UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

SYLLABUS DEL CORSO

Cell and Molecular Biology II

2627-1-H4104D002-H4104D00202

Obiettivi

Il corso fornisce conoscenze teoriche e formazione pratica su alcune tecniche di biologia molecolare rilevanti per la ricerca medica.
Alla fine del corso pratico, lo studente dovrà essere in grado di:
Comprendere le basi teorico-pratiche dell'isolamento degli acidi nucleici
Padroneggiare il principio della retrotrascrizione
Pianificare e allestire una reazione di PCR
Applicare tecniche di analisi elettroforetica
Analizzare e interpretare i risultati sperimentali

Contenuti sintetici

Introduzione alle applicazioni biotecnologiche in medicina.
Il corso offre un'esperienza pratica incentrata sul workflow completo dell'analisi dell'espressione genica cellulare (RT-PCR). Gli studenti seguiranno passo dopo passo il percorso molecolare che porta dall'estrazione dell'RNA alla visualizzazione del prodotto genico. Il percorso si sviluppa in due fasi laboratoriali correlate: Fase 1: Estrazione e purificazione dell'RNA totale, misurazione quantitativa e qualitativa tramite spettrofotometria (Nanodrop) e reazione di retrotrascrizione per la sintesi del cDNA. Fase 2: Calcolo e preparazione dei campioni per la PCR, programmazione del termociclatore, preparazione del gel di agarosio ed elettroforesi per la separazione e identificazione dei frammenti amplificati, seguita da analisi dei risultati ottenuti.

Programma esteso

FASE 1 – Estrazione dell'RNA totale e Retrotrascrizione

La prima fase è dedicata all'isolamento dell'RNA e alla sua conversione in cDNA, ponendo particolare attenzione alla prevenzione della degradazione da RNasi.
• Introduzione teorica: Il dogma centrale della biologia, le differenze chimico-strutturali tra DNA e RNA, il workflow sperimentale e le norme di sicurezza RNase-free.
• Estrazione dell'RNA: Lisi cellulare, rimozione del DNA genomico (gDNA), purificazione su colonna di silice con digestione enzimatica on-column (DNasi I) ed eluizione.
• Controllo qualità: Quantificazione dell'RNA estratto al Nanodrop e valutazione della purezza tramite i rapporti di assorbanza A260/280 e A260/230.
• Retrotrascrizione (RT): Allestimento delle reazioni con il kit LunaScript RT SuperMix o similare per sintetizzare il cDNA, preparando in parallelo il controllo negativo (RT-).

FASE 2 – Amplificazione tramite PCR ed Elettroforesi
La seconda fase si focalizza sull'amplificazione mirata del gene (es. GAPDH) e sulla separazione fisica dei frammenti biologici per la loro successiva visualizzazione.
• Allestimento della PCR: Ripasso guidato del workflow, calcolo dei volumi e preparazione di una Master Mix comune (Taq polimerasi, primer forward/reverse per GAPDH, dNTPs e tampone).
• Amplificazione termica: Aliquotazione della mix, aggiunta dei templati (cDNA, controlli RT-, positivi e negativi) ed esecuzione dei cicli termici (denaturazione, annealing ed estensione).
• Preparazione del gel: Diluizione del tampone TAE da 50X a 1X, fusione dell'agarosio in microonde (gel all'1.5% w/v) e addizione del colorante intercalante sicuro EuroSafe.
• Corsa elettroforetica e analisi: Caricamento dei campioni e del DNA Ladder, migrazione elettroforetica e visualizzazione dei risultati per verificare la banda attesa.

Prerequisiti

Per frequentare attivamente il laboratorio e comprendere le tappe del workflow sperimentale, si raccomanda il possesso dei seguenti requisiti conoscitivi e teorici:
Conoscenze teoriche di Biologia Molecolare e Genetica: Comprensione approfondita del Dogma Centrale della Biologia (flusso dell'informazione genica da DNA a RNA fino alla sintesi proteica).
Biochimica degli Acidi Nucleici: Nozioni sulle strutture chimiche differenziali dei nucleotidi costituenti il DNA e l'RNA.
Principi di base delle biotecnologie: Conoscenza teorica del funzionamento della Reazione a Catena della Polimerasi (fasi di denaturazione, annealing ed estensione) e della separazione delle molecole mediante carica ed effetto setaccio in un campo elettrico (elettroforesi).
Familiarità fondamentale con i concetti di concentrazione molecolare, soluzioni stock, soluzioni di lavoro e calcoli di diluizione lineare.

Modalità didattica

Attività di laboratorio per un totale di 12 ore svolte in modalità interattiva in presenza

Materiale didattico

Saranno messe a disposizione le diapositive introduttive e i protocolli utilizzati durante lo svolgimento dell'esercitazione.

Periodo di erogazione dell'insegnamento

Primo semestre

Modalità di verifica del profitto e valutazione

Gli argomenti costituiranno parte della prova orale finale, integrata con gli altri moduli del corso (vedi Syllabus del corso integrato).

Orario di ricevimento

Su appuntamento previa email al docente (emanuele.azzoni@unimib.it)

Sustainable Development Goals

SALUTE E BENESSERE | ISTRUZIONE DI QUALITÁ