

Insegnamento <b>Biologia Molecolare - Modulo II</b>	Corso di Laurea <b>Biotechnologie</b>	Anno <b>2°</b>	Periodo didattico <b>1°</b>	Crediti <b>5</b>
Docente: <b>Dr. Carlo Vascotto</b>		Anno accademico: <b>2013/2014</b>		

#### Obiettivi formativi specifici:

Il Corso di Biologia Molecolare – Modulo II ha come obiettivo formativo quello di approfondire gli aspetti teorici, precedentemente sviluppati nel Modulo I, mediante esercitazioni pratiche. Gli studenti avranno la possibilità di mettere in pratica dei protocolli inerenti l'utilizzo delle metodiche del DNA ricombinante, l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti in un sistema eucariotico, nonché l'analisi di espressione genica e proteica in cellule eucariotiche.

#### Competenze acquisite:

- Nozioni sulla sicurezza in laboratorio;
- Tecnologia del DNA ricombinante;
- Espressione e purificazione di proteine ricombinanti in sistemi procariotici;
- Espressione di proteine ricombinanti in sistemi eucariotici;
- Analisi di espressione genica e proteica in cellule eucariotiche;
- Concetti base sulle metodiche di silenziamento genico.

Lezioni ed esercitazioni		Ore
Argomenti	Contenuti specifici	
Scurezza in laboratorio	Nel corso delle lezioni verranno illustrati i principi base sulla sicurezza in laboratorio con particolare riferimento alle esperienze pratiche che gli studenti affronteranno durante il corso.	2
La tecnologia del DNA ricombinante	<p><u>Lezioni frontali: 5h</u></p> <p>Crescita e selezione di colture batteriche procariotiche. I plasmidi batterici: caratteristiche e classificazione dei batteri naturali. Plasmidi non integrativi ed episomiali. La coniugazione batterica. I batteriofagi: caratteristiche principali. Ciclo litico, lisogenico e ciclo del fago M13. Plasmidi ingegnerizzati: caratteristiche principali ed elementi caratterizzanti. Trasformazione batterica: definizione e metodi per effettuarla. Misurazione della crescita batterica e quantificazione della quantità di batteri in una coltura. La trasformazione batterica: definizione, protocollo per la trasformazione batterica e calcolo dell'efficienza di trasformazione. Lisi batterica e purificazione del DNA: lisi chimica e lisi fisica. Estrazione organica mediante fenolo, purificazione mediante scambio ionico e purificazione mediante guanidinio tiocianato. Estrazione di DNA da vegetali. Purificazione di DNA plasmidico: lisi alcalina con estrazione con solventi organici, precipitazione su gradiente di cloruro di cesio e metodi cromatografici. Quantificazione di acidi nucleici mediante lettura spettrofotometrica. Strategie di clonaggio ed identificazione dei cloni ricombinanti. Enzimi utilizzati nel clonaggio: la ligasi, la fosfatasi alcalina e gli enzimi di restrizione. Clonaggio blunt e clonaggio direzionale. Utilizzo di estremità coesive nei clonaggi: linkers, adattatori e code omopolimeriche. La reazione di ligasi: preparazione di vettore ed inserto e i controlli. Metodi di screening di una reazione di ligasi: PCR, digestione enzimatica ed inattivazione inserzionale. Sistemi basati sull'inattivazione del gene <i>lacZ</i>. Vettori fagici: il fago <math>\lambda</math>. Preparazione di una sospensione di fagi, induzione mediante controllo della temperatura, raccolta di una coltura infetta. Il <i>packaging in vitro</i>: sistema a singolo ceppo e a doppio ceppo. Infezione fagica e screening dei fagi ricombinanti: inattivazione inserzionale del gene <i>lacZ</i> e del gene <i>cl</i>, fenotipo Spi e selezione per dimensione del genoma. Utilizzo del fago <math>\lambda</math> come vettore di clonaggio: vettori di inserzione e di sostituzione. Il fago M13: infezione e ciclo replicativo. Isolamento del DNA del genoma del fago M13. Il genoma del fago M13 e le sue modifiche. Vettori ibridi: i cosmidi, i fagemidi.</p> <p><u>Esercitazioni: 18h</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Preparazione di terreni e piastre per la crescita di batteri;</li> <li>✓ Trasformazione di batteri competenti TOP10 e piastra tura su terreni selettivi;</li> <li>✓ Calcolo dell'efficienza di trasformazione dei batteri ricombinanti;</li> </ul>	23

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Isolamento di DNA plasmidico mediante <i>mini-prep</i>;</li> <li>✓ Calcolo della concentrazione di DNA plasmidico mediante lettura spettrofotometrica;</li> <li>✓ Analisi di restrizione di DNA plasmidico;</li> <li>✓ Purificazione di DNA da gel di agarosio;</li> </ul>	
Creazione e screening di una genoteca	<p>Genoteche a cDNA e a DNA genomico. Calcolo del numero di cloni ricombinanti necessari per coprire un intero genoma. Metodi per la creazione di frammenti di DNA. Vettori ad alta capacità per creazione di genoteche: <math>\lambda</math> ZAP, vettori BAC, il batteriofago P1 e vettori pYAC. Genoteche a cDNA: copiatura, eliminazione del filamento stampo e sintesi del complementare. Screening delle genoteche: metodi basati su sequenza e struttura/funzione. Analisi mediante ibridazione, il <i>plaque lift</i>, utilizzo di sonde biotilate e coniugate con HRP. Analisi mediante PCR. Screening eterologo per l'individuazione di geni omologi. Analisi immunologica, analisi mediante <i>South-western</i> e <i>North-western</i>, complementazione funzionale e <i>gain of function</i>.</p>	2
Espressione di proteine ricombinanti in <i>E.coli</i>	<p><u>Lezioni frontali: 4h</u></p> <p>Parametri che influiscono nella scelta del sistema di espressione. Vantaggi e svantaggi della produzione di proteine ricombinanti in <i>E.coli</i>. Caratteristiche dei plasmidi per l'espressione di proteine ricombinanti: i vettori della classe pGEX e pET. Elementi regolativi essenziali per l'espressione di proteine ricombinanti in <i>E. coli</i>: il sistema a cassetta. I promotori: forti, deboli, inducibili, reprimibili. Promotori: lacZ, trpA, tac, <math>\lambda</math> P1 e T7. L'operone del lattosio e la regolazione positiva da cAMP (presenza/assenza di glucosio). IPTG come induttore analogo non metabolizzabile del lattosio. Proteine di fusione: vantaggi e svantaggi dell'espressione di una proteina ricombinante in fusione con una proteina batterica. Tag di fusione: GST, MBP, HisTag, FLAG peptide e relativi metodi di purificazione. Rimozione della proteina di fusione mediante proteolisi: Fattore X, Trombina e TEV protease (tobacco etch virus protease). Caratteristiche del ceppo <i>E.coli</i> BL21. Espressione di proteine ricombinanti <i>in batch</i> e con fermentatori. Parametri monitorati per il controllo della crescita/induzione. Quantificazione spettrofotometrica di un estratto proteico mediante il <i>Saggio di Bradford</i>. Calcolo dell'efficienza di espressione e purificazione di una proteina ricombinante. I vettori della classe pGEX: caratteristiche generali, metodi di purificazione di GST-tagged proteins e rimozione della GST-tag. La cromatografia di affinità con resina derivatizzata con glutatione ridotto. I vettori della classe pET: caratteristiche generali, metodi di purificazione di His-tagged proteins e rimozione della His-tag. Induzione dell'espressione basata sul promotore del batteriofago T7. La cromatografia di affinità con resina derivatizzata con Nichel. Svantaggi associati all'utilizzo di <i>E. coli</i> come sistema di espressione: assenza di <i>splicing</i>, terminazione precoce, <i>codon usage</i>, mancanza di PTMs, formazione di corpi di inclusione e necessità di protocolli di <i>refolding</i>.</p> <p><u>Esercitazioni: 15h</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Lisi di cellule batteriche in cui è stata indotta l'espressione di una proteina ricombinante;</li> <li>✓ Purificazione <i>in batch</i> della proteina ricombinante e quantificazione mediante saggio colorimetrico di <i>Bradford</i>;</li> <li>✓ Analisi della purificazione su gel SDS-PAGE e colorazione con Comassie;</li> <li>✓ Saggio di cleavage di un DNA apurinico per valutare l'attività endonucleasica della proteina ricombinante purificata.</li> </ul>	19
Espressione di proteine ricombinanti in sistemi eucariotici	<p>Caratteristiche di un vettore eucariotico. I principali promotori eucariotici: GAL10, AXO, Glucoamilasi, Cellobioidrolasi. I sistemi di espressione in <i>S.cerevisiae</i> e <i>P.pastoris</i>. e caratteristiche dei vettori utilizzati. La glicosilazione in <i>S.cerevisiae</i> e <i>P.pastoris</i>. Espressione di proteine ricombinanti in cellule di mammifero. Comparazione tra sistemi di espressione in batteri, batteri eucariotici e in cellule di mammifero. Elementi caratterizzanti un vettore di espressione eucariotico: i promotori CMV, SV40 e RSV. Metodiche per l'introduzione di DNA esogeno in cellule eucariotiche: sistemi virali, trasfezione, iniezione e <i>DNA-coted tungsten</i>. Metodi di trasfezione con cloruro di calcio o liposomi. Sistemi di espressione inducibile: l'operatore Tet. Sistemi Tet-on e Tet-off: funzionamento,</p>	2

	caratteristiche e vantaggi. Cenni sull'espressione di proteine ricombinanti in baculovirus e mediante sistemi di <i>pharming</i> .	
Analisi di espressione genica e proteica in cellule eucariotiche	<p><u>Lezioni frontali: 3h</u></p> <p>La manipolazione dell'RNA. Fonti di RNase e precauzioni da adottare nei protocolli che prevedono l'utilizzo di RNA. Principio su cui si basa la PCR. Componenti e fasi della reazione: <i>denaturation</i>, <i>annealing</i> ed <i>elongation</i>. Caratteristiche dei primers e definizione della temperatura di melting (<math>T_m</math>). La Taq polimerasi: caratteristiche dell'enzima ed esempi di enzimi disponibili in commercio (Hot start, High fidelity, Fast PCR, Long PCR). La reazione di retro trascrizione: innesco con oligo dT, random esaprimers o primers a sequenza specifica. Le trascrittasi inverse AMV, M-MLV, Tth: caratteristiche e condizioni di utilizzo. I controlli della reazione di RT-PCR. La PCR semiquantitativa e l'utilizzo di geni <i>housekeeping</i> come normalizzatori per stimare la quantità di RNA di partenza. I controlli della reazione di retro trascrizione e di PCR. Applicazione della PCR: la mutagenesi sito specifica, PCR <i>in situ</i>, e Proximity Ligation Assay. La <i>Real time PCR</i>: descrizione della tecnica e vantaggi rispetto alla PCR semiquantitativa. I concetti di <i>threshold cycle</i> (<math>C_T</math>), fase esponenziale e di plateau. Interpretazione di un grafico di <i>Real Time PCR</i>. Applicazioni quantitative della <i>Real time PCR</i>: quantificazione assoluta e relativa. Principio di funzionamento delle tecnologie Sybr green e Taqman. Northern and Southern blot: procedura di separazione, trasferimento, ibridizzazione, rilevamento ed analisi. Il Western blot: fasi dell'immunoriconoscimento e sistemi di rilevazione della proteina. Il dot blot e l'utilizzo di sistemi di analisi dell'immagine per l'analisi quantitativa dei livelli di espressione proteica.</p> <p><u>Esercitazioni: 12h</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Estrazione e purificazione di RNA da cellule di mammifero;</li> <li>✓ Quantificazione dell'RNA mediante spettrofotometro ed analisi su gel dell'RNA;</li> <li>✓ Quantificazione spettrofotometrica dei primers per la PCR;</li> <li>✓ Analisi dei primers su gel denaturante e colorazione argentea;</li> <li>✓ Reazione di retrascrizione e di PCR;</li> <li>✓ Analisi su gel della reazione di PCR.</li> </ul>	15
Il silenziamento genico	Cenni storici sulla scoperta dell' <i>RNA interference</i> (RNAi). Aspetti biochimici correlati con il silenziamento genico basato sull'RNAi: <i>Initiation step</i> ed <i>Effector step</i> . Utilizzo dell'RNAi per il silenziamento genico specifico in cellule di mammifero: caratteristiche dei dsRNA e metodi di inserimento. Utilizzo dei vettori della classe pSUPER per il silenziamento genico transiente. Il silenziamento genico inducibile mediante l'utilizzo dei vettori della classe pTER. I controlli sperimentali degli esperimenti di silenziamento genico: <i>scramble sequence</i> , curva di titolazione, <i>funzional rescue</i> .	2
<b>Totale ore lezioni ed esercitazioni</b>		<b>65</b>
<b>di cui di esercitazioni</b>		<b>45</b>
<b>Ulteriori attività di didattica assistita</b>		<b>Ore</b>
Laboratorio		
Seminari e/o testimonianze		
Corsi integrativi		
Visite guidate		
<b>Totale ore dedicate ad altre attività di didattica assistita</b>		
<b>Totale ore complessive</b>		<b>65</b>

**Modalità d'esame:** Prova pratica di laboratorio con valutazione, esame scritto e prova orale.

**Testi consigliati:**

T.A. Brown 2007 "Biotecnologie molecolari"-Zanichelli, Bologna

Ulteriore materiale didattico verrà fornito dal Docente durante lo svolgimento del corso.