

CORSO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI

Il corso di “Tecniche Biomolecolari” (curriculum Biologia Molecolare e cellulare) è costituito da un modulo di “Clonaggio ed espressione” (4 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e di esercitazioni di laboratorio), da un modulo di “Diagnostica biomolecolare” (4 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e di esercitazioni di laboratorio) e da un modulo di “Laboratorio di applicazioni in bioinformatica” (4 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e di esercitazioni di laboratorio).

OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE:

Conoscenze:

Conoscenza teorico/pratica di metodologie biomolecolari e delle tecniche bioinformatiche di base di supporto all'analisi sperimentale. Competenze applicative da impiegare nel campo delle discipline biomolecolari. Applicazioni dell'ingegneria genetica e dello studio delle proteine ricombinanti. Acquisizione delle conoscenze teorico pratiche delle moderne metodologie applicate alla diagnostica per la tipizzazione di individui varietà e specie.

Capacità:

Capacità di applicare metodologie biochimiche e biotecnologiche di base. Analisi genetiche biomolecolari e biomediche. Metodologie bioinformatiche.

Comportamenti:

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, capacità di lavorare in gruppo, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica

PROPEDEUTICITA'

Gli insegnamenti di “Chimica generale ed inorganica e laboratorio”, “Chimica organica e laboratorio”, “Matematica”, “Fisica e laboratorio”.

PREREQUISITI:

Si consiglia sia preceduto da Chimica Biologica e Biologia Molecolare o Genetica

PROGRAMMA

1. Modulo di “Clonaggio ed espressione”

Clonaggio genico Espressione di proteine ricombinanti in procarioti. Vettori di espressione procariotici di ultima generazione. Fattori che influenzano l'efficienza di espressione in ospiti batterici: caratteristiche del ceppo selezionato, temperatura, mezzo di coltura, induttori, codon usage. Espressione di proteine ricombinanti in eucarioti. Vettori di espressione eucariotici di ultima generazione. Espressione in cellule di insetto mediata da infezione da *Baculovirus*. Espressione in lievito. Analisi *in silico* di sequenze proteiche per la scelta del sistema di espressione ottimale. Diversi sistemi di produzione di proteine ricombinanti a confronto: vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di batteri, lieviti, *baculovirus* e cellule di mammifero. Produzione di proteine ricombinanti: esempi con riferimenti alla letteratura più recente.

Esercitazioni di laboratorio: Analisi elettroforetica in condizioni denaturanti e native di una miscela proteica estratta da batteri. Dosaggi spettrofotometrici a differenti temperature dell'attività catalitica di un enzima termofilo.

Testi consigliati: Si consiglia di seguire le lezioni perché l'esame verterà su quanto è stato trattato durante il corso. Per integrazione, qualsiasi testo di Ingegneria genetica o che tratti ingegneria genetica applicata ai sistemi di clonaggio ed espressione tra cui: Sandy Primrose, Richard Twyman, Bob Old, Ingegneria genetica, Principi e tecniche, Zanichelli. Terry A. Brown, BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI, Principi e tecniche, Zanichelli

2. Modulo di “Diagnostica biomolecolare”

Tecniche e metodiche applicate allo studio dei geni e della loro espressione: reazione a catena della polimerasi PCR: principio molecolare, condizioni di utilizzo, limiti, precauzioni, applicazioni (diagnostica, clonaggio, studio evolutivo). Cenni sull'organizzazione dei geni nucleari - Concetto di Genomi e Trascrittomi Concetto di genoteca-generazione di librerie genomiche e di cDNA- significatività di una libreria. Estrazione di RNA totale da cellule e tessuti Northern blotting, marcatura di sonde, sintesi di cDNA, RT-PCR, quantificazione di acidi nucleici mediante Real-Time RT-PCR Ibridazione in situ, realizzazione ed analisi di Expressed Sequence Tagged (ESTs), Realizzazione ed analisi di microarray e macroarray per lo studio dell'espressione dei geni. Tecniche e metodiche applicate allo studio dei genomi. Il sequenziamento dei genomi: metodiche, significato e applicazioni.

Analisi di un cariotipo. Applicazioni nella diagnostica, nell'analisi pre e post-natale. Concetto di polimorfismo e il loro uso nell'analisi diagnostica, forense e della mappatura dei genomi. Tecniche applicate allo studio delle modifiche epigenetiche: analisi del DNA metilato attraverso la tecnica del Sodio Bisolfito e sequenziamento; analisi delle modifiche cromatiniche attraverso immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

Esercitazione di laboratorio: Allestimento, esecuzione e visualizzazione di una reazione PCR per l'isolamento genico da genomi. Digestione con enzimi di restrizione del prodotto PCR ottenuto per identificazione di polimorfismi.

3. Modulo di “Laboratorio di applicazioni in bioinformatica”

Concetti generali delle banche dati biologici (definizione e suddivisione in categorie). BANCHE DATI di NCBI e EMBL: organizzazione delle informazioni (FLAT file e GENOME BROWSER); PubMed e criteri di ricerca di riferimenti bibliografici. Determinazione della sequenza complementare (REVERSE COMPLEMENT), traduzione e identificazione della 5' e 3' UTR (TRANSLATE TOOL). Determinazione dei domini transmembrana (TMHMM) e del peptide segnale di secrezione (SignalIP). Principi di base dell'allineamento di sequenze. Matrici a punti, algoritmi dinamici e matrici di sostituzione. Sostituzioni sinonime e non sinonime. Allineamento globale e allineamento locale. Principi di base, applicazioni e interpretazione dei risultati dell'algoritmo BLAST. Principi di base e applicazioni di programmi di allineamento multiplo. Principi di base (termodinamica e allineamento) e applicazioni di programmi di previsione della struttura del RNA.

MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

Si consiglia di seguire le lezioni perché la prova finale verterà su quanto è stato trattato durante il corso. Per integrazione, qualsiasi testo di Genetica che comprenda elementi di Ingegneria Genetica Molecolare quali, ad esempio:

1. Sandy Primrose, Richard Twyman, Bob Old, Ingegneria genetica, Principi e tecniche, Zanichelli; Terry A. Brown, BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI, Principi e tecniche, Zanichelli.
2. Hartl, D.L. e Jones, E.W. **Genetica, analisi di geni e genomi**. Ed. Edises. Griffiths, A.J.F. - Miller, J.H. - Gelbart, W.M. - Lewontin, R. C. - **Genetica moderna**-Ed. Zanichelli. Russel, P. **Genetica, un approccio molecolare**. Ed. Pearson.
3. Pascarella e Paiardini – BIOINFORMATICA, Dalla sequenza alla struttura delle proteine – Ed. Zanichelli.

Altro materiale didattico

Appunti del docente, reperibili sul sito www.docenti.unina.it

MODALITA' VERIFICA E VALUTAZIONE DELL'APPRENDIMENTO

Verifiche di apprendimento mediante test on-line (piattaforma ESOL). Esame orale. La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base della prova scritta ed orale. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

DOMANDE D'ESAME PIU' FREQUENTI

1. Passaggi per perseguire il clonaggio di un gene
2. Differenza tra "cell based gene cloning" e clonaggio per PCR
3. Differenza tra vettori di clonaggio ed espressione
4. Problematiche più frequenti relative all'espressione di proteine in *E.coli*
5. Regolazione dell'Operone lac
6. Espressione in lievito
7. Animali transgenici
8. PCR e sue varianti: principio molecolare e applicazioni
9. Real-Time PCR: principio molecolare e applicazioni
10. Concetto di genoteca-generazione di librerie genomiche e di cDNA
11. Analisi di un cariotipo e sequenziamento genomico, applicazioni nella diagnostica nell'analisi pre- e post-natale
12. Esercitazione di laboratorio
13. Epigenetica: tecniche di analisi del DNA metilato e di modifiche cromatiniche
14. Struttura delle banche dati
15. Caratteristiche dei "Genome Browsers"
16. Informazioni sui trascritti nelle banche dati
17. Ensembl Tracks
18. Matrici di sostituzione
19. Allineamenti globali e locali
20. Programmi di previsione della struttura del RNA

English

COURSE OF BIOMOLECULAR TECHNIQUES IS MADE UP OF THREE MODULES:

1. A module of Gene cloning and Expression

LEARNING ACHIEVEMENTS

Knowledge and understanding: Acquisition of the principles of genetic engineering applied to gene cloning and expression of recombinant proteins

Applying knowledge and understanding: Genetic engineering methodologies applied to gene expression.

CONTENTS: Gene cloning, expression of recombinant proteins in Prokaryotes, last generation of E.coli expression vectors, factors influencing expression efficiency in bacterial hosts: characteristics of the selected strain, growing temperature, growing media, inducers of gene expression, codon usage. Expression of recombinant proteins in Eukaryotes. Last generation of expression vectors for Eukaryotes. Gene expression in insect cells through Baculovirus. Gene expression in yeast cells. Comparison among the different expression systems: advantages and disadvantages. Examples of production of recombinant proteins.

Practical course: Native and SDS PAGE of cell extracts from E.coli containing a recombinant thermophilic enzyme expressed at high levels.

2. A module of “Biomolecular Diagnostic” (4CFU)

LEARNING ACHIEVEMENTS

Knowledge and understanding: Acquisition of theoretical/practical skills on basic Biomolecular Diagnostic techniques with a particular focus on PCR methods.

Applying knowledge and understanding: Biomolecular methodologies applied to Diagnostic.

CONTENTS: Techniques and methods applied to the study of genes and their expression. PCR polymerase chain reaction: molecular principle, conditions of use, limits, precautions and applications (diagnostics, cloning, evolutionary studies). Generation of genomic and cDNA libraries. Gene expression analysis by Real-Time PCR, in situ hybridization and microarray analysis. Karyotype analysis, sequencing of genomes: methodology, meaning and applications in diagnostics, in pre and post-natal analysis. Polymorphisms and their use in diagnostic, forensic and mapping of genomes. Epigenetic modifications: bisulfite method for DNA methylation analysis; chromatin modifications by chromatin immunoprecipitation (ChIP).

Practical course: Design, execution and display of a PCR reaction and enzymatic digestion of PCR product for the identification of polymorphisms.

3. A module of “Laboratory of Bioinformatics Applications” (4CFU)

LEARNING ACHIEVEMENTS

Knowledge and understanding: Acquisition of theoretical/practical skills on basic biomolecular methods and bioinformatics tools in support of the experimental analysis.

Applying knowledge and understanding: Bioinformatics methods.

CONTENTS: General concepts of biological databases (definition and categories). NCBI and EMBL databases: organization of information (FLAT file e GENOME BROWSER); PubMed bibliographic database (search criteria). Reverse Complement tool. Nucleotide sequence translation, identification of 5' and 3' UTR (Translate Tool). Prediction of transmembrane helices (THMM) and signal peptide (Signal IP). Principles of sequence alignment. Dot-matrix, substitution matrix and dynamic algorithms. Synonymous and nonsynonymous substitutions. Global and local alignment. BLAST tool: principles, applications, and results interpretation. Multiple sequence alignment. Basic principles of RNA structure prediction.

TEXTBOOKS

1. Sandy Primrose, Richard Twyman, Bob Old, Ingegneriagenetica, Principi e tecniche, Zanichelli; Terry A. Brown, BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI, Principi e tecniche, Zanichelli.
2. Hartl, D.L. e Jones, E.W. **Genetica, analisi di geni e genomi**. Ed. Edises.Griffiths, A.J.F. - Miller,J.H.- Gelbart, W.M.-Lewontin, R. C.- **Geneticamoderna**-Ed. ZanichelliRussel, P. **Genetica, un approccio molecolare**. Ed.Pearson.
3. Pascarella e Paiardini – BIOINFORMATICA, Dallasequenzaallastrutturadelleproteine – Ed. Zanichelli.

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS DURING EXAM

- 1.Steps necessary to achieve the cloning of a gene
- 2.Differences between cell based gene cloning and PCR cloning
- 3.Differences between cloning and expression vectors
- 4.Troubleshootings of the gene expression in *E.coli*
- 5.Regulation of lac operon
- 6.Gene expression in yeast
- 7.Transgenic animal models
- 8.PCR methods and its variants: molecular principle and applications
- 9.Real-Time PCR: molecular principle and applications
- 10.Generation of genomic and cDNA libraries.
- 11.Karyotype analysis, sequencing of genomes: applications in diagnostics in pre- and post-natal analysis
- 12.Practical laboratory course
- 13.Epigenetic analysis: DNA methylation analysis and chromatin modifications
- 14.Databases structure
- 15.Genome Browser features
- 16.Transcript information in the databases
- 17.Ensembl Tracks
- 18.Substitution matrices
- 19.Global and local alignments
20. RNA structure prediction softwares