

Testi del Syllabus

Resp. Did.	SCHOEFTNER STEFAN	Matricola: 022775
Docenti	BANDIERA ANTONELLA, 2,5 CFU SCHOEFTNER STEFAN, 3,5 CFU	
Anno offerta:	2020/2021	
Insegnamento:	210SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE	
Corso di studio:	SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE	
Anno regolamento:	2018	
CFU:	6	
Settore:	BIO/11	
Tipo Attività:	B - Caratterizzante	
Anno corso:	3	
Periodo:	Primo Semestre	
Sede:	TRIESTE	



Testi in italiano

Lingua insegnamento	ITALIANO
Contenuti (Dipl.Sup.)	<p>PARTE TEORICA (3,5CFU) Il corso prevede le seguenti tematiche:</p> <ol style="list-style-type: none">1. L'anatomia delle cellule, le biomolecole, i metodi per la preparazione di DNA/RNA/proteine2. Il DNA ricombinate, i vettori di clonaggio, le endonucleasi, i cromosomi artificiali, i batteriofagi, l'espressione di proteine ricombinanti, l'introduzione del DNA ricombinate nelle cellule ospiti3. Il sequenziamento del DNA, l'immunità batterica, la manipolazione del genoma pro- ed eucariotico, il knock-down attraverso l'utilizzo di siRNAs o shRNAs4. Tecnologie di ibridazione (RNA FISH, DNA FISH, Southern blot, Northern blot); elettroforesi, tecniche per lo studio delle interazioni DNA-proteine (band shift, footprint, immunoprecipitazione della cromatina ChIP).5. Tecnologie PCR: PCR standard, RT-PCR e varianti6. Analisi dell'espressione genica: arrays, high content sequencing, determinazione delle estremità 5' e 3' dell'RNA, single molecule transcript analysis, varianti alleliche e sequenze Alu7. Sessione "esercizi": gli studenti ricevono un'introduzione sull'uso del browser del genoma ENSEMBL e sulla costruzione dei primers. Gli studenti autonomamente disegneranno i primers che verranno utilizzati nella parte pratica come lavoro autonomo a casa. <p>CORSO DI LABORATORIO Prof.ssa Bandiera, Prof. Schoeftner (2,5 CFU): L'obiettivo sarà l'applicazione di moderne tecniche di biologia molecolare per la diagnosi e il monitoraggio di specifiche condizioni genetiche, varianti alleliche e variazioni genetiche delle ripetizioni Alu.</p> <p>IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE: Norme di sicurezza e comportamento, dispositivi di protezione, organizzazione; attrezzatura e strumentazione. Utilizzo pipette automatiche per prelievo piccoli volumi e</p>

simulazione di allestimento reazioni.

PLASMIDI: Estrazione del DNA plasmidico mediante kit commerciale, valutazione della resa di estrazione, preparazione di campioni per analisi elettroforetica. I plasmidi saranno sottoposti a un controllo di digestione utilizzando enzimi di restrizione. I prodotti serviranno come controllo positivo e negativo per la successiva PCR.

PREPARAZIONE DEL DNA GENOMICO: Preparazione anonima di DNA genomico umano ottenuto dalle cellule dell'interno bocca degli studenti e determinazione della concentrazione.

AMPLIFICAZIONE DELLE VARIANTE DI RIPETIZIONE ALU ATTRAVERSO PCR: Le ripetizioni del numero di Alu su un locus del cromosoma 16 sarà determinata mediante PCR specifica. L'elettroforesi su gel di agarosio verrà utilizzata per monitorare le differenze nel numero di ripetizioni di Alu.

AMPLIFICAZIONE PCR DEL GENE G6PD CON LE SUE VARIANTI ALLELICHE: Un locus che ospita varianti alleliche del gene G6PD sarà amplificato mediante PCR. I prodotti di PCR saranno purificati dopo elettroforesi su gel e sottoposti a digestione utilizzando enzimi di restrizione. Il DNA digerito verrà separato mediante elettroforesi su gel.

ANALISI DEI DATI E DISCUSSIONE: L'analisi Chi-square sarà utilizzata per confrontare le frequenze del genotipo di Alu all'interno del gruppo di studenti con quelle previste dall'equazione di Hardy-Weinberg. Le frequenze genotipiche della popolazione di classe possono anche essere confrontate con le frequenze genotipiche di un'altra popolazione in il database

Testi di riferimento

T.A. Brown Biotecnologie molecolari, Zanichelli

Obiettivi formativi

Il corso è strutturato per fornire agli studenti un approccio pratico di laboratorio nell'ambito biomolecolare e per familiarizzare con strumenti e tecniche comunemente utilizzate in questo campo. L'obiettivo del corso è dare agli studenti la possibilità di prendere confidenza con attrezzature e metodiche correntemente utilizzate nella ricerca sperimentale con particolare riferimento alle fasi pre-analitiche, analitiche e post-analitiche dell'estrazione di acidi nucleici e alle tecniche di amplificazione del bersaglio. D1. Conoscenza e comprensione: Durante le lezioni frontali (3,5 CFU) ed il corso di laboratorio (2,5 CFU) gli studenti acquisiranno un background teorico di tecniche di base di biologia molecolare e diagnostica. Questo rappresenterà la base per comprendere gli esperimenti che verranno effettuati durante il corso di laboratorio. Inoltre saranno trattati metodi più complessi e applicazioni pratiche in biologia molecolare. D2: Capacità di applicare conoscenza e comprensione: Il corso rappresenta un'opportunità per gli studenti di familiarizzare con le attrezzature e le metodologie di base utilizzate nella ricerca sperimentale. In particolare, alla fine del corso gli studenti saranno in grado di -estrarre DNA plasmidico e DNA genomico, -utilizzare browsers per lo studio di dati genomici e programmi per il "design" di primers PCR, - di utilizzare gli enzimi di restrizione, - di programmare reazioni di amplificazione del DNA e - di creare ed interpretare dati di varianti geniche. Dopo aver eseguito esperimenti pratici gli studenti impareranno ad analizzare il risultato delle procedure impiegate e interpreteranno e discuteranno i dati ottenuti.

Prerequisiti

Basi teoriche di biologia Molecolare

Metodi didattici

Lezioni teoriche con supporti multimediali (filmati) e presentazioni powerpoint. Lezioni di tipo interattivo con coinvolgimento degli studenti in esercitazioni di calcolo e di problem solving. Viene stimolata la capacità di esame oggettivo dei dati (discussione) e interpretazione dei

risultati sperimentali.

Altre informazioni

Il materiale didattico è disponibile su moodle federato

Modalità di verifica dell'apprendimento

2 valutazioni:

Valutazione 1: Elaborati scritti sul lavoro svolto in laboratorio da consegnare alla fine di ciascuna esercitazione (Prof. Bandiera)

Per la valutazione delle relazioni vengono presi in considerazione i seguenti criteri:

-grado di impegno, presenza, accuratezza nell'esposizione

-capacità, chiarezza nell'esposizione, capacità di sintesi, conoscenza dei termini tecnici

-comprensione, capacità di spiegare e commentare, presenza o meno di errori concettuali. Un totale massimo di 15 punti possono essere raggiunti nel primo esame. Per partecipare alla seconda parte dell'esame è necessario un minimo di 7,5 punti.

Valutazione 2: I progressi di apprendimento delle lezioni teoriche (Prof.ssa Bandiera, Prof. Schoeftner) saranno verificati con una prova scritta. Punti totali: 16. L'esame consiste di 12 domande a risposta multipla (0,5 punti per domanda) e 2 "domande aperte" (5 punti per domanda) su argomenti più ampi affrontati durante le lezioni teoriche e il corso di laboratorio. Il punteggio finale del corso sarà il risultato della somma di entrambi gli esami. Punti massimi: 31; per superare l'esame è richiesto un minimo di 18 punti.

Eventuali cambiamenti alle modalità qui descritte, che si rendessero necessari per garantire l'applicazione dei protocolli di sicurezza legati all'emergenza COVID19, saranno comunicati nel sito web di Dipartimento, del Corso di Studio e dell'insegnamento.

Programma esteso

Elementi di Biologia molecolare degli acidi nucleici, tecniche basilari per la tecnologia del DNA ricombinante. Vengono trattate: le caratteristiche degli acidi nucleici per gli studi e le applicazioni biomolecolari; gli strumenti molecolari per la tecnologia del DNA ricombinante e le tecniche basilari per la manipolazione degli acidi nucleici, per l'espressione di proteine ricombinanti e per lo studio dei geni e dell'espressione genica. Nelle esercitazioni di laboratorio vengono trattati le norme di sicurezza del laboratorio di biologia molecolare e gli strumenti, l'estrazione di DNA plasmidico e la sua separazione elettroforetica su gel di agarosio, l'uso degli enzimi di restrizione per la mappatura dei plasmidi, l'amplificazione del DNA con la PCR e analisi degli amplificati su gel

Il corso prevede un classico programma di lezioni su metodi e strumenti chiave della biologia molecolare (3,5 CFU) ed un corso pratico di laboratorio (2,5 CFU).



Testi in inglese

Italian

A. THERORETICAL SESSION (3,5 CFU)

1. Anatomy of the cell, biomolecules, concept of preparation of RNA/Protein/DNA.

2. Recombinant DNA techniques, Cloning vectors, endonucleases, artificial chromosomes, recombinant protein expression, introduction of genes into host-organisms.

3. DNA sequencing, bacterial immunity, manipulation of the genome content of pro- and eukaryotic organisms, siRNA/shRNA mediated knock-down approaches.

4. Hybridization related techniques (RNA-FISH, DNA-FISH, Southern blot, Northern blot), Electrophoresis, methods to study DNA:protein interaction (band shift, DNA footprinting, chromatin immunoprecipitation)

5. PCR technologies: standard PCR, RT—PCR and variants
6. Gene expression analysis: array technology and high content sequencing, determination of 3' and 5' ends of RNA, single molecule transcript analysis
7. Exercise session: Students get introduction into the use of the ENSEMBL genome browser and primer construction. Students will do primer design for practical part as homework.

PRACTICAL LABORATORY SESSION Prof.ssa Bandiera, Prof. Schoeftner (2,5 CFU):

Application of modern molecular biology techniques for the diagnosis and monitoring of specific genetic condition, allelic variants and genetic variation of Alu repeats.

THE MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY: Rule of conduct and safety, hazardous reagents and material safety data sheet; equipment and lab instrumentation. The use of automatic lab pipettes for small volume manipulation.

PLASMIDS: Plasmid DNA extraction by a commercial kit, evaluation of extraction yield, preparation of samples for electrophoretic analysis. Plasmids will be subjected to control digest using restriction enzymes and will serve as positive and negative control for subsequent PCR.

PREPARATION OF GENOMIC DNA:

Anonymized preparation of genomic DNA from cheek cells of students and determination of concentration.

PCR AMPLIFICATION OF SITE OF GENETIC ALU REPEAT VARIANTS:

Alu repeats number variation on a locus of chromosome 16 will be determined by specific PCR. Agarose Gel electrophoresis will be used to monitor differences in Alu repeat number.

PCR AMPLIFICATION OF SITE OF ALLELIC G6PD VARIANTS:

A locus harboring allelic variants of the G6PD gene will be amplified by PCR. PCR products will be purified after gel electrophoresis and subjected to digest using restriction enzymes. Digested DNA will be separated by gel electrophoresis.

DATA ANALYSIS AND DISCUSSION:

Chi-square analysis will be used to compare the Alu genotype frequencies within the class population with those predicted by the Hardy-Weinberg equation. The genotypic frequencies of the class population can also be compared with the genotypic frequencies of another population in the database.

T.A. Brown Biotecnologie molecolari, Zanichelli

The course aims to transmit a theoretical and practical introduction into the use and understanding of molecular biology techniques and to get familiar with basic instrumentation used in this field. A particular focus will be given on pre-analytic, analytic and post-analytics phases of DNA extraction and target amplification. In addition, the advantages and disadvantages of amplification techniques will be addressed. D1. Knowledge and understanding: During classic lectures and the laboratory course (3,5+2,5 CFU) students will get the theoretical background in basic techniques for molecular biology and diagnostics. This will represent the basis for understanding the experiments that will be carried out. In addition, more complex methods and practical applications in molecular biology will be addressed. D2: Applying knowledge and

understanding: The course represents an opportunity for the students to become familiar with equipment and basic methodologies used in experimental research. In particular, at the end of the course students will be able to extract plasmid DNA, genomic DNA, browse genome data, design PCR primers, employ restriction enzymes, set up DNA amplification reactions and generate and interpret data from genetic variants. After performing practical experiments students will learn to analyze the result of the procedures employed and will interpret and discuss data obtained.

Basic concepts of molecular biology

Theoretical lessons with multimedia supports (movies) e presentazioni powerpoint. Interactive lessons with student involvement in calculation and problem solving exercises. The ability to objectively examine the data and interpret (discussion) the experimental results is stimulated.

Support information for the course is available via moodle federato

2 evaluations:

Evaluation 1: Reports on lab work at the end of each lab practice (Prof. Bandiera).

Reports will be evaluated assessing:

-diligence, attendance, presentation accuracy

-personal skills, synthesis, description and clarity in presentation, technical terms knowledge

-understanding degree, explanation and discussion skills, presence of conceptual errors. A total of 15 points can be reached. A minimum of 7,5 points is necessary to participate in the second part of the exam

Evaluation 2: Learning progress on the theoretical lectures (Prof.ssa Bandiera, Prof. Schoeftner) will be monitored in a written exam. Total points: 16. Exam 2 consists of 12 multiple choice questions (0,5 points per question) and 2 "open questions" (5 points per question) on broader topics addressed during the theoretical lectures e il corso di laboratorio. The final mark of the course results from the sum of both exams. Maximum points: 31; a minimum of 18 points is required to pass the exam.

Any changes to the exam-modes described here, which become necessary to ensure the application of the safety protocols related to the COVID19 emergency, will be communicated on the Department, Study Program and teaching website

The course provides theoretical and practical training on techniques and experimental approaches in molecular biology. A focus will be set on the molecular biology of nucleic acids and biomolecular techniques. Basic techniques for DNA manipulation, gene study, gene cloning, gene expression analysis and recombinant DNA technology will be addressed. Laboratory exercises include the teaching of laboratory safety standards the handling of laboratory instruments, the extraction of DNA and its electrophoretic separation on agarose gel, the use of restriction enzymes for plasmid mapping, DNA amplification by PCR and analysis of the amplified products by gel electrophoresis.

The course contains a classic lecture program on central methods and tools in molecular biology as well as background on practical exercises (3,5 CFU) and a practical laboratory course (2,5 CFU).