

C. I. biochimica avanzata e sicurezza nelle metodologie molecolari

Modulo Biologia Molecolare: Sicurezza nelle metodologie molecolari e laboratorio

Anno accademico 2013-2014

Docente Rossella Di Giamo

digiamo@unina.it

PROGRAMMA:

Introduzione al corso. Caratterizzazione di genomi eucariotici e procariotici. Struttura e funzione dei genomi. (struttura dei geni, importanza e ruolo dei geni duplicati, sequenze ripetute e DNA satellite). Concetto di complessità genica e genomica. Introduzione al progetto ENCODE per l'analisi funzionale di genomi.

Struttura e funzione di acidi nucleici (DNA, RNA). Componenti della cromatina e modifiche epigenetiche del DNA e degli istoni in relazione al ruolo biologico. Struttura e funzione di RNA non codificanti. Biogenesi e ruolo biologico dei microRNA e dei long non coding RNA.

I metodi biomolecolari per la caratterizzazione del genoma. Enzimi di restrizione e loro uso. Southern blot. Ruolo delle DNA polimerasi nella duplicazione cellulare. Tipi di DNA polimerasi usate in laboratorio: Nick translation, random primer, PCR, RAPD, SSCP.

Progetti di sequenziamento di genomi. Metodi di sequenziamento del DNA, dal metodo di Sanger ai metodi per next-generation sequencing.

Problematiche collegate al clonaggio del DNA nei diversi tipi di vettori (plasmidi, virus), costruzione di genoteche e cDNAteche analisi di sequenze specifiche mediante ibridazione con sonde radioattive e non-radioattive.

Uso in biologia di virus, tipi di virus, biosicurezza dell'uso dei virus, uso dei virus come vettori di espressione.

I metodi biomolecolari per la caratterizzazione del trascrittoma:

Esempi di struttura di geni eucariotici, struttura dei promotori e le modalità di controllo dell'espressione genica.

Analisi qualitative e quantitative degli RNA, RT-PCR e RACE. Real Time-PCR. Microarray, Northern blot, ibridazione in situ. Ruolo delle RNA polimerasi e loro uso in laboratorio, produzione di RNA sintetici (riboprobe).

Metodi per lo studio della regolazione dell'espressione genica attraverso interazione DNA/proteine : Chromatin ImmunoPrecipitation assay (ChIP), saggi di accessibilità di proteasi al DNA, Chromosome conformation capture (from 3C to 5C).

Metodi di trasferimento di geni in cellule eucariotiche e problematiche dell'espressione in cellule animali. Vettori di espressione procariotici ed eucariotici. Esempi di produzione di molecole ricombinanti. Metodi per l'espressione inducibile e tessuto-specificità. Sistemi per la downregolazione di geni.

Cenni sulla produzione di animali transgenici e KO. Esempi di animali transgenici e le tecniche più utilizzate per il trasferimento di geni in cellule eucariotiche per espressione transiente ed stabile.

Concetti di biosicurezza in laboratorio: definizione di biosicurezza e livelli di biosicurezza dei laboratori di biologia molecolare. Norme che regolano i diversi livelli di biosicurezza. Tipi di cappe di aspirazione a secondo dei livelli di biosicurezza. Esempi di laboratori di livello di biosicurezza 1:dagli stabulari ai laboratori per le colture cellulari.

Esercitazione di bioinformatica: Utilizzo delle banche dati per la ricerca in internet di sequenze genomiche, cDNA e EST. Dai risultati di un microarray all'analisi dei geni.

