PROGRAMMA DIDATTICO (2013-2014)

DOCENTE: **MARIA SCARDONI**	
Insegnamento: Metodologie diagnostiche di Biochimica e di Biologia molecolare	
MODULO: **METODI E TECNICHE DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE**	
CFU Insegnamento: 8	CFU Modulo: 2
Anno di corso e semestre: 3° anno, 1°semestre	Equivalenti a ore di lezione frontale: **24**

Programma in forma estesa:

Acidi nucleici: composizione e proprietà di DNA ed RNA.

Tecniche di conservazione di diverse tipologie di materiale per l'estrazione di DNA con particolare riguardo per sangue, fluidi biologici, tessuto congelato e tessuto fissato incluso in paraffina.
Principi e caratteristiche delle principali tecniche di estrazione del DNA. Descrizione ed esame in particolare dei protocolli per l'estrazione di DNA mediante fenolo/cloroformio (simulazione), TRIzol, kit commerciali con resine su colonna e con biglie magnetiche (simulazione). Dialisi e microconcentratori per desalificare e purificare il DNA. Tecniche di microdissezione manuale e laser assistita di tessuti inclusi in paraffina.

Tecniche di conservazione di diverse tipologie di materiale per l'estrazione di RNA con particolare riguardo per sangue, fluidi biologici, tessuto congelato. Problematiche legate alle RNasi: come gestirle in laboratorio. Principi e caratteristiche delle principali tecniche di estrazione dell'RNA. Descrizione ed esame in particolare dei protocolli per l'estrazione di RNA mediante gradiente di Cloruro di Cesio, TRIzol, kit commerciali. Richiamo alle tecniche di centrifugazione con riferimento particolare all'ultracentrifuga.

Controllo qualitativo e quantitativo del DNA estratto mediante tecniche spettrofotometriche (spettrofotometro classico e Nanodrop), fluorimetriche (Qubit) e separazione elettroforetica. Principi alla base di tali tecniche e protocolli. Elettroforesi. Gel di agarosio come setacci per le molecole, marcatori di peso molecolare, sistemi di rilevazione del DNA dopo elettroforesi (simulazione).
Controllo qualitativo e quantitativo dell'RNA estratto mediante tecniche spettrofotometriche (spettrofotometro classico e Nanodrop), fluorimetriche (Qubit) ed elettroforesi in sistemi capillari (bioanalyzer Agilent) . Principi alla base di tali tecniche e protocolli.

Tecniche di Ibridazione degli acidi nucleici. Southern blot, Northern blot. Caratteristiche delle sonde: lunghezza, temperatura di "melting", metodi di rivelazione (radioattivi, enzimatici). Applicazioni pratiche nella routine diagnostica con particolare riferimento ai protocolli per l'ibridazione inversa (su striscia di carta) e l'ibridazione in fase liquida.

Reazione di polimerizzazione a catena (PCR). Primers, nucleotidi, Taq DNA polimerasi, Tamponi. Software per il disegno dei primers. Allestimento di un protocollo tipo (simulazione). I termociclatori: allestimento di un programma tipo (simulazione). Problematiche legate alla contaminazione. Visualizzazione del prodotto di PCR. Descrizione ed esame di un protocollo diagnostico specifico.

Sequenziamento: Sanger, principio del metodo. Esempio di protocollo applicato alla routine diagnostica per l'analisi mutazionale del gene KRAS nelle neoplasie solide. Materiale di partenza, microdissezione,

allestimento reazione PCR, controllo amplificato su Agilent bioanalyzer, purificazione con biglie, allestimento reazione di sequenza, purificazione con biglie, corsa su sequenziatore (AB 3130XL), verifica dell'elettroferogramma. Il sequenziatore: descrizione dello strumento, i capillari, il polimero, il caricamento. Esempi di output. Cenni ai metodi di sequenziamento alternativi al Sanger (pirosequenziamento).