
Testi del Syllabus

Resp. Did. **SCAGGIANTE BRUNA** **Matricola: 009962**

Docenti **BANDIERA ANTONELLA, 3 CFU**
SCAGGIANTE BRUNA, 3 CFU

Anno offerta: **2017/2018**

Insegnamento: **210SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

Corso di studio: **SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE**

Anno regolamento: **2015**

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.) La biologia molecolare degli acidi nucleici applicata alle tecniche per lo studio dei geni e dell'espressione genica e alla 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 per il clonaggio di DNA e per l'espressione di protein e ricombinanti; le tecniche 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 la visualizzazione degli amplificati su gel. Nei laboratori virtuali vengono trattate le tecniche di estrazione degliu acidi nucleici e la valutazione qualitativa e quantitativa del DNA e dell'RNA con esercitazione di calcolo; la PCR e la Real-Time PCR negli aspetti teorici e pratici con esercitazione di calcolo; le nuove frontiere delle tecniche di amplificazione con la digital droplet PCR e esercitazione di calcolo di espressione genica e di copie di un gene mutato in un campione di biopsia liquida.

Testi di riferimento Terry A. Brown
Biotecnologie molecolari
Principi e tecniche
Seconda edizione italiana condotta sulla settima edizione inglese
2017
James D Watson, Amy A Caudy, Richard M Myers, Jan A Witkowski
DNA ricombinante
Geni e genomi

Obiettivi formativi	<p>Apprendere i principi base delle tecniche per gli studi molecolari e le applicazioni di diagnostica molecolare. Apprendere le basi per la manipolazione degli acidi nucleici e per il controllo di qualità dei risultati delle tecniche molecolari. Approfondimento sperimentale in laboratorio didattico e virtuale su metodiche di base della biologia molecolare e loro utilizzo.</p> <p>Il corso è strutturato per fornire agli studenti un approccio pratico con strumenti e tecniche comunemente utilizzate in questo campo.</p> <p>L'obiettivo del corso è dare agli studenti la possibilità di prendere confidenza con attrezzature e tecniche correntemente utilizzate nella ricerca sperimentale. In particolare alla fine del corso essi saranno in grado di estrarre DNA plasmidico, sapranno utilizzare gli enzimi di restrizione, sapranno allestire reazioni di amplificazione del DNA e avranno imparato ad analizzare il risultato di queste procedure mediante l'analisi elettroforetica e l'interpretazione dei suoi risultati.</p>
Prerequisiti	<p>Conoscere la biologia molecolare</p>
Metodi didattici	<p>Lezioni frontali con ausilio diapositive. Esercitazioni di laboratorio. Laboratori virtuali</p>
Altre informazioni	<p>Supporto alla didattica con diapositive e altri materiali se richiesti su Moodle</p>
Modalità di verifica dell'apprendimento	<p>Esame scritto domande a risposta multipla e domande aperte. Relazioni di laboratorio.</p> <p>L'esito finale dell'esame richiede il superamento della prova scritta ed è la media dei voti ottenuti nella parte teorica del compito scritto e di quella teorico-pratica dei laboratori didattici e virtuali.</p>
Programma esteso	<p>Le caratteristiche degli acidi nucleici per gli studi e le applicazioni biomolecolari. Caratteristiche chimico-fisiche del DNA A, B e Z. La tripla elica di DNA e le sue funzioni. Le G quadruplex e il loro ruolo fisiologico e patologico. Malattie associate alla struttura Z: l'Alzheimer. L'iperchromismo del DNA. Le cinetiche di rinaturazione del DNA: la denaturazione termica e il Cot. La curva di denaturazione termica delle triple eliche e la loro migrazione elettroforetica. La valutazione delle quadruple eliche al dicroismo circolare. Le strutture dell'RNA: secondarie e terziarie. Funzionamento dei ribozimi e le loro applicazioni biotecnologiche. miRNA e applicazioni terapeutiche. Confronto tra miRNA e siRNA. Gli aptameri e la SELEX. Applicazioni degli aptameri in biomedicina e diagnostica. La tecnologia del DNA ricombinante. Concetto di clonaggio di DNA e proteine ricombinanti. I problemi etici legati alla manipolazione del DNA. Gli elementi per il clonaggio: enzimi di restrizione, vettori e ospiti. Esempi di applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante nei diversi settori. Gli enzimi di restrizione e loro caratteristiche. I vettori plasmidici: ruolo fisiologico, capacità di clonaggio, classificazione e modalità di replicazione. I requisiti di sicurezza. Incompatibilità tra i plasmidi. ORI, MCS e Marcatore di selezione. Filling in, trimming, linkers e adapters; coda omopolimerica. Le caratteristiche della reazione di ligazione. Il gene lacZ' e alfa-complementazione. I fagi : ciclo litico e lisogenico. I vettori di inserzione e sostituzione. Il packaging e la trasduzione e placche fagiche. Il fago M13 e la sua biologia. Le librerie genomiche. I cosmidi. I cromosomi artificiali: BAC, PAC e YAC (cenni). La selezione dei ricombinanti in lievito.</p> <p>Caratteristiche dei vettori di espressione. Segnali per migliorare la trascrizione (promotori forti ed inducibili). I corpi di inclusione: vantaggi e svantaggi. Ottimizzazione della stabilità della proteina. Le proteine native e le proteine di fusione. Vantaggi e svantaggi di ospiti procariotici. Espressione in sistemi eucariotici. I vettori di espressione per le cellule vegetali (cenni). Gli animali transgenici e gli animali knockout (cenni). Le</p>

tecniche per lo studio dei geni e dell'espressione genica. Le ibridazioni su supporto solido: Southernblotting e northernblotting. Altre tecniche di blotting: westernblotting, southwestern e farwestern. La preparazione delle sonde: nick translation, random priming. La marcatura al 5'-terminale o al 3' terminale. Il dot blot. La stringenza nelle reazioni di ibridazione. Gli array. La PCR e l'amplificazione del bersaglio. L'amplificazione della sonda: la ligasi chain reaction. L'amplificazione del segnale : il branched DNA. L'amplificazione isotermica: la NASBA. Il sequenziamento genico: la tecnica di Maxam e Gilbert e quella di Sanger a confronto. Il sequenziamento automatico e il pirosequenziamento. Il sequenziamento epigenetico con la tecnica del bisolfito. Laboratori: norme di sicurezza e comportamento del lab di biologia molecolare; estrazione DNA plasmidico; elettroforesi DNA e mappa di restrizione; PCR e analisi amplificati. Laboratori virtuali: Estrazione di acidi nucleici. Principi generali dell'estrazione di DNA e RNA totale. Esempi di calcolo di quantità di DNA e RNA. Esempi di valutazione qualitativa degli estratti. La PCR come tecnica qualitativa e la RT-PCR. Altre applicazioni della PCR: la PCR multiplex e la PCR Nested. La PCR come tecnica quantitativa: Real-Time PCR. Vantaggi e limiti della Real-Time PCR. Le nuove frontiere delle tecniche di amplificazione: la digital PCR. Principi generali e applicazioni per la biopsia liquida.



Testi in inglese

Italian

The molecular biology of nucleic acids applied to genes and gene expression techniques and recombinant DNA technology. In particular: the characteristics of nucleic acids for biomolecular studies and applications; Molecular tools for recombinant DNA technology and techniques for cloning DNA and for the expression of proteins and recombinants; Techniques for genetic study and gene expression. Laboratory exercises include laboratory safety standards for molecular biology and instruments, plasmid DNA extraction and its electrophoretic separation on agarose gel, the use of restriction enzymes for plasmid mapping, DNA amplification with PCR and analysis of the amplified products by gel electrophoresis. In virtual laboratories, techniques for extracting nucleic acids and the qualitative and quantitative evaluation of DNA and RNA with calculation exercise are treated; PCR and Real-Time PCR in theoretical and practical aspects with computational exercise; The new frontiers of amplification techniques with digital droplet PCR and gene expression calculation exercise and copies of a mutated gene in a liquid biopsy specimen

Terry A. Brown
 Biotecnologie molecolari
 Principi e tecniche
 Seconda edizione italiana condotta sulla settima edizione inglese 2017
 James D Watson, Amy A Caudy, Richard M Myers, Jan A Witkowski
 DNA ricombinante
 Geni e genomi
 Seconda edizione italiana condotta sulla terza edizione americana

Learn the basics of techniques for molecular studies and molecular diagnostics applications. Learn the basics for nucleic acid manipulation and the quality control of the results of molecular techniques. Experimental learning in the didactic and virtual lab on basic molecular biology methods and their applications.
 The course aims to provide a practical lab approach to students by instruments and techniques commonly employed in this field. The course represents an opportunity for the students to become familiar with equipment and methodologies currently used in experimental research. In particular at the end of the course students will be able to extract

plasmid DNA, to employ restriction enzymes, to set up DNA amplification reactions. They will learn to analyze the result of the procedures employed by electrophoretic analysis as well as to discuss data obtained.

Knowledge of molecular biology

Theoretical lessons supported by slide presentation
Laboratory Exercises. Virtual labs

Support for slide tutorials and other materials, if required, on Moodle

Written exam questions with multiple answers and open questions.
Laboratory reports.

The final exam result requires passing the written test and is the average of the marks obtained in the theoretical part of the written and the theoretical-practical task of the didactic and virtual workshops.

The characteristics of nucleic acids for biomolecular studies and applications. Chemical-physical characteristics of DNA A, B and Z. The triple helix of DNA and its functions. G quadruplex and their physiological and pathological role. Alzheimer's Disease Related Diseases: DNA's hyperchromicity. DNA renaissance kinetics: thermal denaturation and Cot. The thermal denaturation curve of triple propellers and their electrophoretic migration. The evaluation of quadruple propellers at circular dichroism. RNA structures: secondary and tertiary. Functioning of ribozyme and their biotechnological applications. MiRNA and therapeutic applications. Comparison of miRNA and siRNA. The aptamers and the SELEX. Aptamer applications in biomedicine and diagnostics. Recombinant DNA technology. DNA cloning concept and recombinant proteins. Ethical problems related to DNA manipulation. The elements for cloning: restriction enzymes, vectors and guests. Examples of recombinant DNA technology applications in different sectors. Restriction enzymes and their characteristics. Plasmid vectors: physiological role, cloning ability, classification and replication modes. The security requirements. Incompatibility between plasmids. ORI, MCS and Selection Marker. Filling in, trimming, linkers and adapters; Homopolymer tail. The characteristics of the ligation reaction. The lacZ 'gene and alpha-complementation. The phages: lycolysis and lysic cycle. Insertion and replacement vectors. Packaging and transduction and phage plaques. The phage M13 and its biology. Genome libraries. The cosmids. Artificial chromosomes: BAC, PAC and YAC (hints). The selection of yeast recombinants.

Characteristics of expression vectors. Signs to improve transcription (strong and inducible promoters). Inclusion bodies: advantages and disadvantages. Optimization of protein stability. Native proteins and fusion proteins. Advantages and disadvantages of prokaryotic guests. Expression in eukaryotic systems. Expression vectors for plant cells (notes). Transgenic animals and knockout animals. Techniques for gene expression and gene expression. Solid support hybridization: Southern blotting and northern blotting. Other blotting techniques: western blotting, southwestern and farwestern. Preparation of probes: nick translation, random priming. Marking at 5'-terminal or 3' terminal. The dot blot. Strictness in Hybridization Reactions. Arrays. PCR and target amplification. The amplification of the probe: the chain reaction ligase. Signal amplification: the branched DNA. Isothermal amplification: the NASBA. Gene sequencing: Maxam and Gilbert's technique and Sanger's comparison. Automatic sequencing and pirouction. Epigenetic sequencing with the bisulfite technique. Laboratories: Safety Standards and Behavior of the Molecular Biology Lab; Plasmid DNA extraction; DNA electrophoresis and restriction map; PCR and amplified products analysis. Virtual Labs: Extraction of Nucleic Acids. General principles of DNA extraction and total RNA. Examples of calculating amounts of DNA and RNA. Examples of qualitative evaluation of extracts. PCR as qualitative technique and RT-PCR. Other PCR Applications: PCR Multiplex and PCR

Nested. PCR as a Quantitative Technique: Real-Time PCR. Advantages and Limitations of Real-Time PCR. The new frontiers of amplification techniques: the digital PCR. General principles and applications for liquid biopsy.