

MODELLO SCHEDA INSEGNAMENTO

Corso di L/LM/LMCU	Corso di laurea Triennale Scienze Biologiche e Biotecnologie
Denominazione insegnamento:	Laboratorio di tecnologie molecolari
Numero di Crediti:	6 CFU
Anno	III
Semestre:	I
Docente Titolare:	Lina Sabatino
Dottorandi/assegnisti di ricerca che svolgono attività didattica a supporto del corso:	Valeria Rosato
Orario di ricevimento:	lunedì 14.00-18.00 ; venerdì dalle 9.00 - 11.00
Indirizzo:	Via Port'Arsa 11

PRESENTAZIONE DEL CORSO

L'insegnamento di Tecnologie Molecolari viene erogato nel terzo anno ed è strutturato nella forma di una trattazione delle più rilevanti e significative metodiche utilizzate per la ricerca e la diagnostica molecolare. Pur essendo collocato nell'ambito del corso di studi come corso a scelta, il presente insegnamento fornisce nozioni pratiche per poter svolgere attività di laboratorio di fondamentale importanza nell'ambito del curriculum Biologico e biotecnologico.

Obiettivi formativi

Facendo riferimento alle principali acquisizioni scientifiche perseguite nell'ambito della moderna ricerca in campo genetico e biologico-molecolare, il corso si focalizza sulle basi teoriche e sulla successiva realizzazione ed implementazione delle principali tecnologie basate sul DNA ricombinante e sugli innumerevoli approcci sperimentali basati sulle medesime.

Conoscenza e capacità di comprensione

- Acquisizione delle conoscenze di base che hanno determinato la nascita e lo sviluppo delle moderne tecnologie del DNA ricombinante.
- Conoscenza dettagliata degli aspetti teorici e pratici delle tecnologie di maggior rilevanza basate sul DNA ricombinante.
- Conoscenza delle problematiche sperimentali che possono essere affrontate grazie all'utilizzo delle tecnologie del DNA ricombinante.

Capacità di applicare conoscenza e comprensione

- Essere in grado di definire e descrivere l'approccio sperimentale più indicato per affrontare e risolvere una particolare problematica sperimentale in ambito biologico-molecolare.
- Essere in grado di elaborare un piano sperimentale dettagliato, utilizzando le metodologie sopra descritte.

Autonomia di giudizio

Acquisizione della capacità di comprendere e discutere criticamente le basi razionali, i criteri di scelta e la messa in pratica delle più moderne tecniche di base per analisi di DNA, RNA, e proteine anche in riferimento a potenziali applicazioni biotecnologiche.

Abilità comunicative

- Capacità di estrarre, organizzare e sintetizzare le informazioni rilevanti relative ai contenuti del corso.
- Capacità di esporre in forma sintetica o elaborata le informazioni acquisite, sotto forma di presentazione orale e visuale, comunicando in maniera efficace e con la corretta terminologia.

Capacità di apprendimento

Capacità di leggere, comprendere, commentare e discutere un testo o un articolo scientifico incentrando l'attenzione sulle tecniche utilizzate

PREREQUISITI

Sono richieste la conoscenza della Chimica, Biochimica e della Biologia Molecolare

CONTENUTI E PROGRAMMA DEL CORSO (6CFU)

Lezioni Frontali (4CFU) + 2CFU Laboratorio

Introduzione alle Tecnologie del DNA Ricombinante

Gli enzimi di restrizione

Aspetti storici e teorici del clonaggio molecolare.

Vettori di clonaggio plasmidici di seconda e terza generazione. Vettori di espressione. Vettori di clonaggio ad alta capacità: vettori basati sul lambda e sul fago P1, cosmidi, Yeast Artificial Chromosomes (YACs) e Bacterial Artificial Chromosomes (BACs).
Ligazione e Trasformazione

Preparazione ed analisi del DNA ricombinante.

Aspetti teorici dei saggi di ibridazione molecolare.

Applicazioni dei principi di ibridazione molecolare- Southern blot, northern blot

Ibridazione su colonie ricombinanti.

Applicazioni dei principi di ibridazione molecolare- fluorescence in situ hybridization (FISH), RNA in situ hybridization (RNA ISH)

Introduzione alla Polymerase Chain Reaction (PCR).

Applicazioni della PCR: Reverse transcription PCR, Clonaggio mediante PCR, Real-time PCR: aspetti teorici e principali approcci metodologici.

Tecniche di sequenziamento del DNA. Il metodo di Sanger. Principi del sequenziamento automatico. Introduzione ai principali metodi di next-generation sequencing.

Introduzione alle librerie genomiche. Modalità di costruzione, complessità di una libreria .Librerie a cDNA.

Saggi di trasferimento genico in cellule eucariotiche: trasfezione con calcio fosfato, lipofezione, elettroporazione, infezione con vettori virali.

Metodi per la definizione delle regioni regolative di un gene: Siti di ipersensibilità alla DNAsi, saggi di trasferimento genico con geni reporter, DNA footprinting, Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).

Analisi di proteine
Analisi delle principali banche dati .

Modulo di Laboratorio (16 ore, 2CFU)

Il Corso è strutturato in lezioni articolate in una prima parte introduttiva seguita da attività di laboratorio effettuate dagli studenti presso il laboratorio didattico.

Complessivamente, il modulo prevede la pianificazione e la realizzazione da parte degli studenti di un esperimento di clonaggio molecolare in un vettore plasmidico di due frammenti di cDNA corrispondenti alla sequenza codificante completa di un gene umano. Il programma sperimentale viene svolto con le seguenti modalità:

- illustrazione dell'esperimento di clonaggio e pianificazione della strategia sperimentale. Digestione con enzimi di restrizione, defosforilazione del vettore plasmidico e digestione con enzimi di restrizione dei campioni di cDNA da clonare. Elettroforesi preparativa ed estrazione da gel delle bande di DNA di interesse.
- Quantificazione dei campioni di DNA mediante elettroforesi analitica. Pianificazione ed esecuzione della reazione di ligazione. Trasformazione batterica.
- Valutazione dell'esito dell'esperimento mediante reazione di PCR diretta su colonia. Analisi del risultato mediante elettroforesi su gel. Inoculo in terreno liquido delle colonie risultate positive all'analisi per PCR.
- Estrazione di DNA plasmidico dalle colture batteriche e analisi elettroforetica per valutare l'esito finale del programma sperimentale. Discussione dei risultati.

TESTI E MATERIALE DIDATTICO

Il materiale didattico per le lezioni frontali di questo corso viene periodicamente aggiornato e consiste nelle slides che vengono presentate a lezione dal docente, e in articoli scientifici inerenti gli argomenti trattati a lezione.

Libri di testo consigliati:

Watson, DNA ricombinante, Zanichelli.

Dai Geni e genomi Edises

Può essere prevista l'adozione di altri libri di testo per consultazione, la cui scelta è soggetta a variazione a seconda dell'introduzione di novità editoriali sul mercato dei testi universitari.

MODALITÀ DI VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

L'apprendimento viene verificato mediante un approfondito colloquio orale, finalizzato all'accertamento dell'acquisizione da parte dello studente delle conoscenze e delle abilità attese.

SYLLABUS

SYLLABUS MICROBIOLOGIA GENERALE

Argomenti	Ore	Riferimenti bibliografici	Tipologia di lezione
Introduzione alle Tecnologie del DNA Ricombinante, Enzimi di Restrizione	6	Watson: DNA Ricombinante Brown: Geni e Genomi Edises	frontale+laboratorio
Vettori di Clonaggio e Librerie a DNA e cDNA	20	Watson: DNA Ricombinante Brown: Geni e Genomi Edises	frontale+laboratorio
Tecniche di Ibridazione	10	Watson: DNA Ricombinante Brown: Geni e Genomi Edises	Frontale + laboratorio
PCR e PCR Realtime	4	Watson: DNA Ricombinante Brown: Geni e Genomi Edises	Frontale + laboratorio
Tecniche di Trasfezione	4	Watson: DNA Ricombinante Brown: Geni e Genomi Edises	Frontale
Analisi di proteine	2	Brown: Geni e Genomi Edises	Frontale + laboratorio
Analisi di banche dati .	2	Brown: Geni e Genomi Edises	Frontale + laboratorio