

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, biomolecolari e biotecnologiche.

Analisi della biodiversità.

Metodologie statistiche e 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

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: *softwares* per predizioni di solubilità, stabilità, sensibilità alle proteasi, presenza di domini transmembrana, destino cellulare.

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 spettrofotometri a differenti temperature dell'attività catalitica di un enzima termofilo.

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, studi evolutivi).

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.

Integrazione e differenze tra mappa genetica, mappe fisiche e di sequenza

Concetto di polimorfismo e il loro uso nell'analisi diagnostica, forense e della mappatura dei genomi.

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.

Modulo di “Laboratorio di applicazioni in bioinformatica”

- Concetti introduttivi di informatica e bioinformatica. Sequenze di acidi nucleici e proteine.
- Manipolazione di sequenze e analisi di base: editing; sequenza complementare; traduzione; analisi composizionali su sequenze nucleotidiche e amminoacidiche.
- Caratteristiche dei dati, approfondimenti sulle sequenze biologiche e loro contenuto informativo. I data base molecolari: Banche generali e banche specializzate; formati, interrogazione e deposito dati.
- Confronto di sequenze. Algoritmi per l'allineamento di due sequenze. Allineamenti globali e allineamenti locali. Ricerca di informazioni mediante confronti di due sequenze.
- Confronti con banche dati. Allineamenti multipli. Creazioni di sequenze consenso.

MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

- Nelson DL e Cox MM – **I Principi di Biochimica di Lehninger** – V edizione- Zanichelli (ed.)

- K. Wilson, J. Walzer- **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche** -Raffaello Cortina Editore

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

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:

Hartwell- Hood- Goldberg-Reynolds- Silver- Veres– **Dall'Analisi Formale alla genomica**- Mc Graw Hill;

Pierce B. A.- **Genetica**- ed Zanichelli

Griffiths, A.J.F. - Miller, J.H.- Gelbart, W.M.-Lewontin, R. C.- **Genetica moderna**-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 CAMPUS).

Esame orale.

La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base di un adeguato numero di prove e di verifiche. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

COMPOSIZIONE DELLA COMMISSIONE PER LA VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

Marilù Chiusano (presidente), Eliodoro Pizzo, Giuliana Napolitano, Alessandra Pollice, Stefano Amente.