

**Relazione scientifica sui risultati dell'attività di ricerca volta presso
The School of Biological Sciences at Bangor University (Bangor, Wales, UK)**

Durante la mia permanenza nei laboratori del professore Peter Golyshin, presso la Scuola di Scienze biologiche dell'Università di Bangor (Wales, UK), è stato possibile poter acquisire le conoscenze necessarie per la costruzione e screening di fosmid library e lambda library metagenomiche allo scopo di poter identificare nuove attività enzimatiche da poter riutilizzare nel campo delle biotecnologie.

L'analisi metagenomica è stata condotta sulle acque delle saline di Margherita di Savoia. In particolare i campioni d'acqua di due vasche salanti, denominate Imperatrice e Cappella, sono state filtrate con un sistema costituito da una pompa da vuoto collegata ad un'unità filtrante Stericup Merck Millipore, provvista di filtri sterili di polietersulfone con porosità di 0,22 µm. Attraverso questo processo tutte le cellule dei microrganismi presenti nel campione vengono bloccati sul filtro. I filtri di polietersulfone arricchiti di cellule costituenti il microbioma delle saline sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA utilizzando il kit "Meta-G-Nome DNA Isolation kit".

Il DNA estratto è stato dosato con dosaggio fluorimetrico al picogrill e controllato qualitativamente mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8%.

Verificato che la concentrazione del DNA dei campioni delle due vasche Cappella e Imperatrice corrispondesse a 0,5 µg/µl, abbiamo costruito due distinte library fosmidiche utilizzando il kit "CopyControl HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS Vector".

Questo kit prevede diversi step:

- End-Repair of the insert DNA, in cui l'estremità del DNA vengono fosforilate al 5' e rese blunt-ended.
- Size selection of the End Repaired DNA, in cui mediante corsa elettroforetica vengono selezionati i frammenti di DNA tra i 40-30kb.
- Ligation reaction, in cui tutti i frammenti di DNA selezionati vengono inseriti nel vettore pCC2FOS.
- Packaging the CopyControl Fosmid Clones, in cui il vettore pCC2FOS contenete l'inserto viene inserito nelle particelle fagiche.
- Titering the packaged CopyControl Fosmid Clones, in cui le cellule di E. coli EPI300-T1 vengono infettate con particelle fagiche contenete il vettore a diverse diluizioni e poi piastrate su piastre contenente LB medium e cloramfenicolo ad una concentrazione finale di 12,5 µg/ml. Con tale step è possibile capire la giusta diluizione del packaged da utilizzare in modo tale da non aver una crescita confluyente delle cellule su piastra.

Quest'ultimo step viene ripetuto piastrandolo su piastre più grandi in cui le colonie vengono piccate singolarmente e risospese in piastre da 96 pozzetti contenete 30µl di LB e in seguito conservate a -80°C.

In seguito è stato possibile costruire anche due lambda library, partendo sempre dagli stessi campioni e utilizzando il kit "ZAP Expressed Predigested Gigapack Cloning kits". Con tale vettore è possibile clonare frammenti di piccole dimensioni compresi tra i 2-19kb. Il DNA estratto viene sottoposto ad una reazione di digestione enzimatica con l'enzima Sau 3A. Il prodotto di digestione viene caricato sul gel d'agarosio allo 0,8%, i frammenti di dimensioni desiderate (3-8kb) vengono selezionati con eluizione da gel e clonati in ZAP Express vector. I passaggi successivi sono molto simili agli step eseguiti per la fosmid library. Una volta

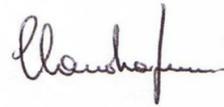
costituita la library si osservano sulle piastre placche di cellule che vengono isolate e piastrate nuovamente per avere le singole colonie, le quali vengono singolarmente piccate e risospese in piastre da 96 pozzetti contenete 30µl di LB e in seguito conservate a -80°C.

Nell'ultimo periodo della mia permanenza è stato possibile osservare lo screening di fosmid library metagenomiche mediante saggio funzionale piastrandolo le library su piastre contenente differenti substrati in modo da poter identificare le colonie avente attività lipasiche, cellulasiche e β-galattosidasiche.

In seguito, identificati i coloni positivi, ho estratto il DNA fosmidico il quale, dal laboratorio dove ho svolto la mia attività, sarà sottoposto a sub-clonaggio e sequenziato.

Bari, 2/9/2015

Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Claudio', written in a cursive style.