

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:

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

DNA plasmidico	µl
Tampone di reazione H 10X	µl
Enzima EcoRI	µl
Enzima XhoI	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/i adaptor e scriverli nella direzione convenzionale 5'>3'.



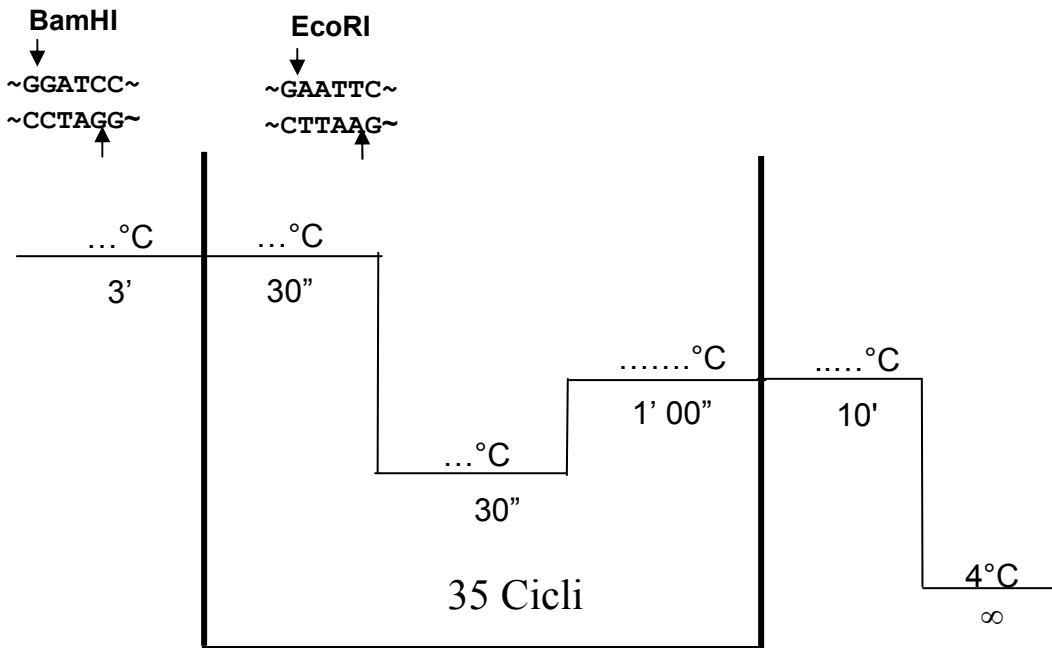
3) Progetta due primer per amplificare mediante PCR l'intera sequenza sotto riportata e creare alle estremità i siti di restrizione: EcoRI (all'inizio) e BamHI (alla fine), utili per il successivo clonaggio dell'amplicone in un vettore. Scrivere i primer nella direzione 5'-3'. Calcolare inoltre la T_m dei primer e stabilire le temperature da utilizzare nelle varie fasi della reazione di PCR (completare lo schema sottoriportato).

Dimensione dell'amplicone: 750 bp

```

5' ATGAAACCAT TCTTCCTCAT TTCGCTGCTG GTCACGGTCT TCATGAGCCT
   CATGTTGGCC ACCACCGCTC AACCCAGCCT TCCACTCAAC AACCGGCGGG
   AACTTGCTGA GCATCCCCCA GTCAAGGGTA ACCCCCCAAA CACCGGCTAT
   GCACTAGACT GGTGCAAATA CACAGCCGGA ATGCTATTTT AGTGGGATCT
   CCCGACGTTT ATCAAGCATC GCGAGGCAA CTTCAGCCTC GGACGGCTGA
   CGTGGGACTG GTCGTCGGAT GGGTGTACCC ACGTCCCGGA CAATCCGGTT
   GGCTTCCCAT TCAAGCCGGC GTGCCAGCGT CACGACTTTG GATACCGGAA
   CTACCAGGTC CAATTCCATT TTACCCCGCG TGCTAGATGG AAGATTGACG
   AGAATTTCC TCAAAGACATG AAATTCAGT GCATAGGGCA CAACATCTTC
   AATGCCTGCC ACTTCATGGC ACATGTTTAT CATTGGGGAG TCCGAACCTT
   CTATAAAGGC CATGAGCAAT ACCGTGAGAG TGAGCCGTCT CACAAGATGA
   TGGACACGAT GGTCGTTTCT GAATCGTCGG ACGTGTTTGA TGGGATGGAC
   GCCGATGAAG CGAGGGACGC TCTCAATCCA TATCTTTCTG AAGAGAAGAC
   CAAAGAGTAC TACGATCGTG CCCTAGCGCG TTACAACAAG TGTGTTGAGG
  
```

AAGCCATGGC GCAAGGCATT GACCTTCAGA AATACTGGGC CGCTTTTTAG 3'



4) 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:Inserito di 1:3?
 (PM di una coppia di basi = 660Da)

5) Descrivi una procedura di PCR per mutagenizzare la sequenza sotto riportata nel punto indicato.

5' ATGAAACCAT TCTTCCTCAT TTCGCTGCTG GTCACGGTCT TCATGAGCCT
 CATGTTGGCC ACCACCGCTC AACCCAGCCT TCCACTCAAC AACCGGCGGG
 AACTTGCTGA GCATCCCCCA GTCAAGGGTA ACCCCCCAAA CACCGGCTAT
 GCACTAGACT GGTGCAAATA CACAGCCGGA ATGCTATTTT AGTGGGATCT
 CCCGACGTTT ATCAAGCATC GCGAGGCAA CTTCAGCCTC GGACGGCTGA
 CGTGGGACTG GTCGTGCGAT GGGTGTACCC ACGTCCCGGA CAATCCGGTT
 GGCTTCCCAT TCAAGCCGGC GTGCCAGCGT CACGACTTTG GATACCGGAA
 CTACCAGGTC CAATTCATT TTAGCCCGCG TGCTAGATGG AAGATTGACG
 AGAATTTCCCT CAAAGACATG AAATTCAGT GCATAGGGCA CAACATCTTC
 AATGCCTGCC ACTTCATGGC ACATGTTTAT CATTGGGGAG TCCGAACCTT
 CTATAAAGGC CATGAGCAAT ACCGTGAGAG TGAGCCGTCT CACAAGATGA
 TGGACACGAT GGTCGTTTCT GAATCGTCGG ACGTGTGTTGA TGGGATGGAC
 GCCGATGAAG CGAGGGACGC TCTCAATCCA TATCTTTCTG AAGAGAAGAC
 CAAAGAGTAC TACGATCGTG CCCTAGCGCG TTACAACAAG TGTGTTGAGG
 AAGCCATGGC GCAAGGCATT GACCTTCAGA AATACTGGGC CGCTTTTTAG 3'

la G deve essere
 sostituita con una A

6) 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.

