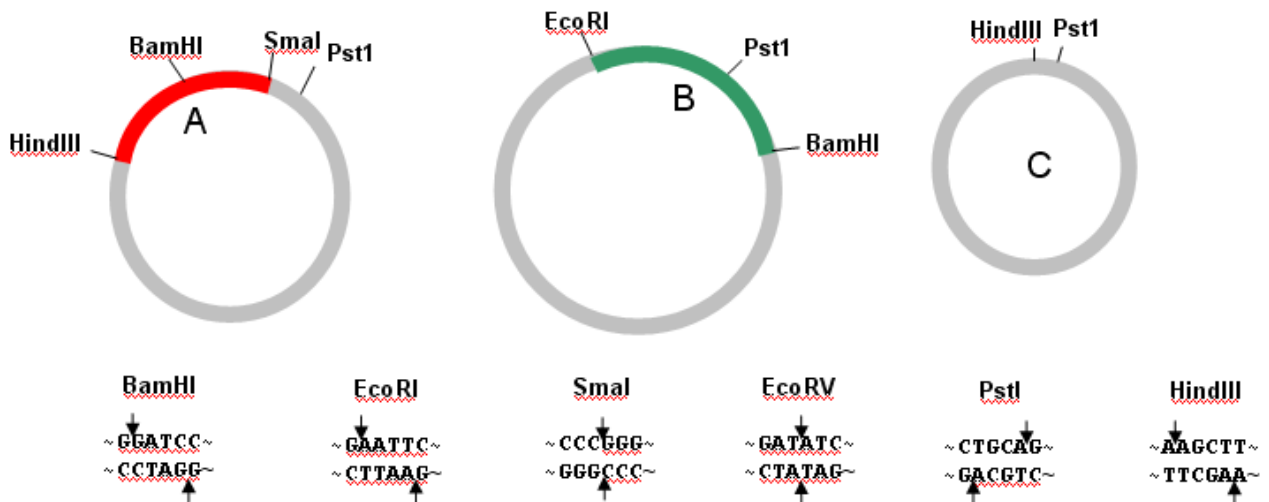
2. Per clonare un frammento di DNA, ottenuto da taglio con l'enzima di restrizione *XhoI*, in un vettore tagliato con l'enzima di restrizione *PstI*, si è deciso di usare degli adaptor.

Progetta gli oligonucleotidi necessari per costruire tale adaptor e scrivilo nella direzione convenzionale 5'>3'.



3. Si dispone di un frammento di DNA di 350 bp, alla concentrazione di 6 ng/ μ l, e di 100 ng di un vettore di 6500 bp
 Calcolare quanti μ l della soluzione del frammento da clonare si devono aggiungere al vettore per eseguire una ligazione con un rapporto molare Vettore : Insetto di 1:3
 (PM di una coppia di basi = 660Da)

4. Si vuole eseguire il subclonaggio di entrambi i frammenti di DNA (A e B), precedentemente clonati in due differenti plasmidi, nel sito di policlonaggio di un vettore plasmidico (C) utilizzando solamente enzimi di restrizione, DNA ligasi e DNA polimerasi Klenow.
 Proporre uno schema di clonaggio.



5. In un plasmide di 5880 pb è stato precedentemente clonato nel sito *XhoI* un frammento di DNA esogeno di 420bp. Se si desidera preparare 400 ng di tale inserto estraendolo da detto plasmide mediante taglio con *XhoI*, quanti μl di plasmide ricombinante, alla concentrazione di 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, devo utilizzare in reazione?

Completare inoltre il protocollo di tale reazione, sapendo che:

- L'enzima *XhoI* ha una concentrazione di 10U/ μl
- Si vogliono usare 4U di enzima per μg di DNA da digerire.
- Il tampone di reazione H è 10X
- Si è scelto un volume totale di reazione di 60 μl

DNA plasmidico (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl
Tampone di reazione H 10X	μl
Enzima <i>XhoI</i>	μl
H ₂ O	μl

6. Completare la seguente reazione di defosforilazione sapendo che:

- Il vettore ha una dimensione di 3000 bp ed è stato linearizzato per digestione con un enzima di restrizione
- Si vogliono defosforilare 1.2 μg di vettore totale e si ha a disposizione una soluzione ad una concentrazione di 0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Si vogliono utilizzare 1U di enzima fosfatasi alcalina per ogni pmole di estremità da defosforilare (PM di una coppia di basi = 660)
- L'enzima ha la concentrazione di 0.2U/ μl .
- Il tampone di reazione della Fosfatasi Alcalina è 20X
- Si è scelto un volume totale di reazione di 50 μl

DNA vettore	μl
Tampone di fosfatasi 20X	μl
Fosfatasi alcalina 0.2U/ μl	μl
H ₂ O	μl

7. Completare la seguente reazione di ligazione sapendo che:

- Il vettore ha una dimensione di 3000bp mentre l'inserto è di 600 bp
- Si vogliono usare 50 ng di vettore totale e si ha a disposizione una soluzione ad una concentrazione di 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Si vuole utilizzare un rapporto vettore:inserto di 1:9.
- La soluzione di inserto ha una concentrazione di 20ng/ μl .
- Si vuole utilizzare 2U di enzima e questo ha una concentrazione di 10U/ μl .
- Il tampone di reazione della T4 DNA ligasi è 10X
- Si è scelto un volume totale di reazione di 10 μl

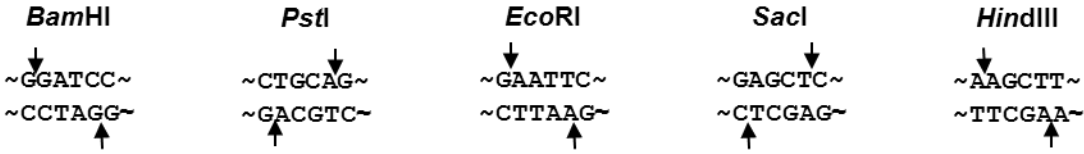
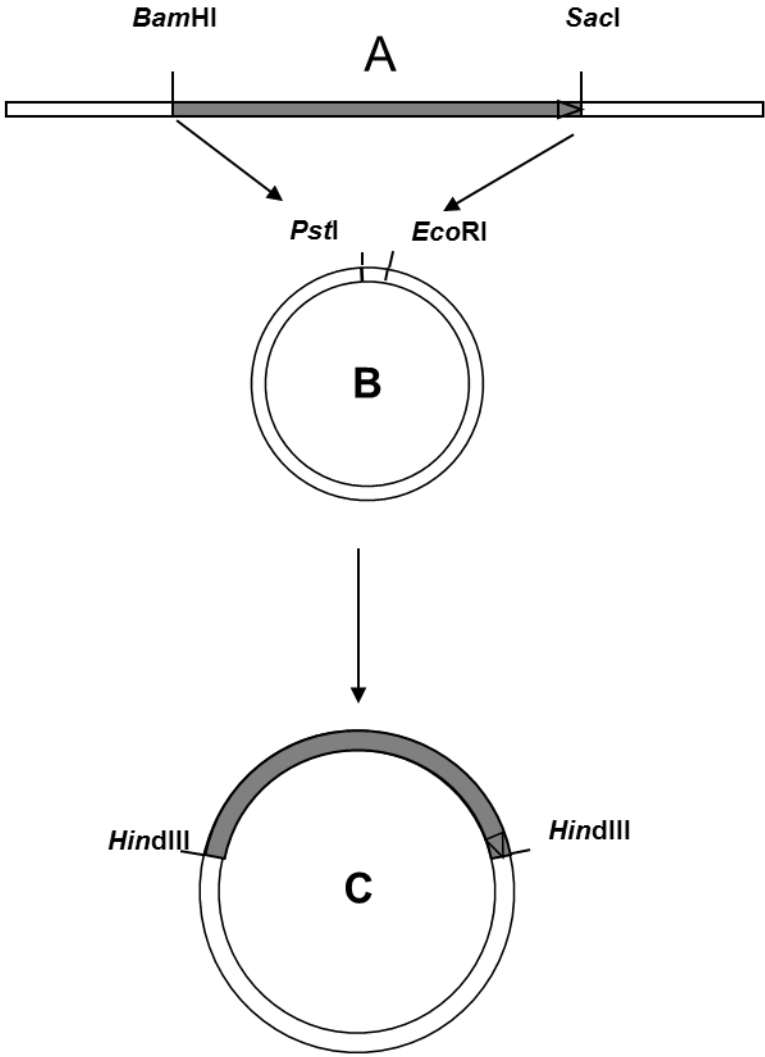
DNA vettore	μl
DNA inserto	μl
Tampone di reazione 10X	μl
T4 DNA ligasi 10U/ μl	μl
H ₂ O	μl

8. Un plasmide ricombinante, di lunghezza totale 4760bp, contiene due inserti di DNA esogeno rispettivamente di 270 e 910 bp. Se si digeriscono completamente 10 μg di questo vettore con enzimi di restrizione, in modo tale da staccare entrambi i frammenti, quanti ng di vettore e di entrambi i DNA esogeni si potranno recuperare?

Volendo poi eseguire una ligazione di tutto il frammento del DNA più piccolo recuperato in un secondo vettore plasmidico, di 5300 bp, in modo tale da avere un rapporto molare vettore:inserto di 1:20, quanti ng di questo secondo plasmide dovrò utilizzare per la ligazione?

(PM di una coppia di basi = 660Da)

9. Progettare due adaptor per clonare in maniera direzionata il frammento A nel vettore plasmidico B. Gli adaptor devono potere eliminare nel vettore ricombinante tutti i siti di restrizione utilizzati (Vettore + inserto) e creare il sito *HindIII* ad entrambe le estremità del frammento A.



10. È stato eseguito il clonaggio del DNA esogeno (A) nel sito di restrizione BamHI del vettore plasmidico (B). Proporre una digestione con uno o più enzimi di restrizione per identificare, mediante successiva analisi elettroforetica, l'orientamento dell'inserto nei cloni ricombinanti.

Definire la dimensione dei frammenti dei due possibili cloni ricombinanti che si ottengono dall'analisi di restrizione scelta

