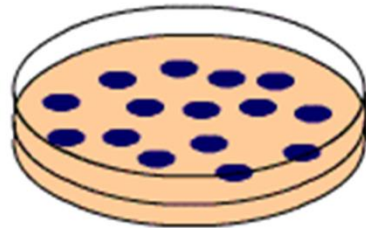


- **Vettori per la clonazione di frammenti di DNA**  
**VETTORI BASATI SUL BATTERIOFAGO  $\lambda$**   
**Formazione di genoteche (DNA > 10kb)**

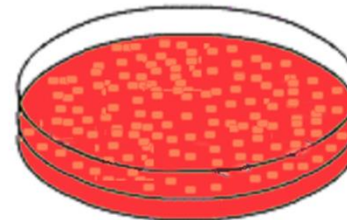
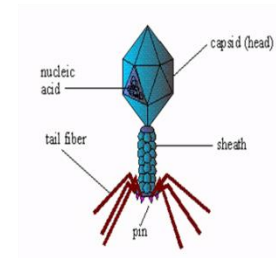
## Ospiti

### Batteri





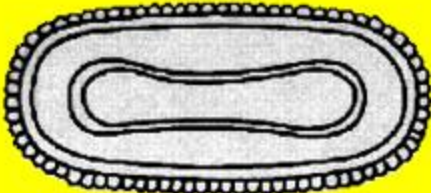




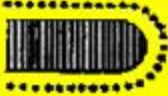









**Colonie**

### Virus (Batteriofagi)

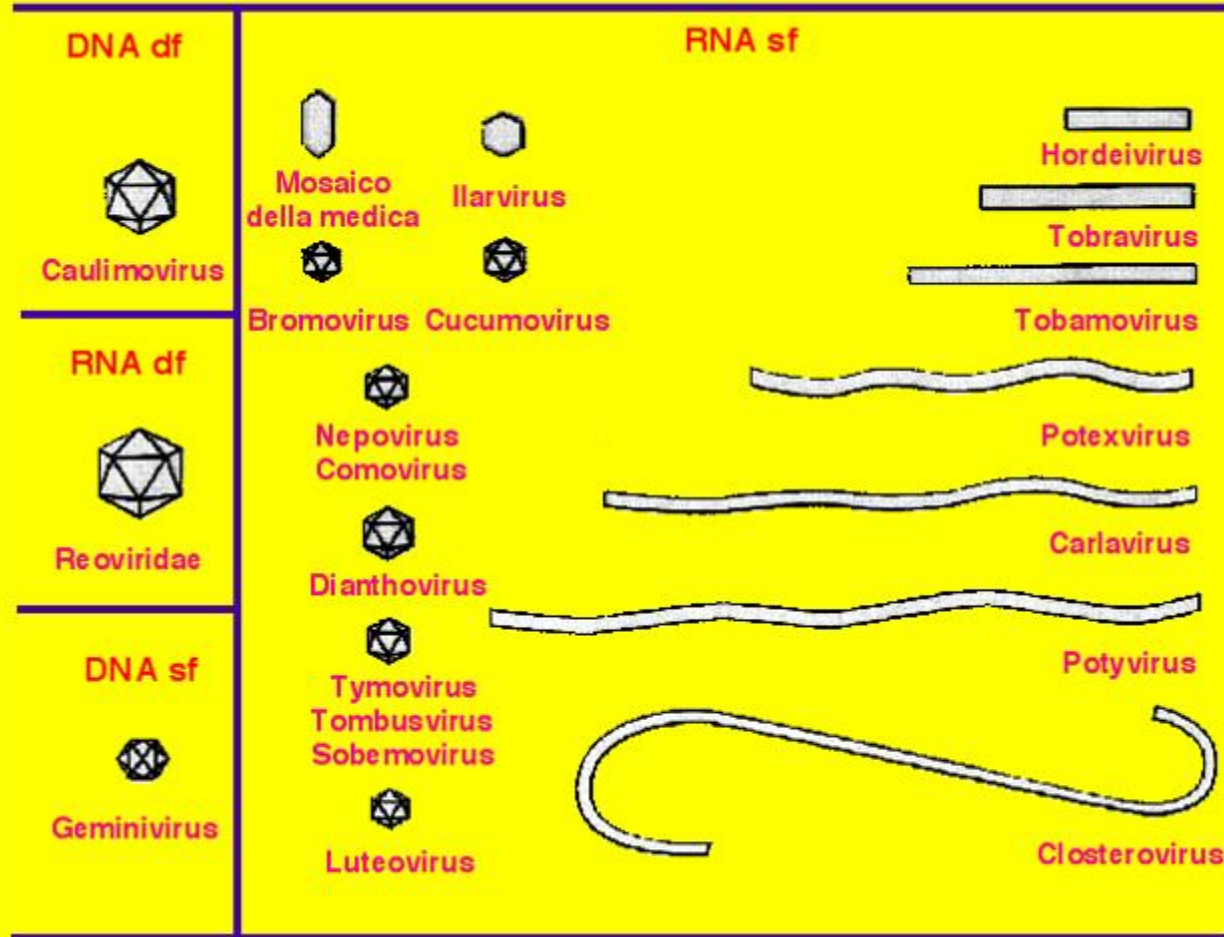


**Placche di lisi**

# Virus che infettano animali

Senza rivestimento		Con rivestimento	
<p><b>DNA df</b></p>  <p>Iridoviridae</p>  <p>Adenoviridae</p>		<p><b>DNA df</b></p>  <p>Poxviridae</p>  <p>Herpesviridae</p>	
<p><b>Papovaviridae</b></p>  <p>Papovaviridae</p>		<p><b>Paramyxoviridae</b></p>  <p>Orthomyxoviridae</p>  <p>Rhabdoviridae</p>  <p>Retroviridae</p> 	
<p><b>RNA df</b></p>  <p>Reoviridae</p>			
<p><b>RNA sf</b></p> <p>Picornaviridae</p>  <p>Caliciviridae</p> 	<p><b>DNA sf</b></p> 	<p><b>Arenaviridae</b></p>  <p>Coronaviridae</p>  <p>Bunyaviridae</p>  <p>Togaviridae</p> 	

# Virus che infettano piante



# Virus batterici

DNA df



Myoviridae



Styloviridae



Podoviridae



Tectiviridae



Corticoviridae

DNA sf



Inoviridae

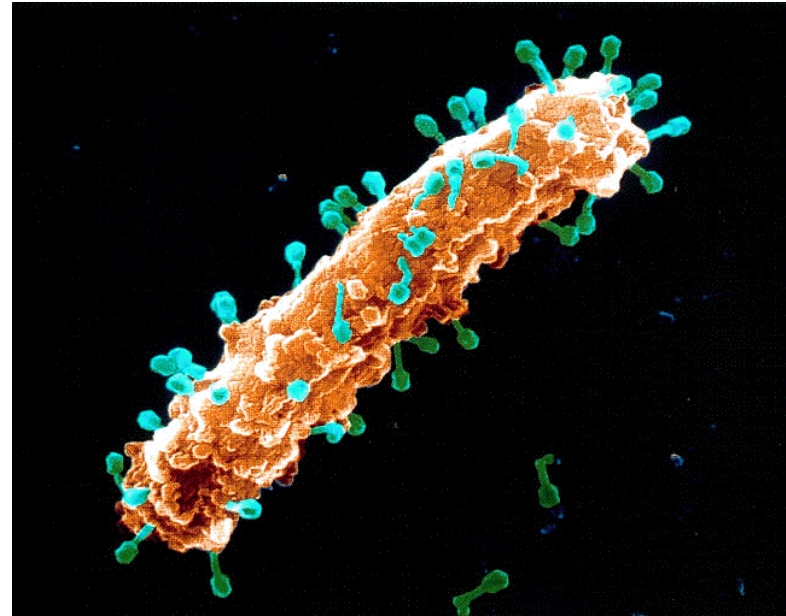
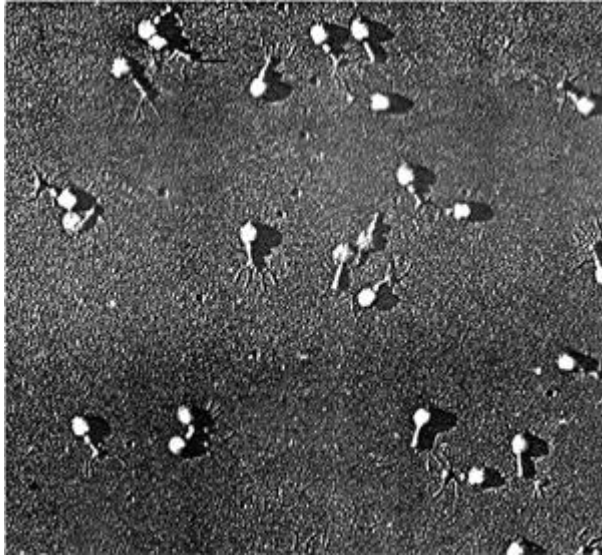


Microviridae

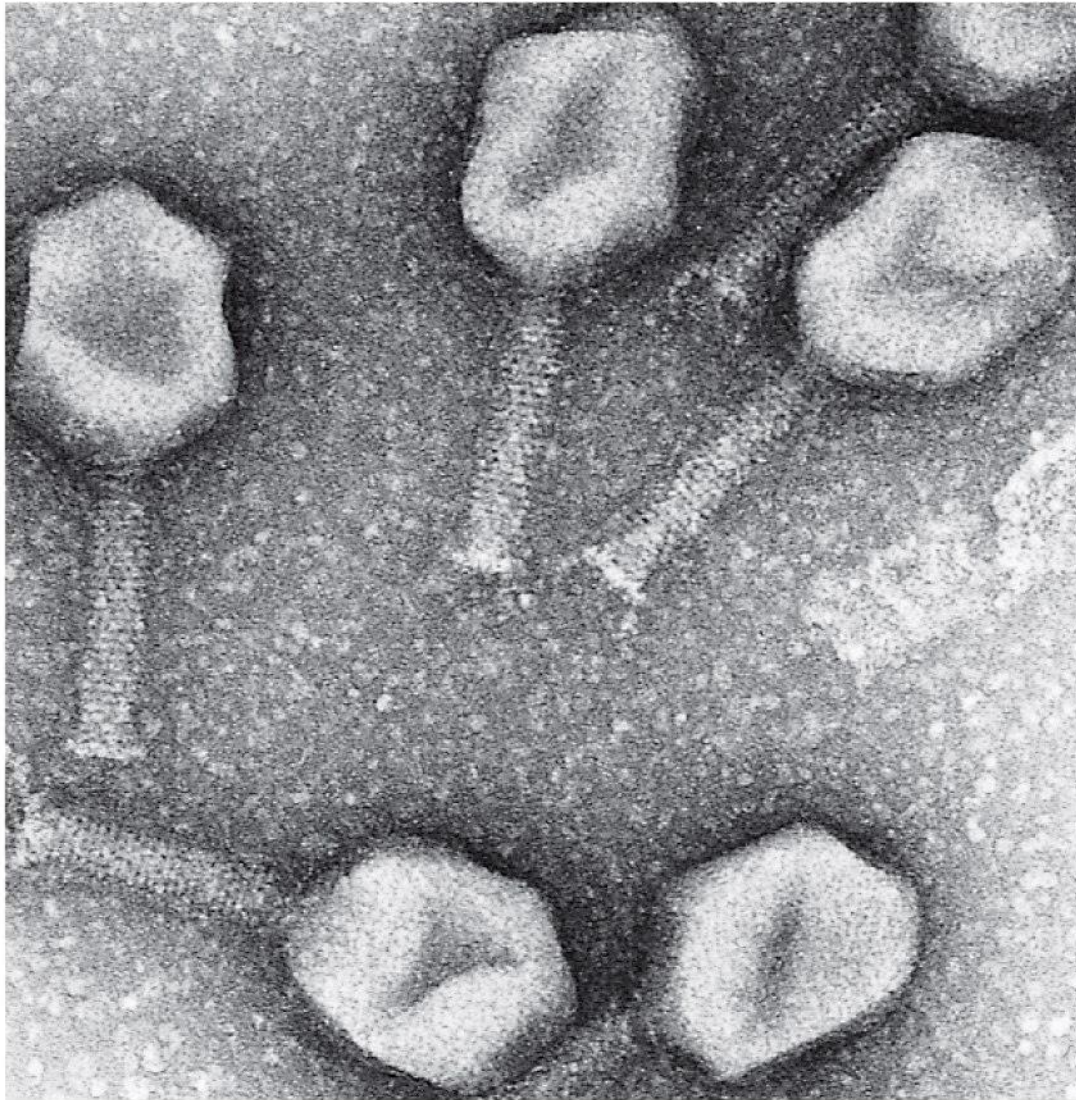
RNA sf



Leviviridae



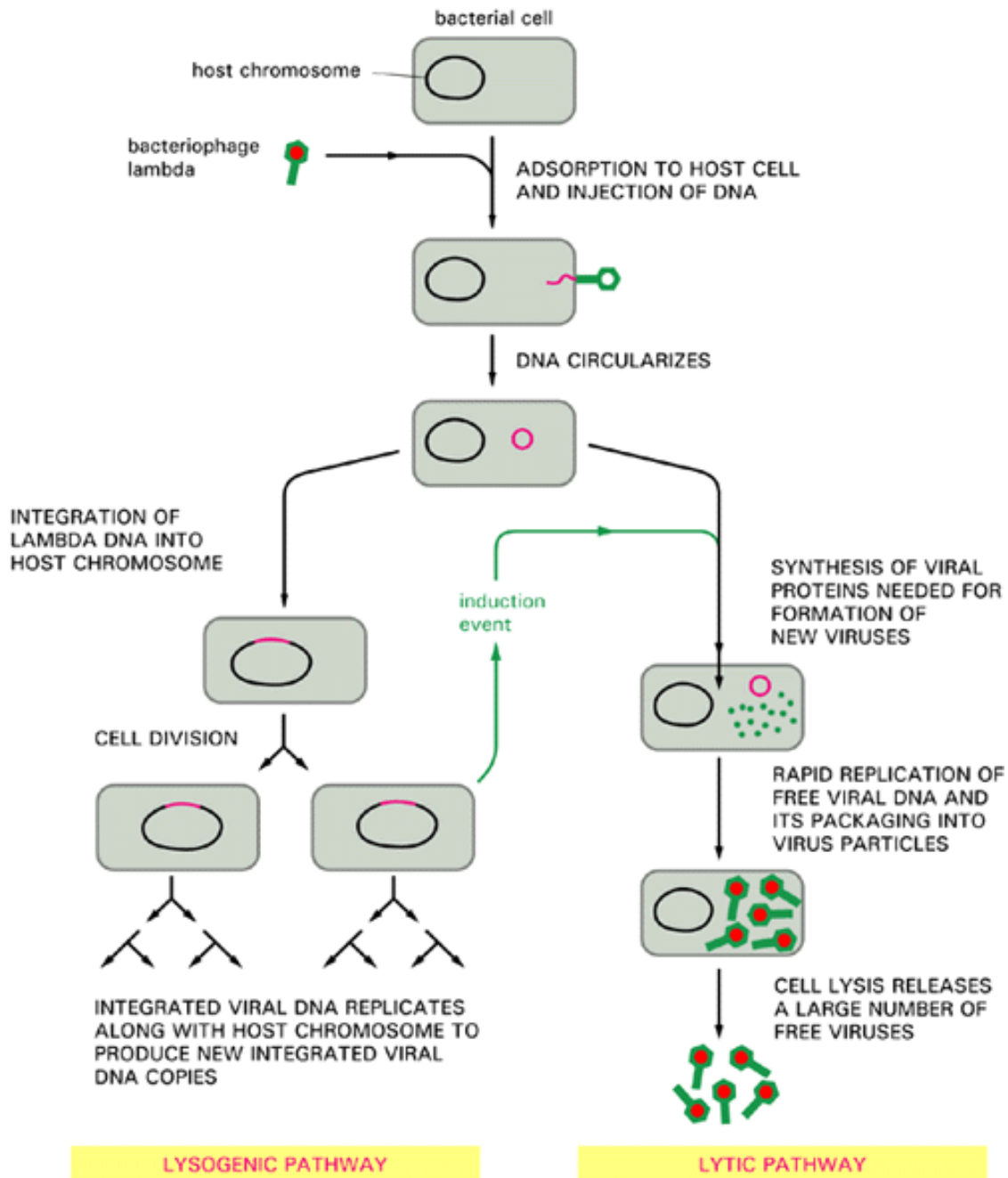
**Il numero di particelle fagiche prodotte per ogni particella infettante ("burst size") è caratteristico di ciascun batteriofago. Esso può giungere a 10.000.**



**100 nm**



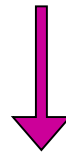
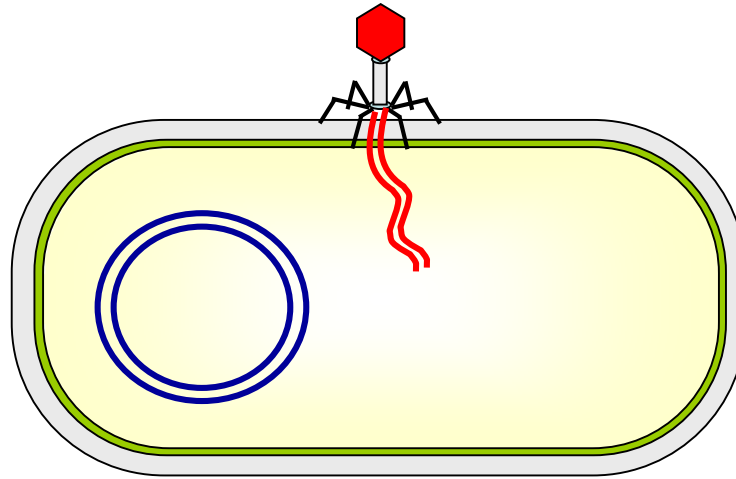
┌  
└  
**100 nm**



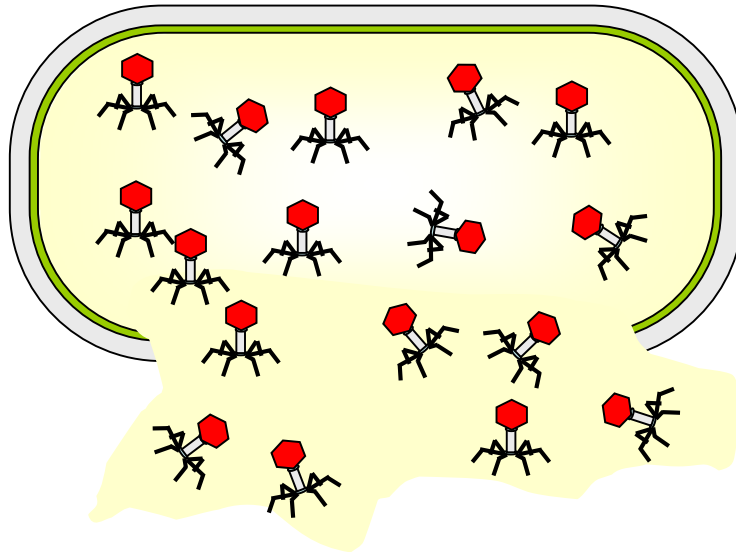
# Il ciclo vitale del fago lambda



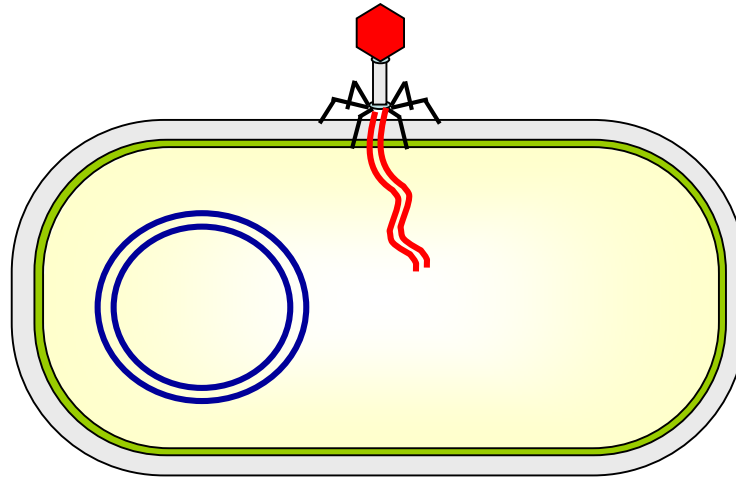
# Batteriofagi virulenti



ciclo litico

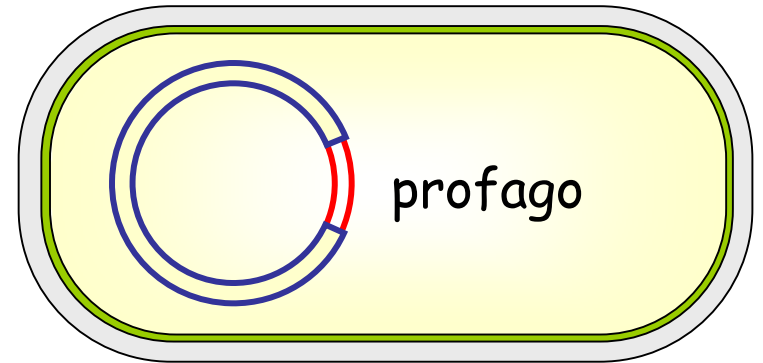
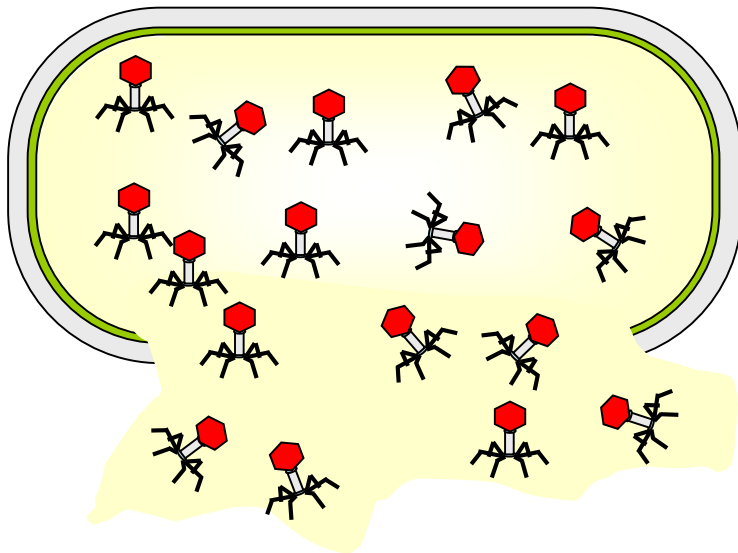


# Batteriofagi temperati



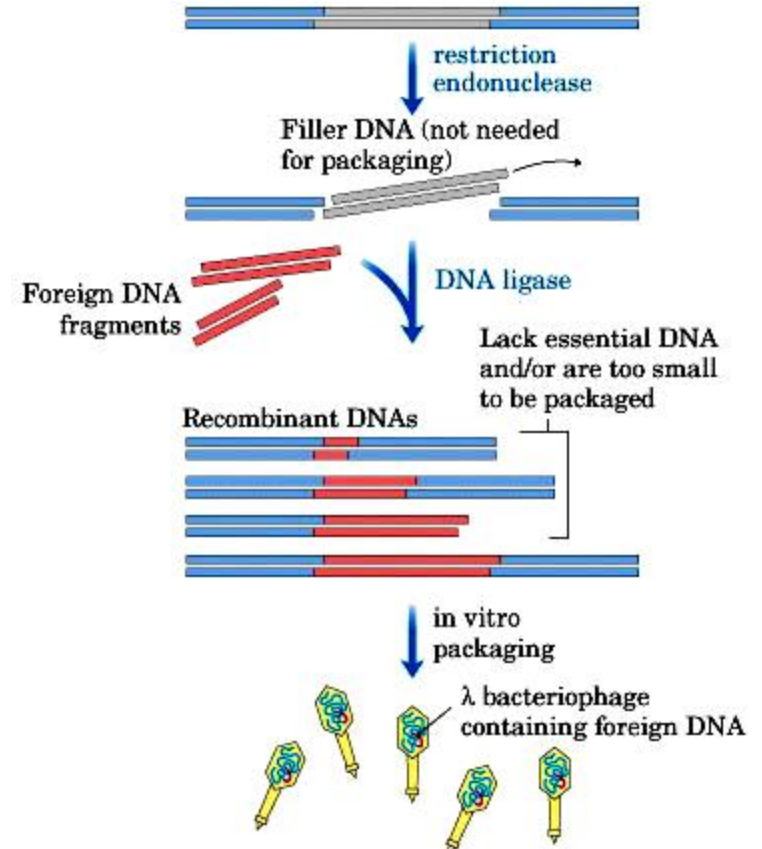
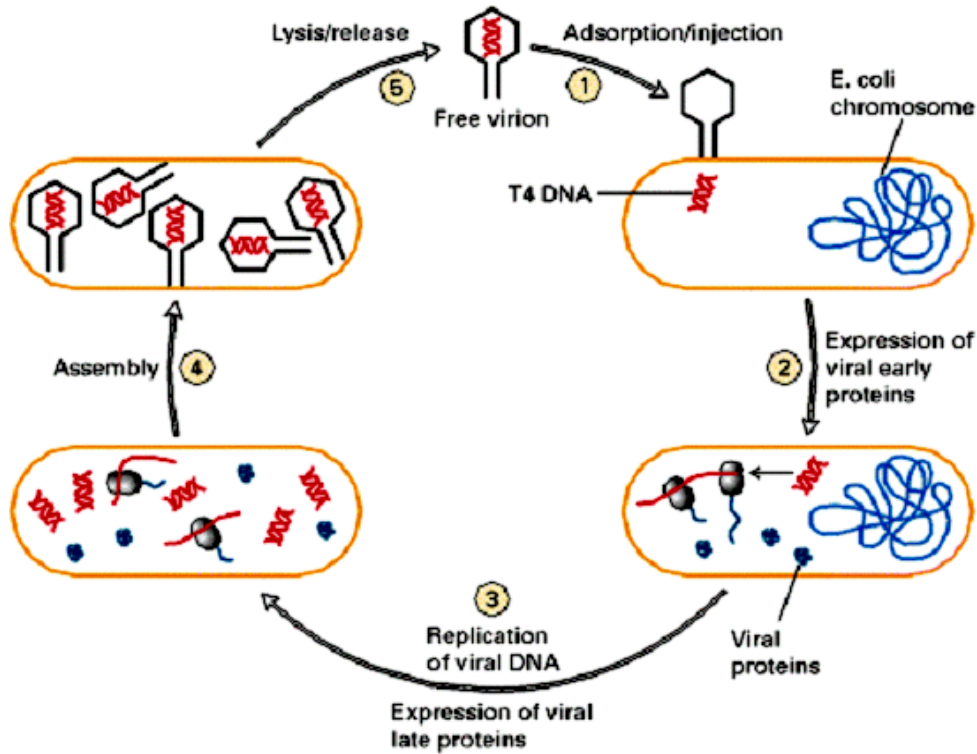
ciclo litico

ciclo lisogenico



induzione

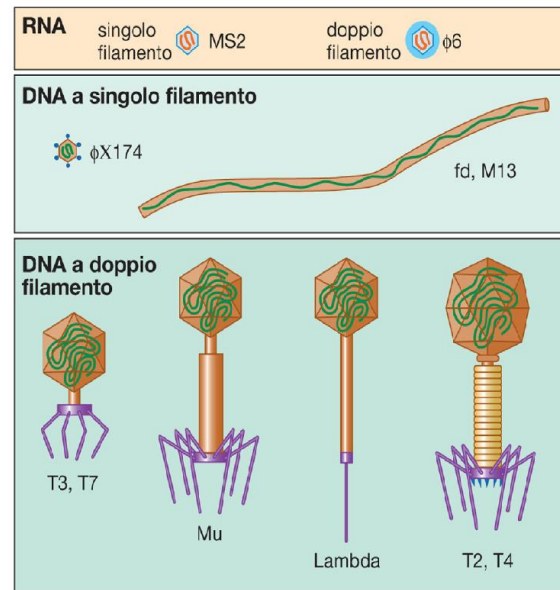
# Vettori fagici



# Fago lambda

**Il genoma di lambda è una molecola lineare a doppio filamento di 48 kbp.**

**Le estremità 5' e 3' presentano 12 nt a singolo filamento chiamate estremità *COS*, che sono complementari tra loro e permettono la circularizzazione del DNA di  $\lambda$  dopo l'infezione della cellula ospite.**

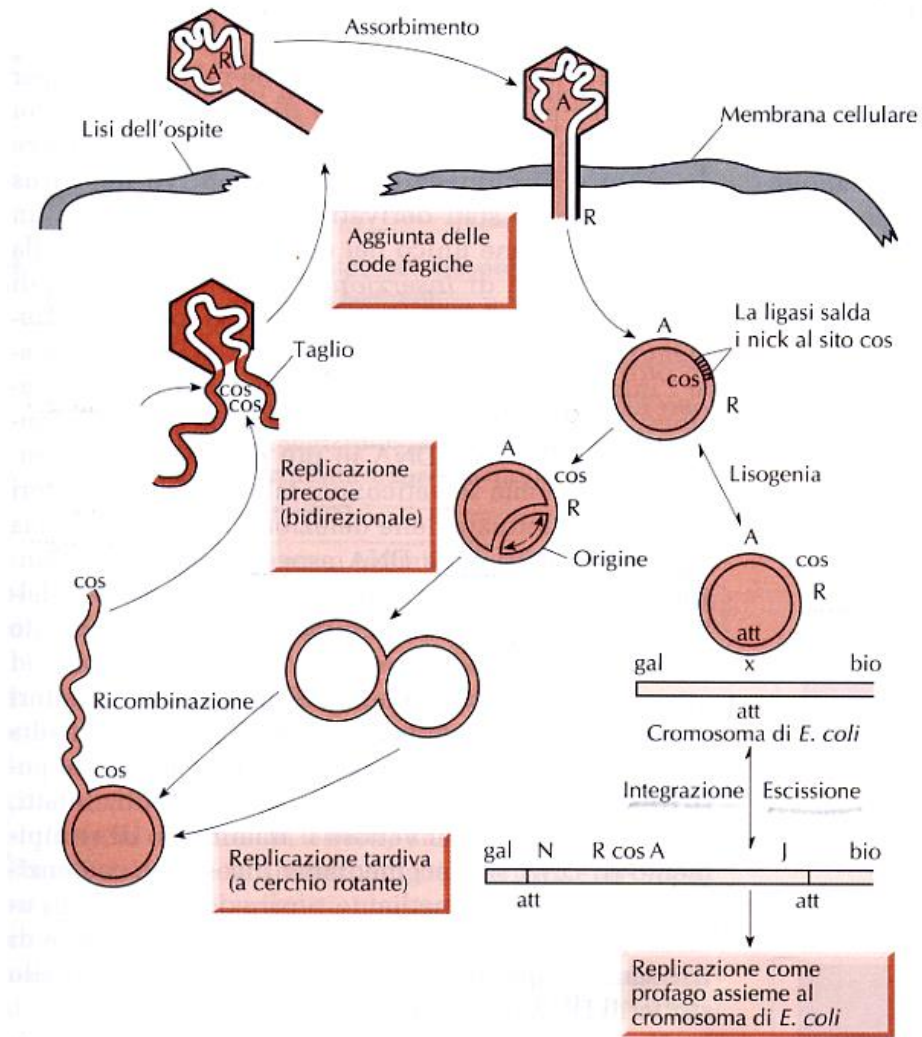


## **Ciclo litico di $\lambda$**

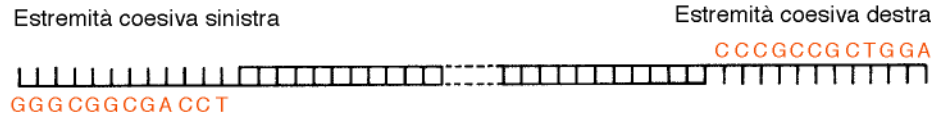
**In una normale infezione litica, il DNA di  $\lambda$  è introdotto, sotto forma di DNA lineare all'interno della cellula batterica.**

**Qui il DNA fagico ri-circularizza, sfruttando le sue estremità coesive *cos*, circularizza e viene inizialmente replicato come i plasmidi (replicazione theta) e successivamente si replica con la modalità del circolo rotante producendo lunghi concatenameri di singoli genomi fagici.**

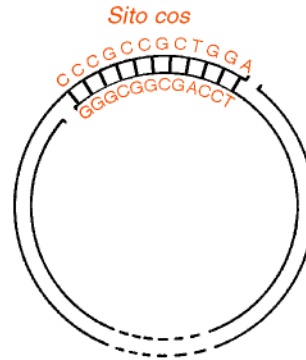
**Contemporaneamente sono espressi i geni strutturali che portano all'assemblaggio delle teste "vuote", dove si inseriscono singole unità di  $\lambda$  generate tagliando i concatenameri ai siti *cos*.**



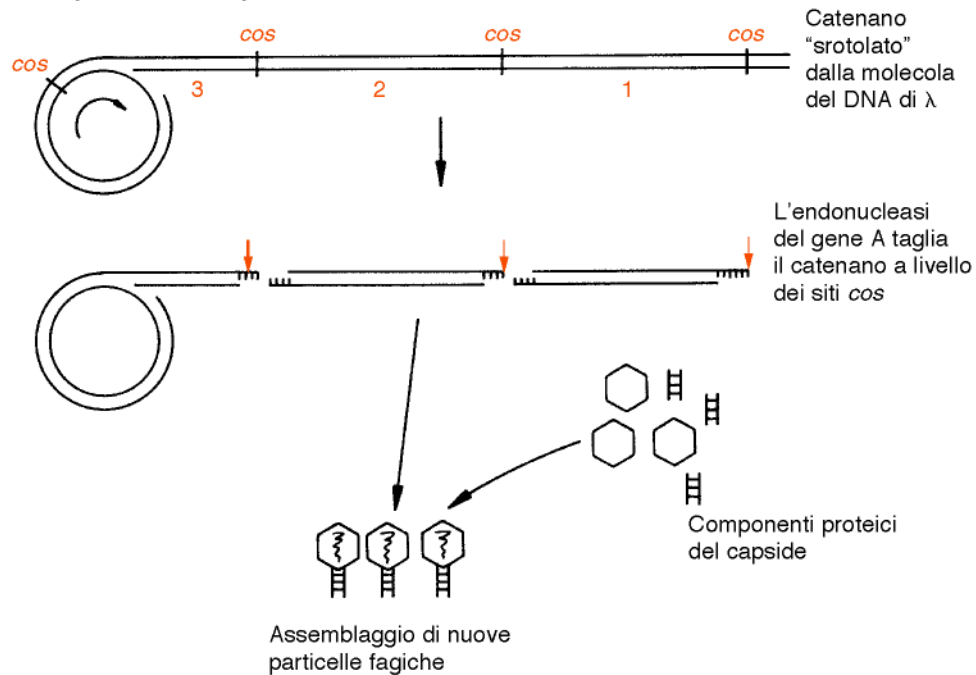
(a) La forma lineare della molecola di DNA di  $\lambda$



(b) La forma circolare della molecola di DNA di  $\lambda$

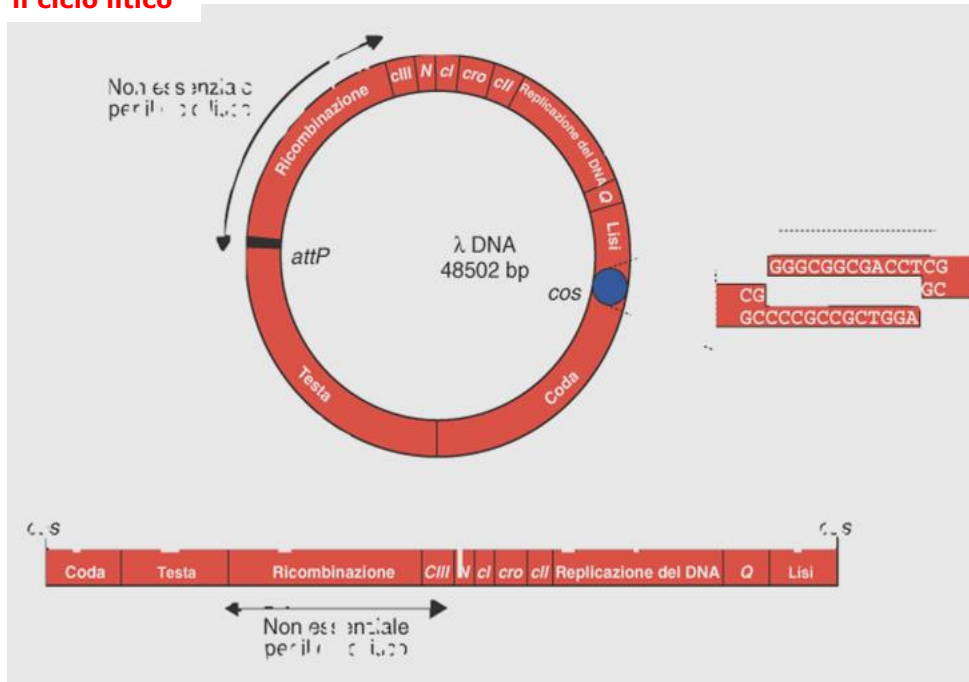


(c) Replicazione e impacchettamento di DNA di  $\lambda$



# Fago lambda

Non essenziale  
per il ciclo litico



Non essenziale  
per il ciclo litico

La mappa genetica del fago  $\lambda$  comprende circa 40 geni che possono essere suddivisi in tre gruppi funzionali:

-a sinistra, comprende i geni che codificano per proteine strutturali della testa e della coda;

-al centro, contiene geni responsabili per la lisogenia, cioè il processo che porta all'integrazione del DNA virale ed altri processi ricombinativi.

**Gran parte di questa regione non è essenziale per la crescita litica e può essere eliminata per la costruzione di vettori.**

-a destra contiene i geni coinvolti nella replicazione del DNA e nel ciclo litico.



## Fago lambda come vettore di clonaggio

Lo sviluppo di vettori di clonaggio di tipo  $\lambda$  è stato possibile perché:

- La regione centrale non è essenziale e può essere rimossa dal genoma senza alterare il ciclo litico e la formazione delle placche di lisi.

14,5 Kbp di DNA estraneo ricostituirebbero la lunghezza originale del genoma di  $\lambda$

- Inoltre i bracci di  $\lambda$  hanno altre regioni non essenziali che possono essere rimosse

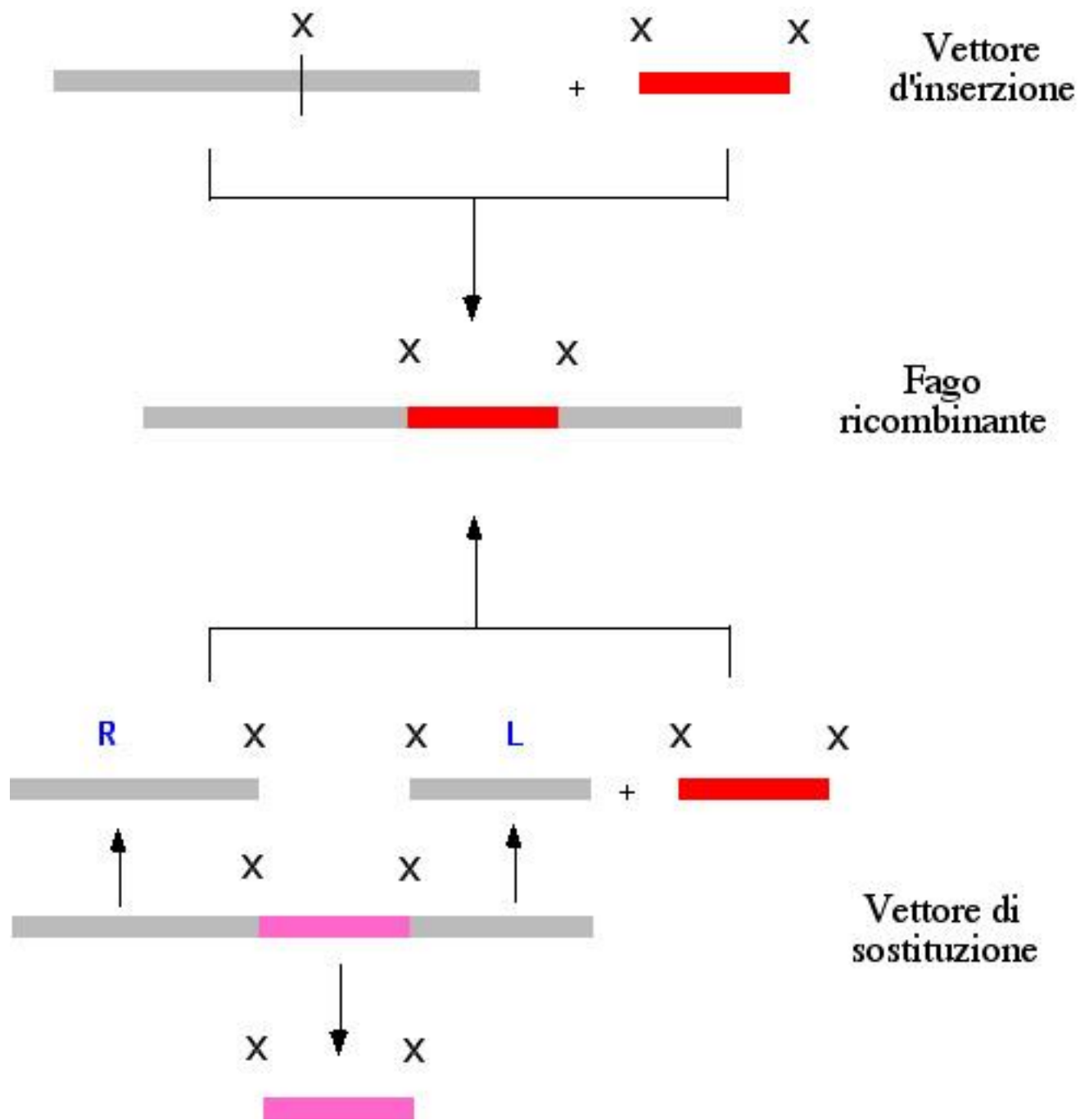
**22 Kbp di DNA estraneo inseribile**

# Fago lambda come vettore di clonaggio

I siti di restrizione naturali presenti nel genoma possono essere eliminati senza causare perdita delle funzioni geniche e ciò ha permesso di sviluppare vettori contenenti siti unici per il clonaggio del DNA esogeno.

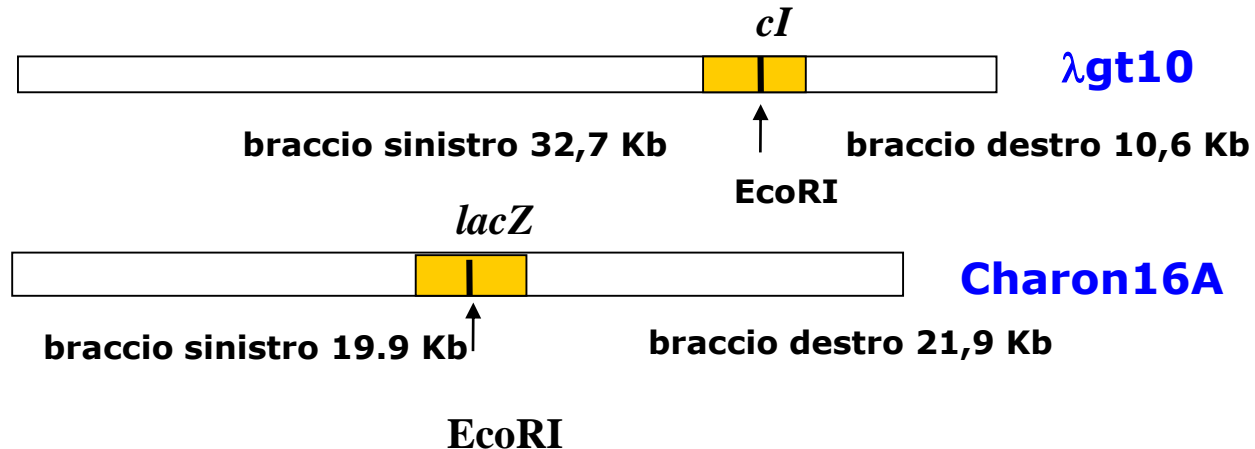
Sono stati sviluppati due tipi di vettori  $\lambda$  :

- **vettori d'inserzione**, in cui il DNA esogeno è inserito in un sito unico di restrizione;
- **vettori di sostituzione**, in cui il DNA esogeno sostituisce un pezzo di DNA del vettore (stuffer).



# Vettori d'inserzione

(strategie disponibili per l'identificazione dei ricombinanti)



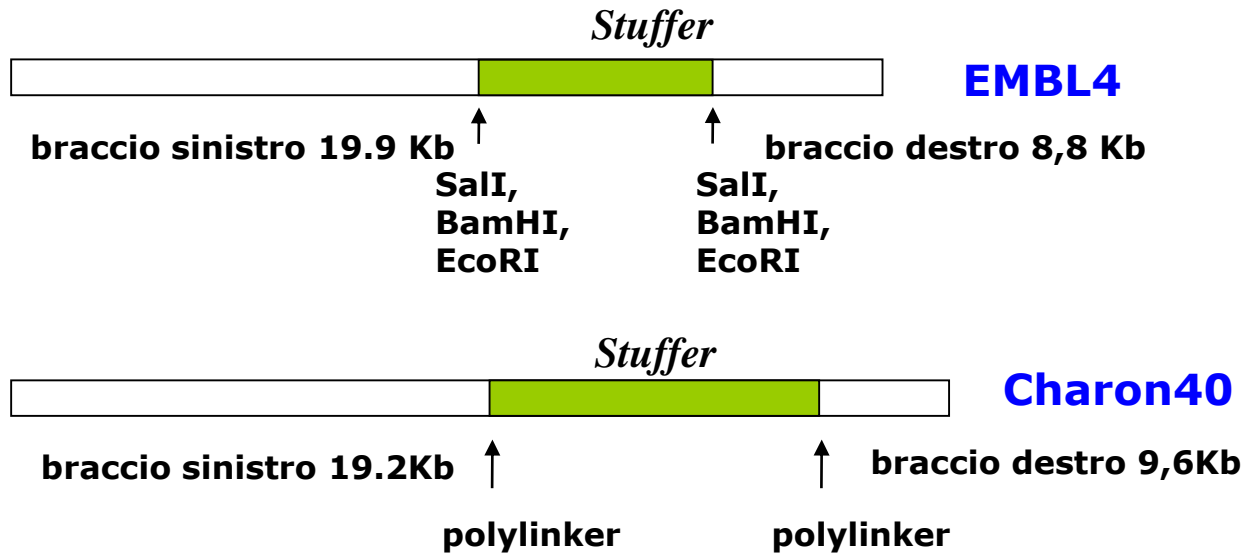
**λgt10** è un buon esempio di inattivazione inserzionale. Il sito EcoRI è posizionato in mezzo al gene **cI**. Un inserzione al suo interno, dunque distruggerà l'integrità strutturale del repressore e il fago non sarà più in grado di entrare nel ciclo lisogeno.

Quindi i fagi con l'inserzione daranno placche chiare (placche litiche), mentre i fagi senza inserzioni avranno colonie torbide (miscela di fagi lisogeni e litici)

**Charon 16A** contiene l'MCS nel **gene lacZ** ( $\alpha$ -peptide della  $\beta$ -galattosidasi) e i cloni ricombinanti sono identificabili attraverso lo screening bianco-blu in E.coli che esprimono il frammento  $\omega$  dell  $\beta$ -galattosidasi.

Questi vettori sono più facili da utilizzare e possono accettare inserti di dimensioni da 8 fino a 10-12 Kb. Sono generalmente utilizzati per costruire librerie di cDNA.

# Vettori di sostituzione

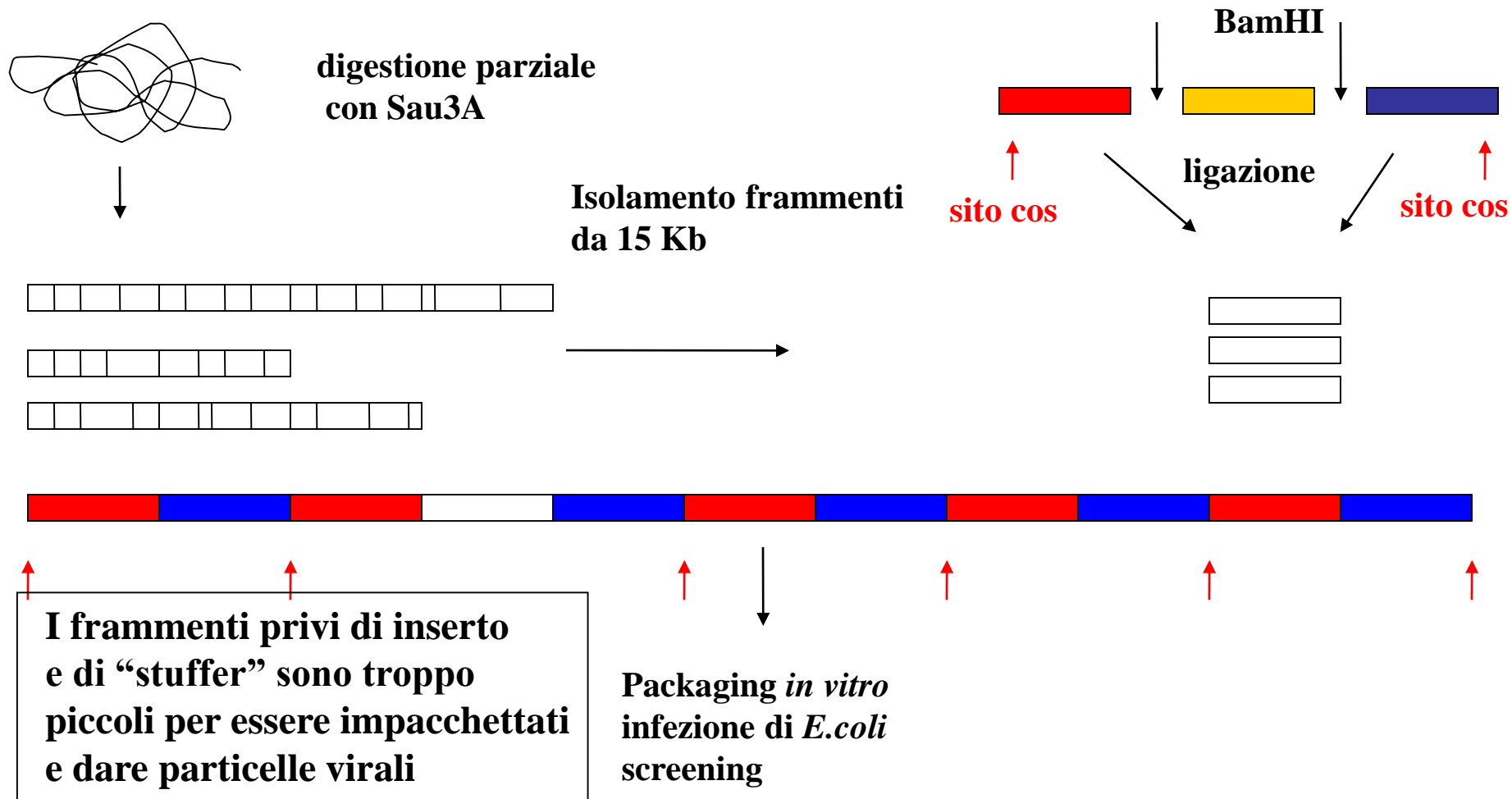


$\lambda$ **EMBL4** (42Kpb) contiene uno stuffer di 14 kpb tra il braccio destro e sinistro.

I vettori con due siti di taglio, in cui la parte centrale del DNA (frammento stuffer) può essere rimossa e sostituita con un frammento di DNA estraneo. Possono accettare inserti da 10 a 22 Kb e sono in genere utilizzati per costruire librerie genomiche.

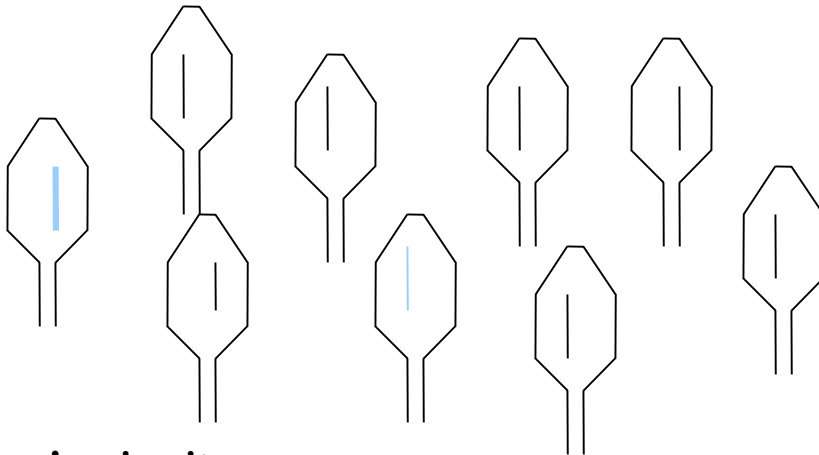
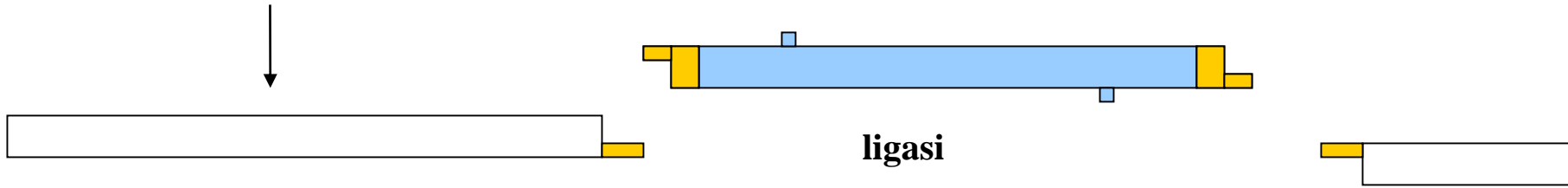
# Clonaggio in vettori di sostituzione

I vettori di sostituzione permettono di clonare frammenti di 15-20 kb. Si effettua una digestione genomica parziale con *Sau3A* e si purifica una popolazione intorno a i 15 kb. Si digerisce quindi un vettore di sostituzione con *BamHI*, complementare a *Sau3A*, e si ligano insieme i bracci destro, sinistro e la popolazione di digesti parziali di circa 15 Kb.

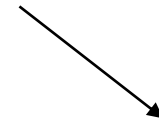


# Clonaggio in vettori di inserzione

$\lambda$ gt10 + EcoRI



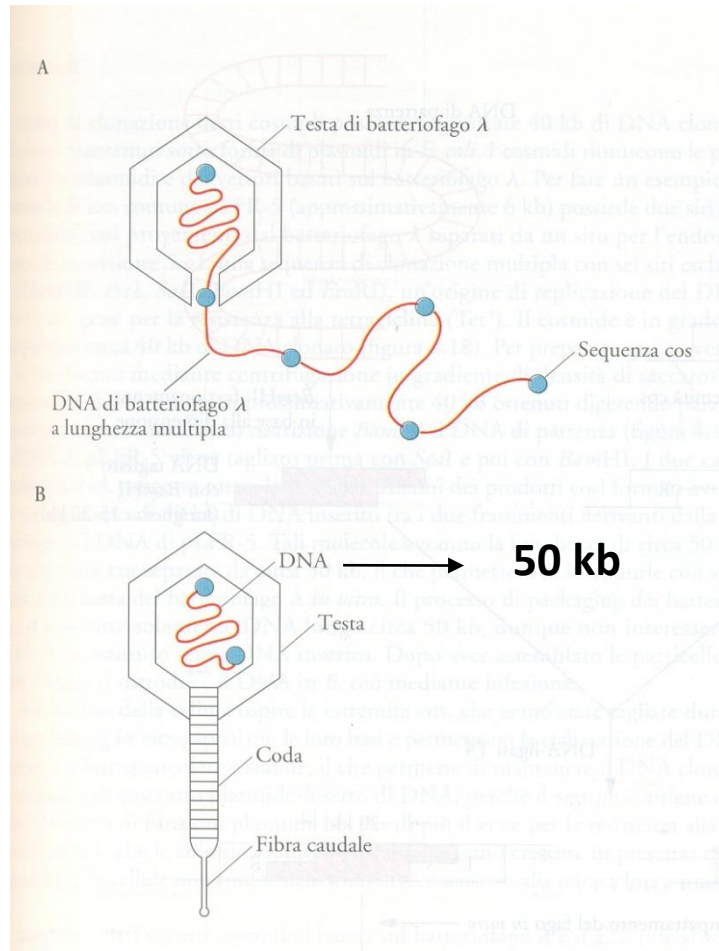
packaging *in vitro*



Infezione di  
*E.Coli*

*Solo i fagi ricombinanti danno placche di lisi*

# IL PACKAGING DEL DNA DEL BATTERIOFAGO I NELLE TESTE DURANTE IL CICLO LITICO



Il packaging in vitro sfrutta l'esistenza di fagi mutanti, che producono teste fagiche vuote, in quanto mancanti di una proteina necessaria per il packaging, e di fagi capaci di effettuare il packaging ma incapaci di produrre le teste. Mescolando in provetta queste due popolazioni fagiche insieme al nostro DNA, avremo un'efficiente packaging in vitro. I fagi ricombinanti saranno quindi utilizzati per infettare una popolazione di batteri sensibili ai fagi in soft agar.

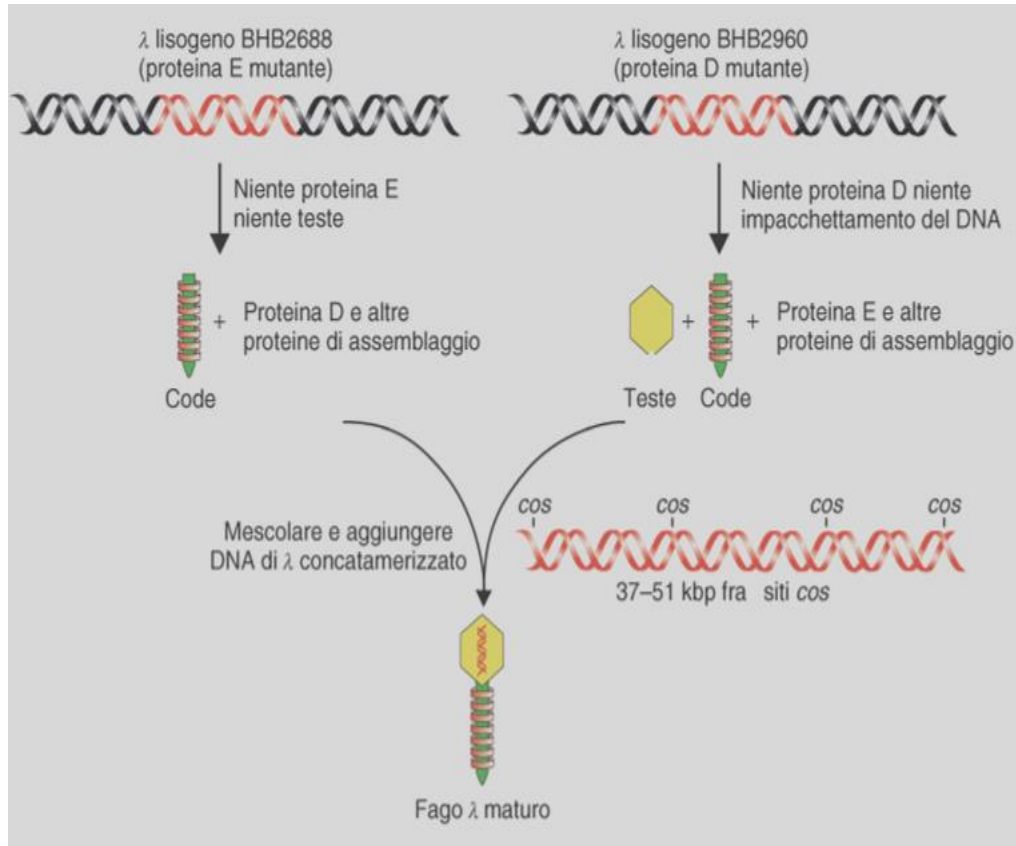
Il risultato sarà la produzione di placche di lisi, apparentemente simili a colonie batteriche.

Per il packaging esiste:

- un **limite inferiore**, pari al **75%** del genoma di  $\lambda$  (circa 37 Kbp, al di sotto il DNA non viene impaccato e il fago non è vitale)
- un **limite superiore**, pari al **105%** della lunghezza del suo DNA (circa 51Kbp)



# Packaging *in vitro* di particelle fagiche



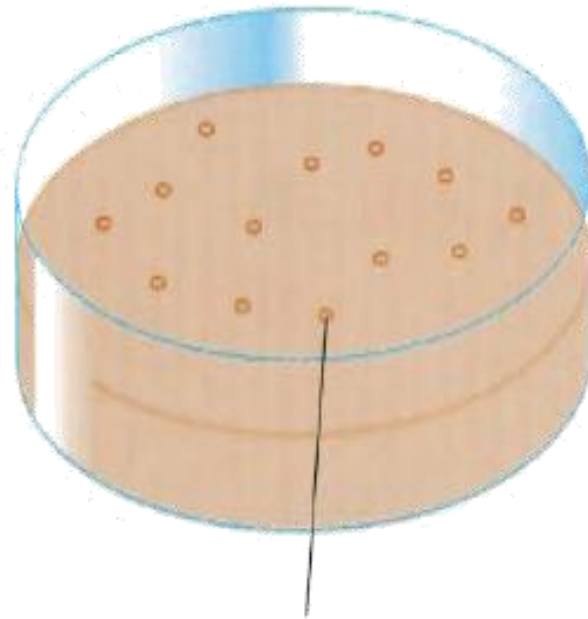
Un packaging molto efficiente *in vitro* può essere ottenuto mescolando il DNA ricombinante di  $\lambda$ , con due ceppi di *E.coli* che portano fagi  $\lambda$  lisogeni difettivi nel processo di impacchettamento:

- ceppo BHB2690, produce teste fagiche vuote, perché mancante della proteina D necessaria per il packaging del DNA;

- ceppo BHB2688, non produce la proteina E, e quindi le teste, ma contiene la proteina del packaging.

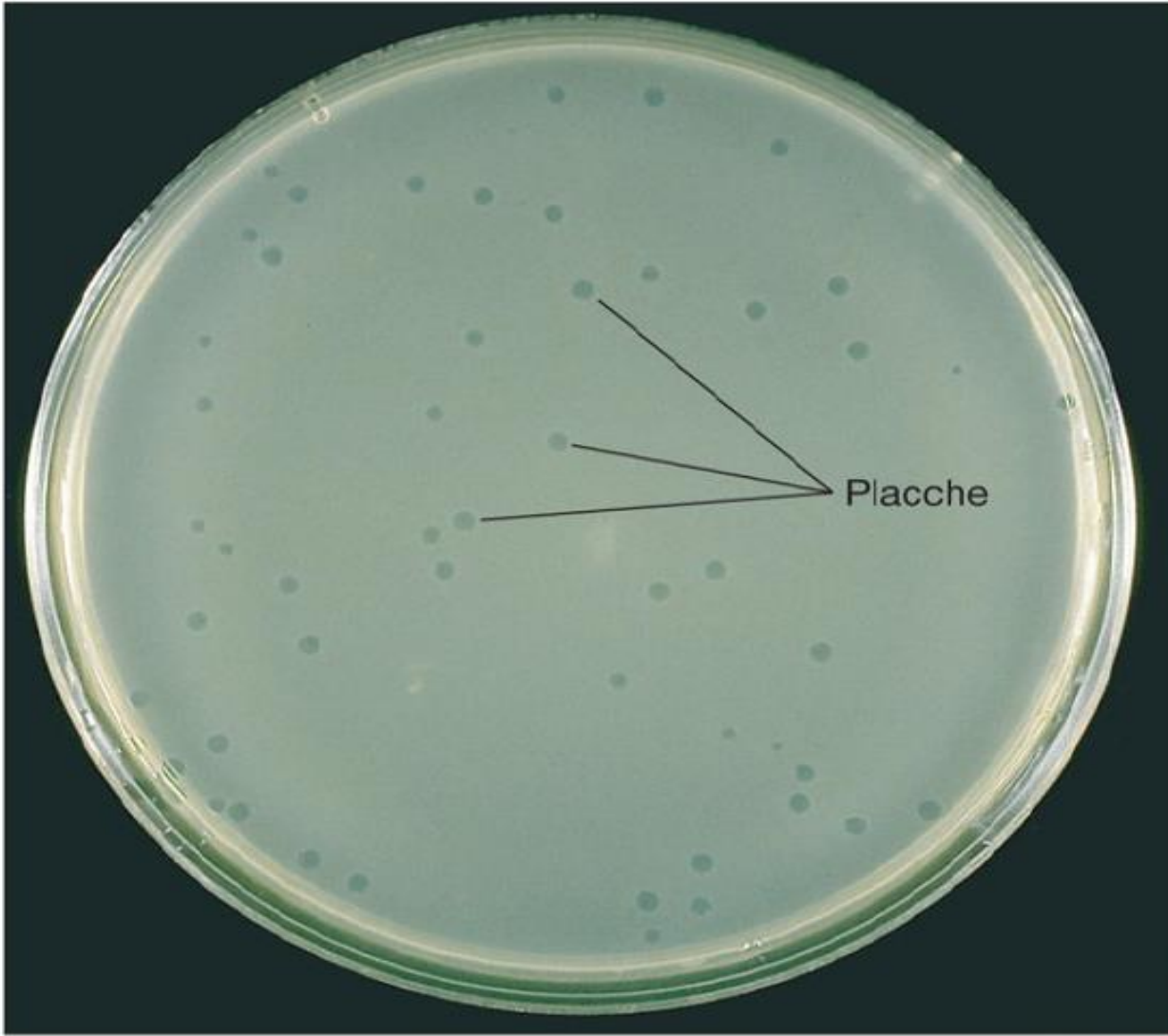
**Ricordiamo che:**

- **1- durante un'infezione litica il DNA virale è introdotto, sotto forma di DNA lineare di circa 48.5 Kb, all'interno della cellula batterica;**
- **2- una volta all'interno della cellula, il DNA fagico ricircolarizza, sfruttando le sue estremità coesive *cos*, e si replica come molecola circolare con una replicazione di tipo Teta, simile a quella batterica. Da un certo momento in poi, lambda comincia a replicarsi con una modalità di tipo "rolling circle, cominciando a formare lunghi concatenameri di singoli genomi fagici;**
- **3- contemporaneamente si esprimono i geni strutturali che assemblano delle teste "vuote", dove vengono inseriti singole unità di lambda ( un DNA di 48.5 Kb definito da due siti *cos*).**
- **4- infine viene assemblata la coda e i fagi lisano il batterio e fuoriescono.**

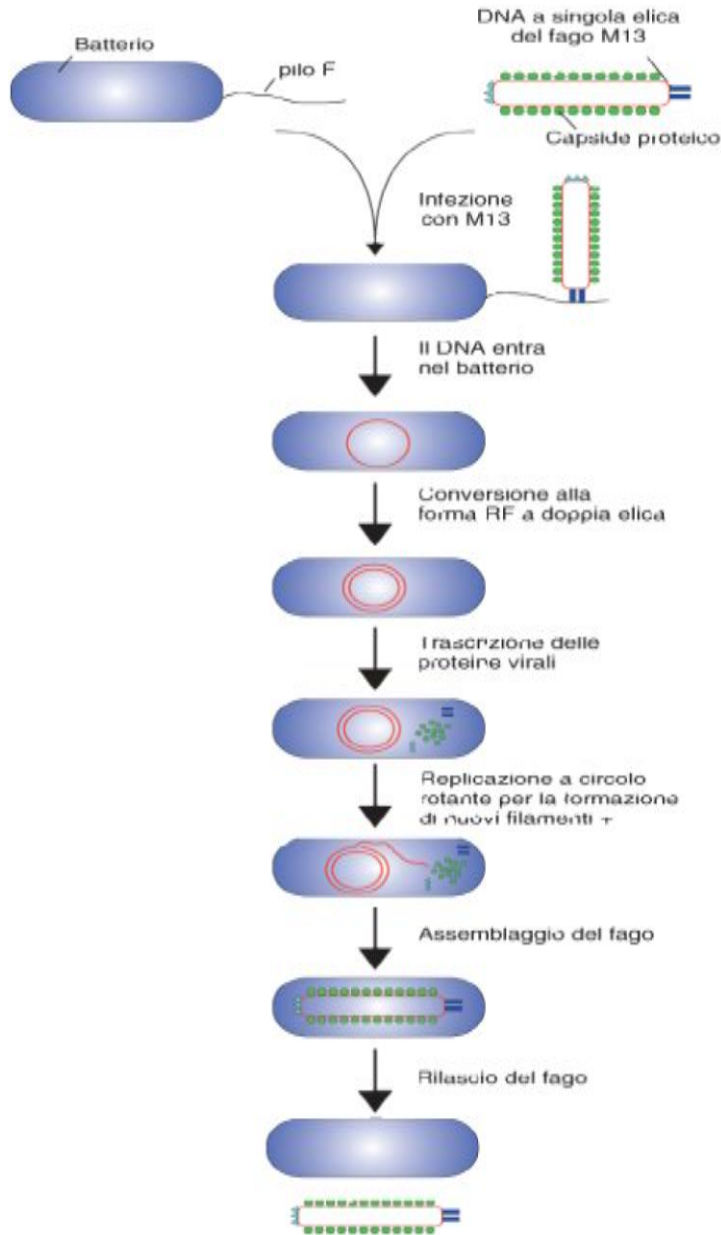


L'infezione è visualizzata  
come una placca, una zona  
pulita su uno strato  
di batteri

**Figura 4.23** L'infezione da parte del batteriofago è visualizzata come una placca su uno strato di batteri.



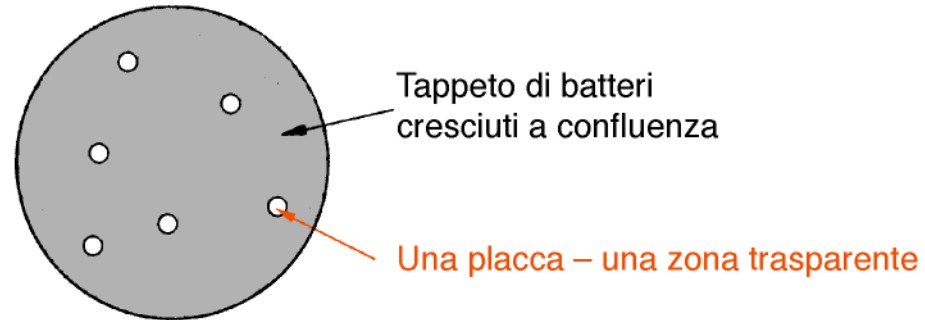
Jack Parker



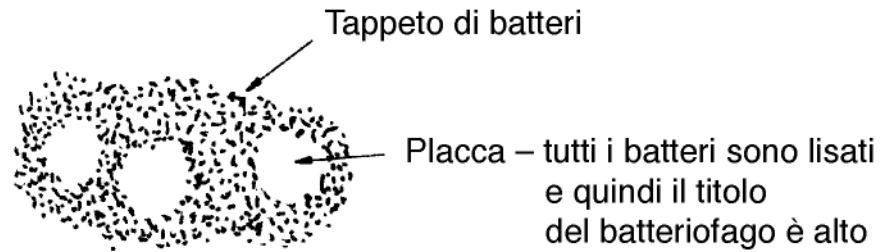
## La biologia del fago M13: il ciclo vitale

- Il genoma del fago M13 è costituito da una molecola di DNA circolare a singola elica, lunga 6407 nt.
- M13 infetta solo ceppi che portano il plasmide F. Esso infatti entra nella cellula batterica attraverso il pilo codificato dal fattore F.
- Il DNA viene convertito nella forma replicativa intermedia a doppio filamento (RF). Vengono sintetizzate circa 100 copie della forma RF.
- Inizia la replicazione a cerchio rotante di un'unica elica del genoma virale. Vengono sintetizzate circa 1000 copie.
- Il genoma viene assemblato alle proteine per costituire le nuove particelle virali che fuoriescono dalla cellula batterica senza causarne la lisi.

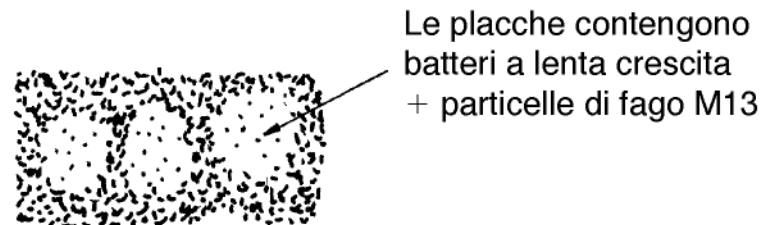
(a) Placche su un tappeto di batteri



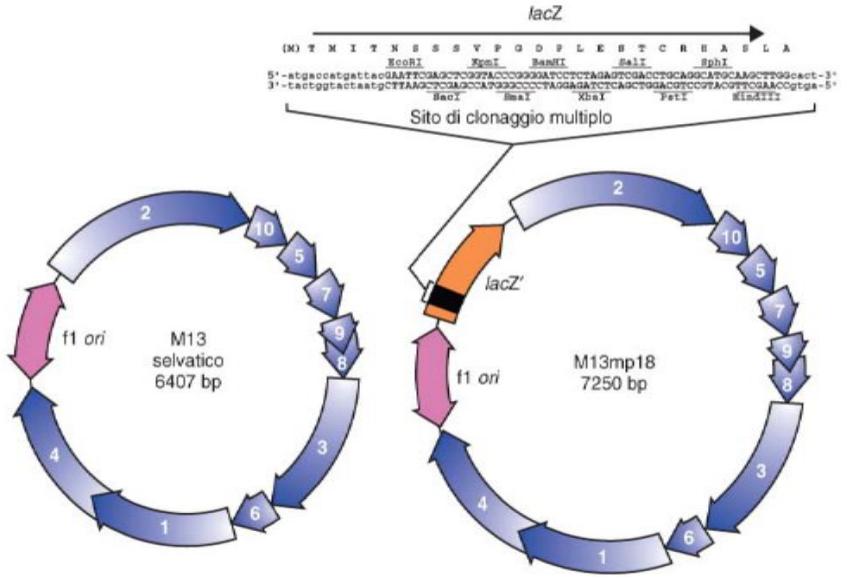
(b) Placche litiche



(c) Placche di M13



# Il batteriofago M13 come vettore per il clonaggio di DNA a singolo filamento

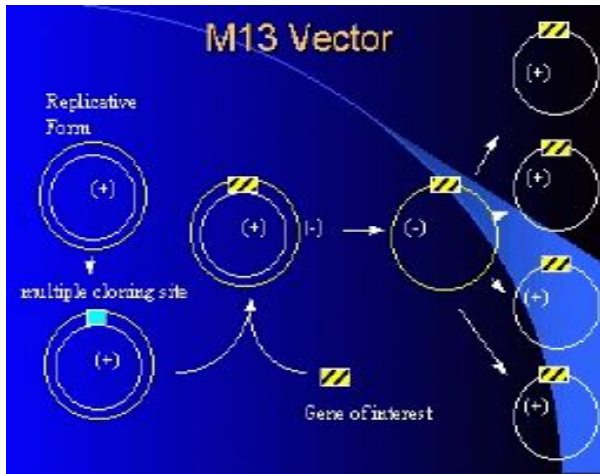


Il genoma del fago M13, nella sua forma replicativa intermedia RF, viene utilizzato come vettore di clonaggio.

Modificazioni del genoma selvatico per l'ottimizzazione del vettore:

- Aggiunta del gene *lacZ'* come marcatore genetico per la selezione bianco/blu delle placche positive contenenti il genoma ricombinante
- Aggiunta di un polylinker all'interno del gene *lacZ'*
- Eliminazione dei siti di restrizione naturali

## Tappe del clonaggio di DNA a singolo filamento nei vettori derivati dal fago M13



**Clonando l'inserto nell'orientamento opposto si ottengono copie multiple dell'elica complementare**

**Si linearizza il vettore M13 a doppio filamento con un enzima di restrizione, come se fosse un plasmide.**

- **Si mescola il vettore linearizzato con l'inserto avente estremità coesive compatibili con quelle del vettore. Si aggiunge la ligasi.**

- **Il prodotto della reazione di ligasi viene inserito nelle cellule *E. coli* mediante **trasformazione**.**

- **Nell'ospite batterico il vettore verrà replicato prima in maniera bidirezionale producendo copie a doppia elica e poi a cerchio rotante producendo copie a singola.**

- **Si selezionano le placche di colore bianco contenenti il vettore ricombinante e si scartano le blu contenenti il vettore virale senza inserto.**



## **Perché si clona DNA a singolo filamento?**

- ▶ Per sequenziare l'inserto clonato con il metodo di inserto Sanger
- ▶ Per mutare l'inserto con le tecniche di mutagenesi sito-specifica
- ▶ Per ottenere sonde di ibridazione a singola elica

## **Vantaggi del vettore M13**

- ▶ La forma replicativa RF a doppio filamento può essere manipolata come un normale plasmide

# Two Libraries : cDNA Library vs Genomic Library

Genes in expression

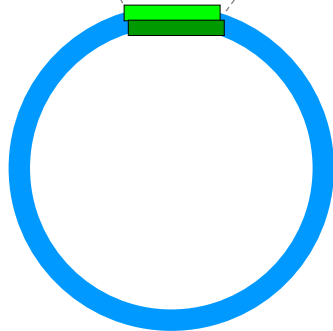
mRNA



Reverse transcription



cDNA Complete gene



Smaller Library

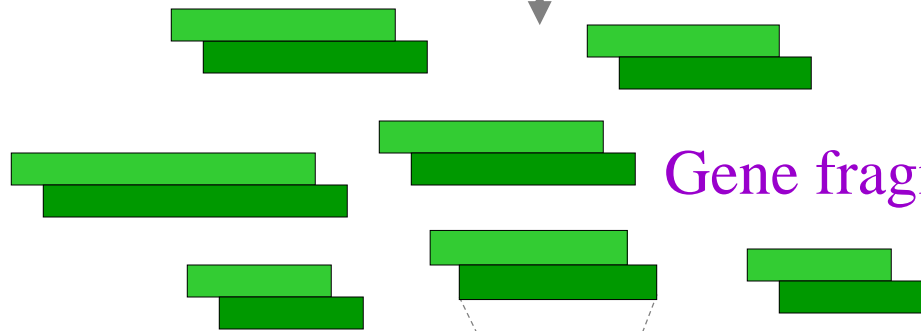
Vector: Plasmid

Total Gene

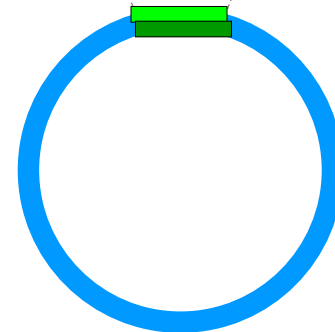
Chromosomal DNA



Restriction digestion



Gene fragments



Larger Library

Vector: Plasmid or phage

# Le genoteche o librerie di DNA

Collezione completa di frammenti di DNA, inseriti singolarmente in un vettore di clonaggio.

Possono essere di DNA genomico o di cDNA.

## Le genoteche o librerie di DNA:

• **Libreria genomica**: collezione di cloni che include tutto il DNA genomico di una certa specie (es. il genoma umano aploide contiene circa  $3 \times 10^9$  coppie di basi, che possono essere contenute in circa  $1.5 \times 10^5$  cloni di 20 kb ciascuno)

• **Libreria di cDNA**: collezione di cloni che include tutte le specie di mRNA (copiate in cDNA) espresse in un dato tessuto, incluso quelle piu' rare

# Vantaggi delle librerie di cDNA

- Dalla sequenza dei cloni si può derivare direttamente la sequenza della proteina codificata.
- Ogni libreria contiene solo quelle specie di mRNA (trascritte in cDNA) che sono espresse in un dato tessuto e in una data condizione.
- Un problema che si presenta quando si clonano grossi frammenti di DNA in vettori plasmidici è che se riesce, la trasformazione avviene con una bassissima efficienza in quanto le molecole di DNA sono molto grandi. Tale problema è stato risolto con tramite l'impiego dei vettori cosmidici.

# COSMIDI

- ► Possono contenere **40 kb** di DNA
- ► MANTENUTI SOTTO FORMA DI PLASMIDI IN *E. coli*
- ► PROPRIETA' DEI PLASMIDI E DI VETTORI BASATI SUL BATTERIOFAGO LAMBDA

## VANTAGGI

- ► GRUPPI DI GENI o GENI GRANDI VENGONO CLONATI PIU' FACILMENTE
- ► SCREENING DI UN NUMERO MINORE DI CLONI AI FINI DELLA CREAZIONE DI UNA GENOTECA

Del plasmide possiede:

- funzione replicativa,
- Sito di polylinker,
- marcatori che ne permettono la selezione.

Del fago  $\lambda$  possiede:

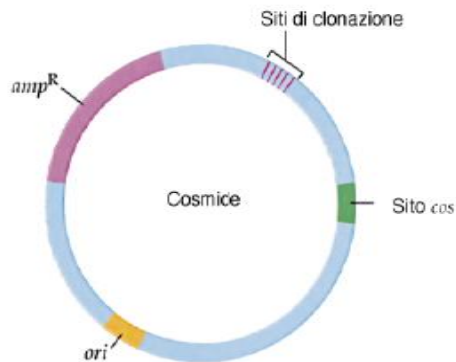
- Le estremità coesive "cos",
- ~ 250bp assicurano la giunzione cos (sequenze necessarie per il legame e per il taglio della terminasi)

# Caratteristiche dei vettori cosmidici

I cosmidi sono vettori di clonaggio creati dall'uomo. Uniscono alcune proprietà dei plasmidi e dei fagi.

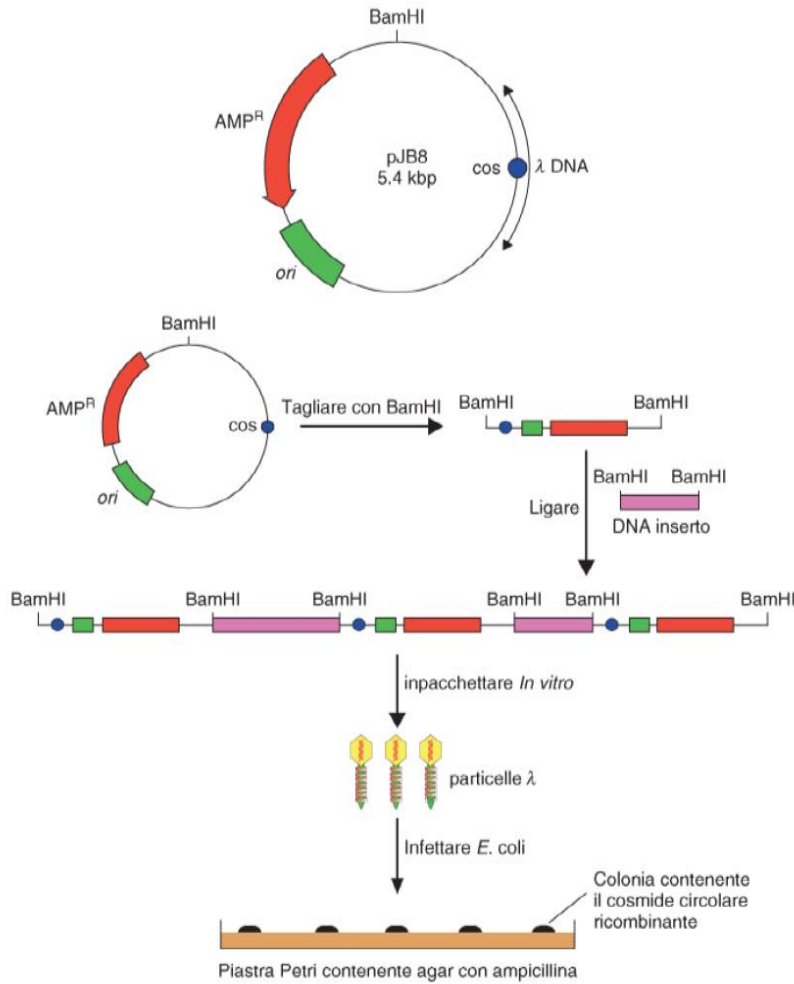
Sono plasmidi contenenti la regione *COS* del fago lambda.

Si replicano come i plasmidi poiché contengono la sequenza *ORI*, ma si impaccano nelle teste proteiche a formare le particelle virali come i fagi poiché contengono le estremità *cos*. Una volta all'interno della cellula, il cosmide non può dirigere la sintesi di nuove particelle fagiche (manca dell'intero corredo genico del fago) e pertanto si replica come un plasmide.



- ▶ Dimensioni del cosmide: ~5 kb
- ▶ ORI
- ▶ Polylinker
- ▶ Marcatori genetici selezionabili  
(in genere il gene *Ap Ap<sup>R</sup>* e *lacZ lacZ'*)
- ▶ Sito *Cos*

## Schema semplificato del clonaggio in vettori cosmidici



- ▶ **Linearizzazione del cosmide con un enzima di restrizione**
- ▶ **Digestione enzimatica del DNA genomico e selezione dei frammenti con dimensioni 32- 47 kb**
- ▶ **Reazione di ligasi**
- ▶ **Impaccamento in vitro**
- ▶ **Infezione delle cellule batteriche. Nelle cellule ospiti il cosmide circularizza si replica come un plasmide**
- ▶ **Selezione bianco/blu delle colonie batteriche ampicillina resistenti in terreno contenente ampicillina e X-Gal**



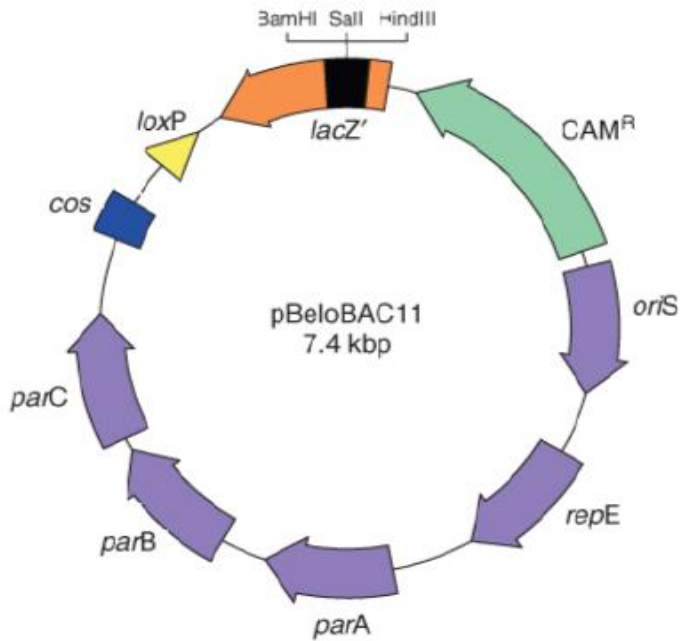
# Vantaggi dei vettori cosmidici

- ▶ Clonaggio di inserti di dimensioni comprese tra le 32 le 47 kb kb.
- ▶ Migliore efficienza di trasferimento del vettore ricombinante nelle cellule batteriche.
- ▶ Sono molto utili ai fini della creazione di una genoteca poiché gli inserti di maggiori dimensioni permettono lo screening di un numero più ridotto di cloni.

## **SISTEMI DI VETTORI BATTERICI A INSERTO MOLTO GRANDE (>100kb)**

- **FACILITANO L'ANALISI DEI GENOMI EUCARIOTICI COMPLESSI**
- **INDISPENSABILI PER:**
  - **▶ MAPPATURA GENOMA UMANO**
  - **▶ SCOPERTA DI GENI UMANI**

**Caratteristiche dei vettori BAC** :I Cromosomi Artificiali Batterici (BAC) sono vettori che derivano dal fattore sessuale F. Vengono introdotti nelle cellule con trasformazione (1-2 copie per cellula)



- siti *cos* del fago  $\lambda$
- siti *loxP* del fago P1
- polylinker
- marcatori genetici selezionabili (CmR, *lacZ'*, *sacB*)
- *oriS* e *repE* per la replicazione del fattore F
- i geni *par* per la stabilità segregativa (mantenimento di un solo vettore per cellula)

### BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

Tipo di vettore che permette di inserire fino a 300Kb di inserto, è stato creato usando come modello il plasmide F (fattore di fertilità responsivo della coniugazione batterica), grazie ai geni del fattore F che conferiscono al vettore una bassa percentuale di co-clonazione e ricombinazione interna è presente solo in 1 o 2 copie per cellula. E' molto stabile nelle generazioni. Per la trasformazione batterica con questo vettore si usa l'elettroporazione.

# **Cromosomi artificiali**

**Un'estensione logica nella produzione di vettori per il clonaggio di grossi frammenti di DNA è quella di ricostruire un cromosoma a replicazione autonoma nel quale possono essere inseriti frammenti di DNA esogeno**

**I cromosomi naturali eucariotici per la loro stabilità e funzionalità hanno le seguenti strutture:**

**Telomeri (DNA e proteine all'estremità dei cromosomi, che hanno una funzione protettiva)**

**Centromeri (segmenti di DNA altamente ripetuti che sono essenziali per il controllo e la segregazione cromosomica)**

# Cromosomi artificiali di lievito:YAC

I vettori YAC contengono:

- un centromero (*CEN4*)
- una sequenza a replicazione autonoma (*ARS1*) che permette la replicazione autonoma rispetto alle origini di replicazione cromosomiche
- telomeri (*TEL*) necessari per la replicazione e il mantenimento dei cromosomi
- marcatori di selezione in lievito (*ura3* e *trp1*)
- origine di replicazione (*oriC*) e un marcatore selettivo per la propagazione in *E. coli* prima del clonaggio (*AMP*)
- un marcatore selettivo dove si inserisce il DNA da clonare

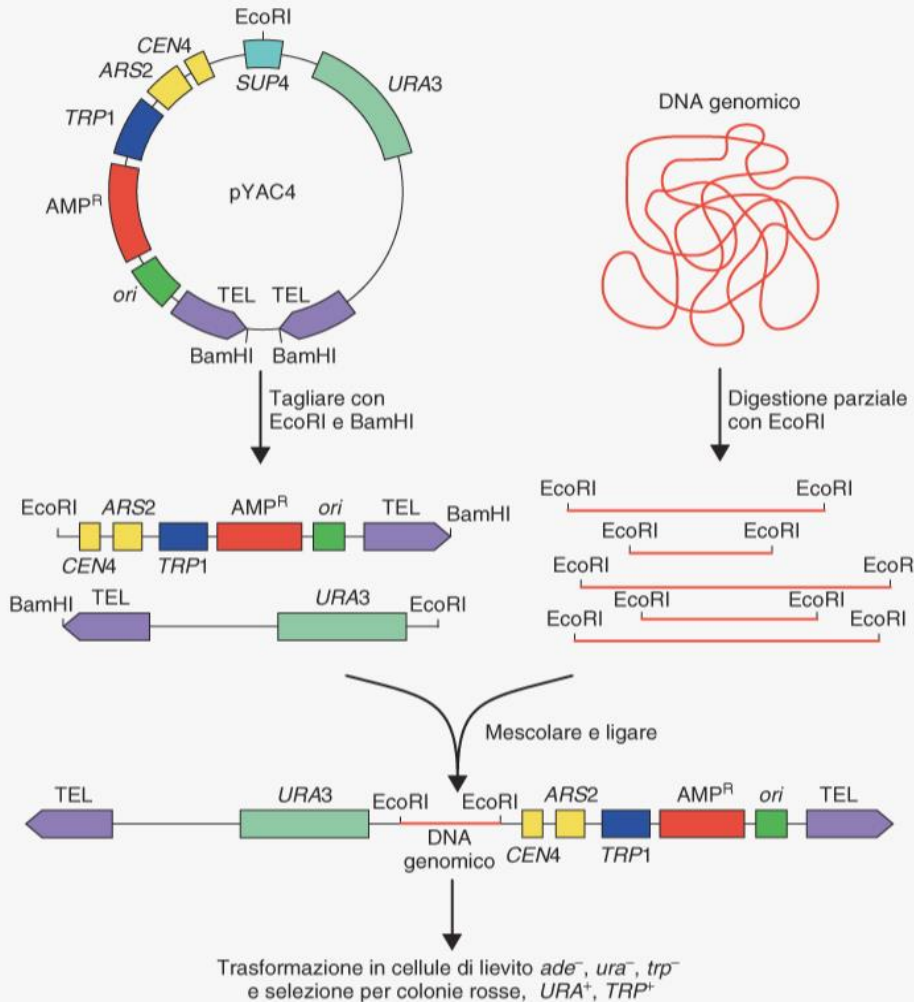
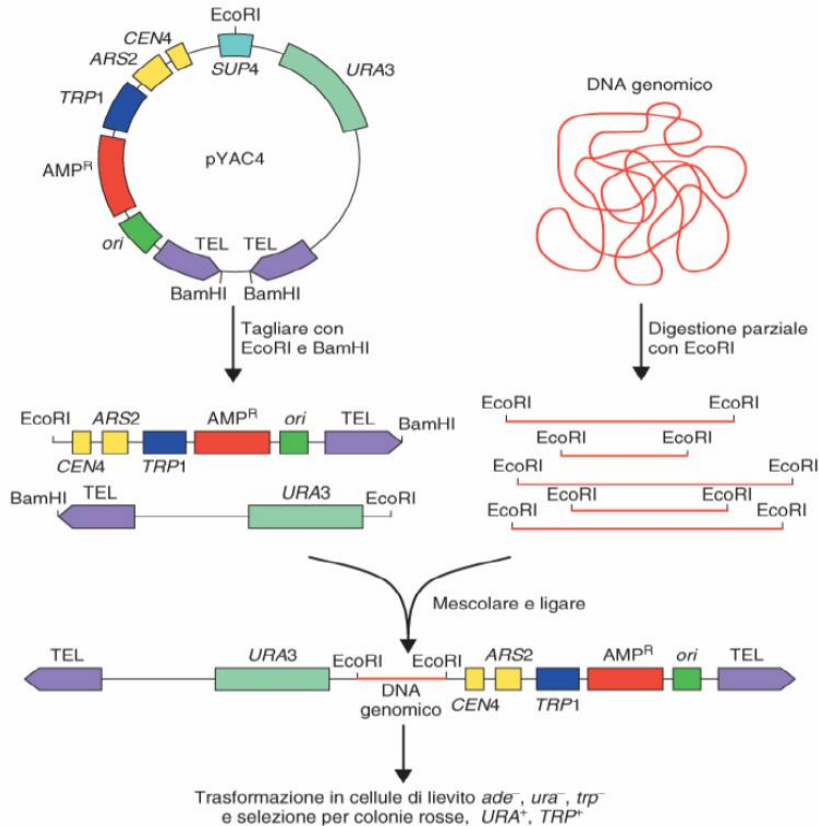


Figura 3.18. Clonaggio di un grosso frammento di DNA in un vettore YAC. Vedi il testo per i detta-

Inseriti nella cellula ospite (spesso sferoplasti) attraverso tecniche fisiche (microiniezione) o veicolati da opportune molecole (es.liposomi)

# YAC: Yeast Artificial Chromosome



**ARS: Autonomously Replicating region, sequenza a replicazione autonoma di lievito.**

**CEN: è una sequenza di 125 bp tratta dai cromosomi di lievito che permette una segregazione regolare dei vettori durante la mitosi delle cellule.**

**TEL: è una sequenza di 13 bp ripetuta molte volte. E' tratta dai telomeri dei cromosomi di lievito e serve a dare stabilità al vettore.**

**AMP: ⇒ gene per la resistenza all'ampicillina**

**ORI: ⇒ origine di replicazione per la propagazione in *E. coli***

**SUP4: ⇒ gene di un tRNA soppressore che annulla la mutazione *ade-2* (presente nel ceppo di lievito ospite)**

**TRP1 e URA3 ⇒ servono come sistema di selezione per identificare le cellule che contengono il vettore YAC**

•**Vantaggi:** si possono clonare frammenti di DNA molto grandi. La quantità di DNA che può essere clonata è di 200-500kb, ma si può arrivare anche a 1 megabase (1Mb).

•**Svantaggi:** i costrutti sono difficili da manipolare perché fragili e nell'ospite tendono a ricombinare.

*S. cerevisiae* (w.t): crescono se nel terreno c'è uracile e triptofano

*S. cerevisiae* (w.t): URA (-), TRP (-), ADE2 (-) per mutazione "ochre" sono caratterizzati da accumulo di un pre-metabolita dell'adenina → **colonie rosse**

YAC con gene **SUP 4** = gene per il tRNA con UAA Tyr\*

**SUP 4** integro sopprime la mutazione non senso "ochre" nel gene **ADE2** del ceppo di lievito: viene sintetizzata adenina, non c'è accumulo di pre-metabolita rosso → colonie bianche

*S. cerevisiae* (terreno minimo) + YAC senza inserto (SUP attivo) → colonie bianche

*S. cerevisiae* (terreno minimo) + YAC con inserto (SUP inattivo) → **colonie rosse**

Cellula di lievito ospite AB1380 con gene mutato Ade-2

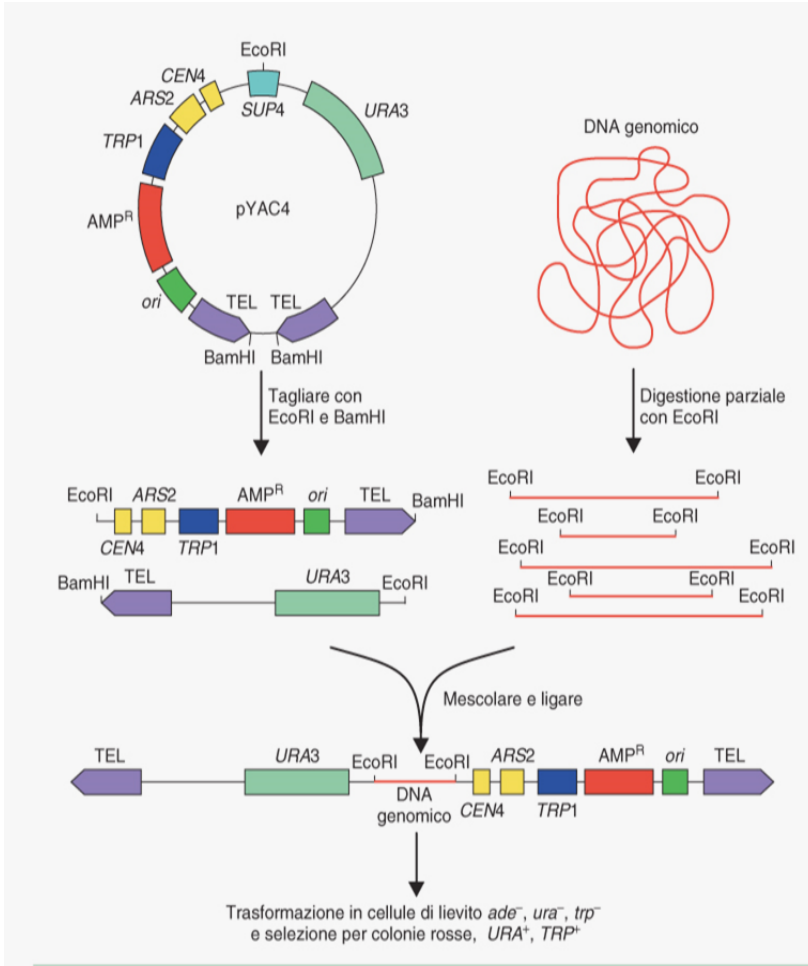


colonie rosse (fenotipo mutante)

L'introduzione di uno YAC con il gene SUP4 intatto (senza inserto) sopprime la mutazione ade-2 e dà colonie incolore

L'introduzione di uno YAC con il gene SUP4 interrotto dal DNA clonato ripristina il fenotipo mutante e dà colonie rosse

# Clonaggio in un vettore YAC



Il vettore è tagliato con enzimi di restrizione per produrre due braccia ciascuna con un telomero all'estremità.

Un braccio contiene:

- Sequenza ARS1
- Centromero CEN4
- Marcatore selettivo *trp1*

L'altro braccio contiene:

- Marcatore selettivo *ura3*

Il DNA esogeno inattiva il gene SUP4 (tRNA suppressore)

Vettori non ricombinanti daranno l'espressione di SUP4 con formazione di colonie bianche

vettori ricombinanti in cui il gene è stata inattivato per inserimento di DNA esogeno avremo colonie rosse

Gli YAC ricombinanti vengono trasformati in un ceppo di lievito

Ura3-, *trp1*- e *ade2* -

I ricombinanti vengono identificati come colonie rosse **che crescono in terreno privo di uracile e triptofano**

Ade2-fosforibosilamino-imidazolo-carbossilasi mutata

↓ SUP4

**Colonie bianche  
Non Ricombinanti**

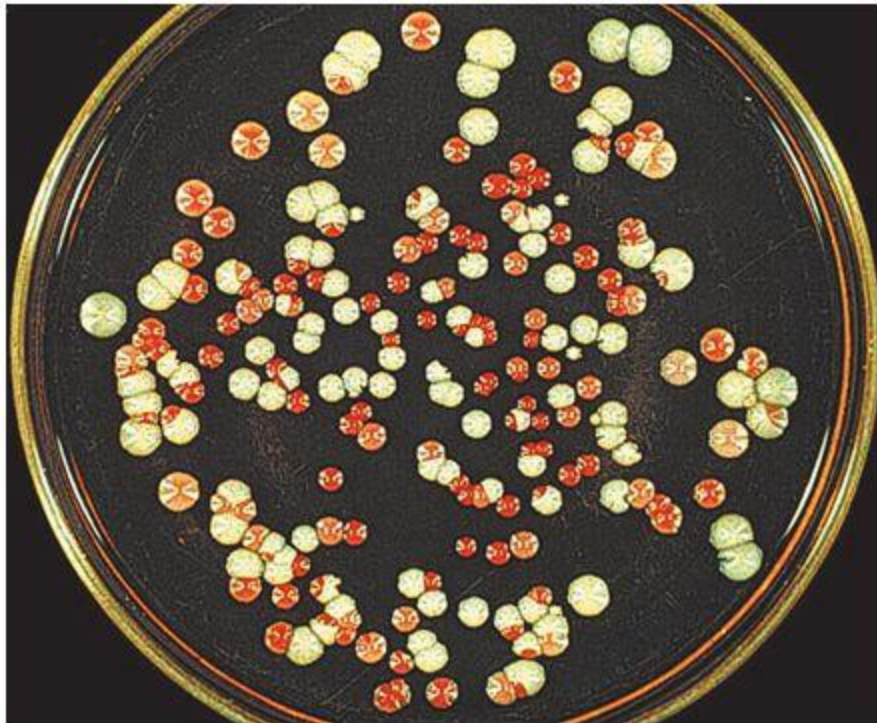
↓ ~~SUP4~~

**Colonie rosse  
Ricombinanti**



## 19.2 VETTORI DI CLONAGGIO

### CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC) E DI BATTERI (BAC)



**Figura 19.10**

Colonie di lievito contenenti vettori di clonaggio ricombinanti  
rosse e senza inserto di DNA esogeno bianche

## Alcuni Vettori a confronto

<b>Vettore</b>	<b>Dimensioni inserto</b>	<b>Propagazione</b>	<b>Introduzione nei batteri</b>
<b>Plasmidi</b>	<b>5-10 kb</b>	<b>Replicazione del plasmide</b>	<b>Trasformazione</b>
<b>Fago <math>\lambda</math></b>	<b>5-23 kb</b>	<b>Riproduzione del fago</b>	<b>Infezione fagica</b>
<b>Cosmidi</b>	<b>35-45 kb</b>	<b>Replicazione del plasmide</b>	<b>Infezione fagica</b>
<b>Fago P1</b>	<b>85-100 kb</b>	<b>Replicazione del plasmide Riproduzione del fago</b>	<b>Infezione fagica</b>
<b>BAC</b>	<b><math>\leq 300</math> kb</b>	<b>Replicazione del Fattore F</b>	<b>Trasformazione/ Elettroporazione</b>