

**66437-BIOLOGIA SPERIMENTALE APPLICATA (Modulo 2) Espressione Genica
(2 CFU: 8 ore lezioni teoriche e 30 ore esercitazioni)**

Obiettivi formativi del corso:

Descrivere le basi teorico/pratiche della PCR quantitativa Real Time (qPCR) e le differenze rispetto alla PCR end-point
 Descrivere le modalità di allestimento delle reazioni di qPCR
 Descrivere il significato dell'efficienza della qPCR
 Allestire reazioni di qPCR e analisi dei risultati
 Conoscere i principi base per la scelta dei primers e consultazione di una banca dati (NCBI)
 Utilizzo di un software per la scelta dei primers e allineamento di sequenze

Lezioni teoriche

Temi e competenze acquisite	Argomenti	Contenuti specifici	Ore
Lo studente conosce l'organizzazione dell'insegnamento, della verifica e degli argomenti da studiare.	Generalità	Generalità del modulo. Breve descrizione del programma. Modalità di esame Materiale bibliografico consigliato e materiale didattico proposto, modalità di accesso al materiale didattico.	0.5
Lo studente impara le basi teoriche della reazione della PCR, impara i limiti della reazione e i vantaggi della PCR Real Time per la quantificazione dell'espressione genica. Apprende le peculiarità dell'utilizzo dei fluorofori e sonde e ne conosce i limiti e vantaggi	Introduzione alla qPCR	Teoria della PCR quantitativa, chimica del Sybr Green e temperatura di melting	1.5
	Chimiche qPCR. Efficienza qPCR	Utilizzo delle diverse chimiche (Sybr Green e sonde). Efficienza della qPCR: significato, allestimento, calcolo e fattori critici.	2
Lo studente impara quali sono le modalità per quantificare l'espressione genica .	Quantificazione assoluta e relativa	Differenze nelle due modalità di quantificazione dell'espressione genica: teoria ed esempi.	2
Lo studente impara quali sono gli aspetti maggiormente importanti per ottenere un dato affidabile a partire dall'efficienza delle reazioni e dalla scelta dei geni reference	Quantificazione relativa e Geni Reference	Quantificazione dell'espressione genica relativa in gruppi sperimentali. Criteri per la scelta dei geni reference per l'affidabilità dei risultati	2

Esercitazioni (15 ore a gruppo, 2 gruppi)

ESERCITAZIONE IN AULA	Argomenti	Contenuti specifici	Ore
Lo studente conosce quali sono i criteri per la scelta dei primers e impara ad utilizzare le banche dati più comuni per la loro consultazione (ricerca sequenze, ricerca primers, allineamento di sequenze) con esercizi da eseguire	Consultazione banche dati, scelta dei primers, allineamento di sequenze	Presentazione delle Banche dati più comuni per la ricerca di sequenze nucleotidiche (NCBI, Ensemble). Criteri per la scelta dei primers; allineamenti di sequenze. Esercizi pratici. Attività da svolgere nel laboratorio informatico..	3
Lo studente conosce come è stato allestito l'esperimento di cui utilizzerà i campioni per effettuare l'estrazione di RNA totale .Ogni studente avrà un campione da cui estrarre RNA e sarà in grado di capire i principi seguiti per l'estrazione, quantificazione e valutazione della purezza dell'RNA estratto. Lo studente effettuerà la sintesi	Disegno sperimentale e estrazione RNA	Presentazione del disegno sperimentale per la valutazione della espressione genica (quantificazione relativa) e degli step dell'attività pratica. Estrazione RNA totale da tessuto biologico e quantificazione spettrofotometrica.	4
	Qualità RNA e retrotrascrizione	Valutazione della qualità dell'RNA estratto tramite elettroforesi. Sintesi del cDNA. Presa visione del software che si utilizzerà per l'esperimento di qPCR.	4

del cDNA necessario alla reazione di qPCR. Imparerà inoltre quali sono gli aspetti critici nella manipolazione dell'RNA			
Lo studente impara come preparare reazioni di qPCR amplificando geni di interesse e reference. Lo studente impara ad osservare in maniera critica i risultati e ad effettuare la normalizzazione e i calcoli per la rappresentazione dei dati.	Allestimento prova qPCR per uno studio di espressione genica relativa. Elaborazione dei risultati	Allestimento delle reazioni di qPCR con Sybr Green. Preparazione della piastra e corsa su termociclatore. Analisi dei risultati: temperature di melting, ciclo soglia dei campioni. Elaborazione dei dati (lavoro di gruppo) e rappresentazione grafica dei valori di espressione genica.	4