

Testi del Syllabus

Resp. Did.	SCHOEFTNER STEFAN	Matricola: 022775
Docenti	BANDIERA ANTONELLA, 2,5 CFU SCHOEFTNER STEFAN, 3,5 CFU	
Anno offerta:	2021/2022	
Insegnamento:	210SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE	
Corso di studio:	SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE	
Anno regolamento:	2019	
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.)	Elementi di Biologia molecolare degli acidi nucleici, tecniche basilari per la 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 basilari per la manipolazione degli acidi nucleici, per l'espressione di proteine ricombinanti e 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 analisi degli amplificati su gel. Il Prof. Schoeftner sosterrà il corso di lezioni frontali (3 CFU), la prof.ssa Scaggiante il corso di "laboratorio virtuale" (1 CFU) e la prof.ssa Bandiera sosterrà il corso pratico di laboratorio di Biologia Molecolare (2 CFU).
Testi di riferimento	T.A. Brown Biotecnologie molecolari, Zanichelli
Obiettivi formativi	Il corso è strutturato per fornire agli studenti un approccio pratico di laboratorio nell'ambito biomolecolare e per familiarizzare con strumenti e tecniche comunemente utilizzate in questo campo. L'obiettivo del corso è dare agli studenti la possibilità di prendere confidenza con attrezzature e metodiche correntemente utilizzate nella ricerca sperimentale con particolare riferimento alle fasi pre-analitiche, analitiche e post-analitiche dell'estrazione di acidi nucleici e alle tecniche di amplificazione del bersaglio. D1. Conoscenza e comprensione: Durante le lezioni frontali (3 CFU), il corso di laboratorio e il corso di laboratorio "virtuale" gli studenti acquisiranno un background teorico di tecniche di base di biologia molecolare e diagnostica. Questo rappresenterà la base per comprendere gli esperimenti che verranno effettuati durante il corso di laboratorio. Inoltre saranno trattati metodi più complessi e applicazioni pratiche in

biologia molecolare.D2: Capacità di applicare conoscenza e comprensione: Il corso rappresenta un'opportunità per gli studenti di familiarizzare con le attrezzature e le metodologie di base utilizzate nella ricerca sperimentale. In particolare, alla fine del corso gli studenti saranno in grado di estrarre il DNA plasmidico, di utilizzare gli enzimi di restrizione, di impostare reazioni di amplificazione del DNA. Dopo aver eseguito esperimenti pratici gli studenti impareranno ad analizzare il risultato delle procedure impiegate e interpreteranno e discuteranno i dati ottenuti.

Prerequisiti

Basi teoriche di biologia Molecolare

Metodi didattici

Lezioni teoriche con supporti multimediali (filmati) e presentazioni powerpoint. Lezioni di tipo interattivo con coinvolgimento degli studenti in esercitazioni di calcolo e di problem solving. Viene stimolata la capacità di esame oggettivo dei dati (discussione) e interpretazione dei risultati sperimentali.

Altre informazioni

Il materiale didattico è disponibile su moodle federato

Modalità di verifica dell'apprendimento

2 Esami scritti:Esame 1: Elaborati scritti sul lavoro svolto in laboratorio da consegnare alla fine di ciascuna esercitazione
Per la valutazione delle relazioni vengono presi in considerazione i seguenti criteri:
-grado di impegno, presenza, accuratezza nell'esposizione
-capacità, chiarezza nell'esposizione, capacità di sintesi, conoscenza dei termini tecnici
-comprensione, capacità di spiegare e commentare, presenza o meno di errori concettualiUn totale massimo di 15 punti possono essere raggiunti nel primo esame. Per partecipare alla seconda parte dell'esame è necessario un minimo di 7,5 punti.Esame 2. I progressi di apprendimento delle lezioni teoriche (Prof.ssa Scaggiante, Prof. Schoeftner) saranno verificati con una prova scritta. Punti totali: 16.L'esame 2 consiste di 12 domande a risposta multipla (0,5 punti per domanda) e 2 "domande aperte" (5 punti per domanda) su argomenti più ampi affrontati durante le lezioni teoriche e il corso di laboratorio.Il punteggio finale del corso sarà il risultato della somma di entrambi gli esami. Punti massimi: 31; per superare l'esame è richiesto un minimo di 18 punti.

Programma esteso

PARTE TEORICA
A.1 Prof. Schoeftner (3CFU)
1. L'anatomia delle cellule, biomolecole, preparazione DNA/RNA/proteine
2. Caratteristiche fisiche dell'DNA e dell'RNA, tautomerizzazione, tipi diversi di eliche di DNA, ibridi tra RNA e DNA, struttura dell'RNA, Aptameri
3. DNA ricombinate, vettori di clonaggio, endonucleasi, cromosomi artificiali, batteriofagi, espressione di proteina ricombinante, introduzione del DNA ricombinate nelle cellule ospiti
4. Sequenziamento del DNA, immunità batterica, manipolazione del genoma pro- ed eucariotico
5. Tecnologie di ibridazione (RNA FISH, DNA FISH, Southern blot, Northern blot); elettroforesi, tecniche per lo studio delle interazioni DNA-proteine (band shift, footprint, immunoprecipitazione della cromatina)
6. Analisi della espressione genica: arrays, high content sequencing, determinazione dei termini 5' e 3' dell'RNA, single molecule transcript analysis
A.2 Prof.ssa Scaggiante: (1 CFU)
1. ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI. Principi generali dell'estrazione di DNA e RNA totale. I kit per l'estrazione degli acidi nucleici. L'arricchimento in mRNA. La valutazione qualitativa e quantitativa del DNA e RNA. Le procedure per evitare la degradazione di RNA. Il problema della contaminazione di DNA nei preparati di RNA. Esempi di calcolo e di valutazione qualitativa. 2. LA PCR COME TECNICA QUALITATIVA. La PCR e la RT-PCR: principi generali e tecnici. Valutazione dei prodotti su gel. La PCR e RT-PCR: principi generali e curva di amplificazione. La presenza di bande parassite e le implicazioni. Distinzione tra amplificati da cDNA e da DNA contaminante. Controllo di qualità. Ottimizzazione della reazione. Esempi di applicazioni diagnostiche. 3. LA PCR COME TECNICA QUANTITATIVA. Principi generali della Real-Time PCR e rilevamento degli amplificati con coloranti o sonde. Il valore di CoT. La curva standard. La valutazione relativa e assoluta.

limiti della Real-Time PCR. La PCR competitiva: principi generali e costruzione dei competitori. 4. LE NUOVE FRONTIERE DELLE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE: La digital PCR. Principi generali. L'amplificazione in droplet e la quantificazione relativa e assoluta. L'applicazione della ddPCR all'analisi del DNA circolante (la biopsia liquida). Le applicazioni per lo studio delle mutazioni. B. ATTIVITÀ DI LABORATORIO: Prof.ssa Bandiera (2 CFU) 1- TECNICHE E STRUMENTI UTILIZZATI NEI LABORATORI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Il laboratorio di biologia molecolare: norme di sicurezza e comportamento, dispositivi di protezione, organizzazione: attrezzatura e strumentazione. Soluzioni madre e relative diluizioni. Utilizzo pipette automatiche per prelievo piccoli volumi e simulazione di allestimento reazioni. Preparazione della soluzione per il gel elettroforetico

2- I PLASMIDI

Definizione di plasmide e descrizione dei plasmidi che verranno manipolati. Estrazione DNA plasmidico mediante kit commerciale e stima semplice della quantità di DNA estratto.

3- I PRINCIPI DELLA PCR

Principio della PCR. Allestimento di reazioni per l'amplificazione di frammenti di DNA dagli stampi plasmidici estratti nell'esercitazione precedente

4- L' ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Metodi di analisi del DNA, principi su cui si basa la tecnica, informazioni che si ricavano Preparazione dei campioni e corsa elettroforetica su gel di agarosio per l'analisi dei campioni di DNA plasmidico estratti e dei campioni derivanti dalla PCR

5- GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

Caratteristiche ed esempi di utilizzo in biologia molecolare. Mappatura per restrizione dei plasmidi previamente estratti mediante kit commerciale e analisi dei frammenti ottenuti assieme all'analisi dei risultati della PCR



Testi in inglese

	Italian
	The course provides theoretical and practical training on techniques and experimental approaches in molecular biology. A focus will be set on the molecular biology of nucleic acids and biomolecular techniques. Basic techniques for DNA manipulation, gene study, gene cloning, gene expression analysis and recombinant DNA technology will be addressed. Laboratory exercises include the teaching of laboratory safety standards the handling of laboratory instruments, the extraction of DNA and its electrophoretic separation on agarose gel, the use of restriction enzymes for plasmid mapping, DNA amplification by PCR and analysis of the amplified products by gel electrophoresis. Prof. Schoeftner will offer a classic lecture program (3 CFU), Prof.ssa Scaggiante a "virtual laboratory" course (1 CFU) and Prof.ssa Bandiera will guide the practical laboratory course in Molecular Biology (2 CFU)
	T.A. Brown Biotecnologie molecolari, Zanichelli
	The course aims to transmit a theoretical and practical introduction into the use and understanding of molecular biology techniques and to get familiar with basic instrumentation used in this field. A particular focus will be given on pre-analytic, analytic and post-analytics phases of DNA extraction and target amplification. In addition, the advantages and disadvantages of amplification techniques will be addressed, D1. Knowledge and understanding: During classic lectures, the laboratory course (3+2CFU) and the virtual laboratory course (1CFU) students will get the theoretical background in basic techniques for molecular biology and diagnostics. This will represent the basis for understanding the

experiments that will be carried out. In addition, more complex methods and practical applications in molecular biology will be addressed. D2: Applying knowledge and understanding: The course represents an opportunity for the students to become familiar with equipment and basic methodologies 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. After performing practical experiments students will learn to analyze the result of the procedures employed and will interpret and discuss data obtained.

Basic concepts of molecular biology

Theoretical lessons with multimedia supports (movies) e presentazioni powerpoint. Interactive lessons with student involvement in calculation and problem solving exercises. The ability to objectively examine the data and interpret (discussion) the experimental results is stimulated.

Support information for the course is available via moodle federato

2 written exams: Exam 1: Reports on lab work at the end of each lab practice (Prof. Bandiera).

Reports will be evaluated assessing:

-diligence, attendance, presentation accuracy

-personal skills, synthesis, description and clarity in presentation, technical terms knowledge

-understanding degree, explanation and discussion skills, presence of conceptual errors. A total of 15 points can be reached. A minimum of 7,5 points is necessary to participate in the second part of the exam Exam 2.

Learning progress on the theoretical lectures (Prof. Scaggiante, Prof. Schoeftner) will be monitored in a written exam. Total points: 16. Exam 2 consists of 12 multiple choice questions (0,5 points per question) and 2 "open questions" (5 points per question) on broader topics addressed during the theoretical lectures e il corso di laboratorio. The final mark of the course results from the sum of both exams. Maximum points: 31; a minimum of 18 points is required to pass the exam.

A. THERORETICAL SESSIONA.1 Prof. Schoeftner (3 CFU)1. Anatomy of the cell, biomolecules, concept of preparation of RNA/Protein/DNA2. Physical properties of RNA and DNA, Tautomerization of bases, DNA helix types, RNA:DNA hybrids, RNA structure, Aptamers. 3. Recombinant DNA techniques, Cloning vectors, endonucleases, artificial chromosomes, phage technology recombinant protein expression, introduction of genes into host-organisms 4. DNA sequencing, bacterial immunity, manipulation of the genome content of pro- and eukaryotic organisms,5. Hybridization related techniques (RNA-FISH, DNA-FISH, Southern blot, Northern blot), Electrophoresis, methods to study DNA:protein interaction (band shift, DNA footprinting, chromatin immunoprecipitation)6. Gene expression analysis: array technology and high content sequencing, determination of 3' and 5' ends of RNA, single molecule transcript analysis A.2 Prof.ssa Scaggiante (1 CFU):1. EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS. General principles of extraction of DNA and total RNA. Kits for nucleic acid extraction. Enrichment in mRNA. Qualitative and quantitative evaluation of DNA and RNA. Procedures to avoid RNA degradation. The problem of DNA contamination in RNA preparations. Examples of calculation and qualitative evaluation.2. PCR AS A QUALITATIVE TECHNIQUE. PCR and RT-PCR: general and technical principles. Evaluation of gel products. PCR and RT-PCR: general principles and amplification curve. The presence of parasitic bands and implications. Distinction between cDNA amplified and contaminating DNA. Quality control. Reaction optimization. Examples of diagnostic applications.3. PCR AS A QUANTITATIVE TECHNIQUE. General principles of Real-Time PCR and detection of amplifiers with dyes or probes. The value of CoT. The standard curve. The relative and absolute evaluation. Examples of curves and calculation. Advantages and limitations of Real-Time PCR. Competitive PCR: general principles and construction of competitors.4. THE NEW FRONTIERS OF AMPLIFICATION

TECHNIQUES: The digital PCR. General principles. Amplification in droplet and relative and absolute quantification. The application of ddPCR to the analysis of circulating DNA (liquid biopsy). Applications for the study of mutations. PRACTICAL LABORATORY SESSION Prof.ssa Bandiera (2 CFU)

1- BIOMOLECULAR LAB EQUIPMENT AND TECHNIQUES
Biochemistry lab: rule of conduct and safety, hazardous reagents and material safety data sheet; equipment and lab instrumentation. The use of automatic lab pipettes for small volume manipulation. Preparation of gel electrophoresis solutions (running and loading buffers)

2- PLASMIDS

Plasmid DNA extraction by a commercial kit, evaluation of extraction yield, preparation of samples for electrophoretic analysis

3- PCR: PRINCIPLES AND PROCEDURE

PCR reactions setting to amplify DNA fragments from plasmid templates previously extracted.

4- ELECTROPHORETIC ANALYSIS ON AGAROSE GEL

DNA analysis methods, technique description, information obtained by the analysis. Electrophoretic run on agarose gel of extracted DNA samples

5- RESTRICTION ENZYMES

Description and examples of employment in molecular biology. Restriction maps of plasmids previously extracted with commercial kit and analysis of the DNA fragments obtained