

Corso di Laurea in Scienze Biologiche
Indirizzo Bio-Molecolare
Corso di Tecnologie Biomolecolari
Prof. Vito De Pinto – Prof. Francesca Guarino

Anno Accademico 2008-2009

PROGRAMMA

Per frequentare proficuamente il corso, lo studente deve aver seguito gli insegnamenti degli anni precedenti ed, in particolare, avere ben chiari i contenuti dell'esame di Biologia Molecolare.

SICUREZZA IN LABORATORIO. Principi di base. Salute e sicurezza. Tecniche di sterilizzazione e disinfezione

TECNICHE DI BASE. Elettroforesi: principi; elettroforesi di DNA e di proteine. Centrifugazione: principi; centrifugazione differenziale; centrifugazione in gradiente di densità

MANIPOLAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI. Estrazione di DNA da cellule; dosaggio degli acidi nucleici; purificazione di acidi nucleici; principali enzimi usati in biologia molecolare: enzimi di restrizione e costruzione di mappe di restrizione, altre nucleasi, polimerasi, enzimi che modificano gli acidi nucleici; uso dei radioisotopi; marcatura del DNA mediante radioisotopi e marcatura a freddo: metodo random priming, metodo nick translation, marcatura terminale; tecniche di ibridazione; Southern e Northern blot; analisi dei polimorfismi del DNA; sequenziamento del DNA: metodo di Sanger, di Maxam-Gilbert, sequenziamento automatizzato; sintesi di oligo.

OSPITI PER DNA RICOMBINANTE. Batteri, *Escherichia coli* K12; caratterizzazione genotipica dei ceppi di interesse biotecnologico; terreni di coltura; metodi di crescita e di selezione; Fagi; cellule di lievito; cellule di insetto; cellule di eucariote superiore, terreni di coltura, tecniche di selezione.

VETTORI. Caratteristiche essenziali di un vettore di clonaggio; vettori plasmidici (pBR322, serie pUC, serie pGEM); vettori derivati dal fago λ (vettori di sostituzione, vettori di inserzione); vettori derivati da fagi filamentosi (serie M13); fagemidi; cosmidi; BAC; vettori derivati da lievito (Ylp, YEp, YRp, YAC); caratteristiche essenziali di un vettore di espressione; vettori plasmidici d'espressione eterologa; tecnologia di epitope-tagging; espressione di proteine ricombinanti in lievito, cellule di insetto, cellule di mammifero; principio e pratica del clonaggio; allestimento della reazione di legazione, controlli.

LIBRARIES. L. genomiche: problema della rappresentatività delle L.; costruzione di L. genomiche; screening di L. genomiche; caratterizzazione e sequenziamento di cloni isolati dopo screening; L. di cDNA; isolamento degli mRNA; sintesi dei cDNA; costruzione delle L. cDNA; library normalizzate; sequenze EST e loro utilità

PCR. principi del metodo; problematiche: scelta dei primers; analisi dei risultati; PCR di molecole di RNA: RT-PCR, Real time PCR; applicazioni non diagnostiche: clonaggio con PCR, subclonaggio, mutagenesi mediata da PCR; applicazioni diagnostiche: PCR multiplex, ricerca della presenza di specifici microrganismi, ricerca di mutazioni; uso forense della PCR; uso della PCR per mappare il DNA, analisi di microsatelliti; costruzione di chimere.

Sussidi didattici:

Terry A. Brown. Biotecnologie Molecolari - Principi e Tecniche- Zanichelli

Dale J.W., von Schantz M., Dai Geni ai Genomi, principi ed applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante, Edises

Per approfondimenti

Reed R. et al., Metodologie di base per le Scienze Biomolecolari, Zanichelli

Ninfa A.J., Ballou D.P., Metodologie di Base per la Biochimica e la Biotecnologia, Zanichelli