



# UNIVERSITÀ DI PISA

---

## BIOLOGIA MOLECOLARE, BIOCHIMICA CLINICA E METODOLOGIE ANALITICHE

**GIUSEPPE DANIELE**

Anno accademico 2021/22  
CdS TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO (ABILITANTE ALLA PROFESSIONE SANITARIA DI TECNICO DI LABORATORIO BIOMEDICO)  
Codice 017FE  
CFU 9

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
Biochimica clinica	BIO/12	LEZIONI	24	GIUSEPPE DANIELE
Biologia Molecolare	BIO/11	LEZIONI	24	SIMONA PIAGGI
Metodologie e tecniche analitiche in biochimica clinica	MED/46	LEZIONI	24	VALERIO MAINARDI

### Obiettivi di apprendimento

#### *Conoscenze*

Lo studente avrà acquisito conoscenze sulla realtà del laboratorio dal punto di vista organizzativo e soprattutto in merito all'operatività. Verranno approfonditi i principi che stanno alla base dei test di laboratorio impiegati in biochimica clinica.  
Biologia molecolare: lo studente avrà acquisito le conoscenze di base sulla struttura, funzione e manipolazione degli acidi nucleici

#### *Modalità di verifica delle conoscenze*

La verifica delle conoscenze sarà oggetto della valutazione dell'elaborato scritto previsto in sede d'esame.

#### *Capacità*

lo studente sarà in grado di comprendere i principi che stanno alla base dei test eseguiti in laboratorio ed individuare eventuali azioni correttive per risoluzione delle problematiche.

#### *Modalità di verifica delle capacità*

La verifica delle capacità avverrà in aula con attraverso un confronto diretto tra docente e studenti.  
Tale verifica sarà occasione per chiarire eventuali dubbi e risolvere criticità.

#### *Comportamenti*

Lo studente potrà acquisire conoscenze sulle principi che stanno alla base dei test eseguiti in laboratorio di biochimica clinica e biologia molecolare. Sviluppare consapevolezza per risoluzione di problematiche inerenti il corretto svolgimento del proprio lavoro ed attendibilità dei risultati prodotti.

#### *Modalità di verifica dei comportamenti*

La verifica dei comportamenti avverrà in aula con attraverso un confronto diretto tra docente e studenti.  
Tale verifica sarà occasione per chiarire eventuali dubbi e risolvere criticità.

#### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Per seguire il corso non è necessaria alcuna conoscenza iniziale.



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

### Indicazioni metodologiche

Lezioni frontali con ausilio di slide, filmati e quando possibile piccola strumentazione trasportabile.

### Programma (contenuti dell'insegnamento)

#### METODOLOGIE ANALITICHE

1. Cenni di organizzazione di laboratorio. Preanalitica e problematiche inerenti. Esami in regime di urgenza e di routine. Analisi decentrate. Esempi pratici e criticità. Controllo di qualità: Controllo di qualità interno ed esterno. Tipologie di errori. Accuratezza e precisione. Specificità e sensibilità.
2. Ripetibilità e riproducibilità. Controlli interlaboratorio e intralaboratorio. Limiti fiduciarci. Carte di controllo: Levey e Jennings, carta delle somme cumulative. Come allestire un controllo di qualità con pool di sieri; esempio pratico. Regole di Westgard. Azioni correttive in caso di carta fuori controllo. Tecniche di centrifugazione (principi della sedimentazione). Tipologie di centrifughe e di rotor. Centrifugazione differenziale. Centrifugazione in gradiente di densità, isopicnica e zonale. Ultracentrifugazione.
3. Tecniche cromatografiche: Principi generali. Selettività ed efficienza. Numero dei piatti teorici. Cromatografia su colonna, su strato sottile, su carta. Cromatografia d'adsorbimento. Cromatografia di ripartizione. Cromatografia a scambio ionico. Cromatografia ad esclusione. Cromatografia d'affinità. Gascromatografia. HPLC. Cenni sull'emoglobina glicata e descrizione dettagliata dello strumento HPLC 723G8. Interpretazione dei picchi cromatografici.
4. Tecniche immunochimiche: Antigeni ed Anticorpi. Legame antigene-anticorpo. Tecniche di immunoprecipitazione - immunodiffusione radiale semplice ed immunodiffusione doppia. Elisa competitivo, Elisa metodo del doppio anticorpo. RIA - metodi di separazione in fase liquida ed in fase solida. IRMA Cenni di radioprotezione. Immunofluorescenza, diretta ed indiretta.
5. Esempio pratico di come si esegue un test ELISA; significato della curva standard; come interpretare i valori di assorbanza, risalire ad eventuali concentrazioni degli analiti ricercati. Elettroforesi, principi di base. Elettroforesi capillare. Interpretazione dei risultati. Fondamenti di spettrofotometria. Lunghezza d'onda e frequenza. Luce monocromatica e policromatica. Analisi quantitativa e qualitativa. Spettri di emissione e di assorbimento. Trasmissanza, assorbanza e legge di Lambert e Beer. Principi di base. Generalità sugli spettrofotometri.
6. Cenni di microscopia ottica.

#### BIOLOGIA MOLECOLARE

Cenni storici. Gli acidi nucleici, struttura e funzioni. Organizzazione del genoma eucariotico, procariotico e mitocondriale. La replicazione del DNA. Paradosso C, K, N. Sistemi di riparazione del DNA. Tipi di RNA e loro funzioni. La trascrizione. Operone Lac e operone Trp. Regolazione della trascrizione nei procarioti: controllo epigenetico e fattori di trascrizione. Cos'è l'imprinting. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) e supershift. Maturazione dell'mRNA (capping, poliadenilazione, splicing ed editing) e dell'rRNA. Il codice genetico. La traduzione. I miRNA, DROSHA, DICER, RISCH. Metodi di estrazione degli acidi nucleici (fenolo /cloroformio, Tryzol, salting out, kit commerciali con biglie magnetiche e colonnine). La precipitazione del DNA. western blotting cenni Qualità e quantificazione degli acidi nucleici: metodo spettrofotometrico e controllo elettroforetico. Elettroforesi degli acidi nucleici su gel di agarosio e su gel di poliacrilammide. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). L'ibridazione: curva di denaturazione del DNA, temperatura di melting. Tipi di sonde e fattori che influenzano l'ibridazione. Il Southern blotting. Il Northern blotting. La PCR. Touchdown PCR. Nested primer PCR. Come disegnare i primer. Tipi di contaminazioni possibili e organizzazione ottimale di un laboratorio di biologia molecolare. Reverse Transcriptase PCR. Real Time PCR. SYBR green, sonde specifiche (sonde Taq man, sonde FRET, molecular beacon). Analisi del segnale: curve di amplificazione e curve di melting. Quantificazione relativa e assoluta. Cenni sul modulo HRM. Enzimi di restrizione. La transfezione stabile e transiente. Metodi per transfettare. Tipi di vettori per il clonaggio: plasmidi, cosmidi, fagi, cromosoma batterico e di lievito. Il clonaggio del cDNA tramite enzimi di restrizione e topo cloning vector. Fase di screening mediante inattivazione inserzionale con doppio antibiotico e mediante inattivazione della beta-galattosidasi (colonie bianche/blu). Subclonaggio in vettori di espressione. Il sequenziamento del DNA: il metodo di Sanger. I polimorfismi. *Ibridazione in situ*. PCR e RT-PCR in situ. Microarray. Editing genomico: CRISPR/Cas9.

#### BIOCHIMICA CLINICA

Aspetti generali di biochimica clinica. Preparazione del campione biologico. Principali alterazioni del campione biologico e approccio sistematico alla gestione del campione biologico. Bioregolatori: elettroliti e molecole volatili. Alterazione del bilancio idroelettrolitico, significato clinico e metodi di determinazione. Equilibrio acido base nel sangue, disordini acido-base e metodi di determinazione (emogasanalisi). Esame emocromocitometrico: caratteristiche principali e approccio clinico. Anemie, coagulazione e approccio alle principali alterazioni. Vitamine e valutazione delle principali alterazioni. Metabolismo dei Carboidrati. Studio di ipo- ed iperglicemie. Metodi di misurazione della glicemia. Lipoproteine e lipidi. Studio delle dislipidemie e disturbi aterosclerotici. Valutazione biochimica-funzionale del fegato (bilirubina totale diretta e indiretta, AST, GOT, LDH, ALP, ?GT). Valutazione biochimico-funzionale del rene (GRF, PRF, FG, FF, creatinina, acido urico, urea). Analisi delle urine. Aspetti generali dell'endocrinologia: ruolo dell'ipotalamo, Ipofisi, Tiroide, Paratiroide, Gonadi, Surrene, Corticosurrene e Pancreas. Marcatori tumorali: ruolo e utilizzo nella pratica clinica

### Bibliografia e materiale didattico

Materiale didattico fornito: materiale preparato dai docenti.

Biologia molecolare si consiglia in più:

BIOLOGIA MOLECOLARE terza edizione, F. Amaldi, P. Benedetti, G. Pesole e P. Plevani. Casa Editrice Ambrosiana. Distribuzione esclusiva Zanichelli

### Modalità d'esame

Elaborato scritto: Tre domande a risposta aperta per ogni modulo.



*Ultimo aggiornamento 06/10/2021 09:38*