



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

### MICROBIOLOGIA MOLECOLARE

**EMILIA GHELARDI**

Anno accademico 2022/23  
CdS BIOLOGIA MOLECOLARE E  
CELLULARE  
Codice 051FF  
CFU 6

Moduli MICROBIOLOGIA MOLECOLARE	Settore/i MED/07	Tipo LEZIONI	Ore 48	Docente/i MARIAGRAZIA DI LUCA EMILIA GHELARDI
---------------------------------------	---------------------	-----------------	-----------	---

#### Obiettivi di apprendimento

##### *Conoscenze*

Il corso fornisce conoscenze avanzate in microbiologia e biologia molecolare necessarie per affrontare lo studio dei microrganismi in ambito bio-medico, industriale e agrario.

##### *Modalità di verifica delle conoscenze*

Durante l'esame orale, lo studente dovrà essere capace di dimostrare la sua conoscenza del materiale del corso ed essere capace di discutere gli argomenti trattati appropriatamente e con proprietà di espressione.

##### *Capacità*

Acquisizione delle basi teoriche sull'organizzazione, la replicazione e l'evoluzione dei genomi microbici e delle metodologie applicabili alla generazione di ceppi ricombinanti, rilevamento di agenti infettanti ed analisi dei rapporti filogenetici, produzione di nuove molecole e vaccini ricombinanti. Il bagaglio culturale acquisito sarà sufficiente per attività *post-lauream* indirizzate verso una professione presso centri di ricerca.

##### *Indicazioni metodologiche*

Per garantire un buon apprendimento, è consigliata:

- Presenza alle lezioni
- Preparazione di un report orale
- Partecipazione alle discussioni
- Studio individuale
- Studio di gruppo
- Studio con supporto ICT

##### *Programma (contenuti dell'insegnamento)*

Scopo del corso è fornire le nozioni teorico-pratiche di metodologie molecolari microbiologiche. Verranno approfondite: (i) basi molecolari del trasferimento genico e generazione di ricombinanti; (ii) criteri di sistematica molecolare dei microrganismi ed analisi delle loro relazioni filogenetiche; (iii) sistemi molecolari innovativi per la rilevazione di batteri, virus e funghi da campioni biotici e non; (iv) Strategie per la produzione di farmaci antimicrobici e vaccini ricombinanti.

- Informazione genetica nei procarioti. Il mobiloma. Impacchettamento del genoma. Isole di patogenicità. Integroni batterici. Genomica comparativa.
- La mutazione genica. Tipi di mutanti. Base molecolare delle mutazioni. Mutageni chimici e fisici. IS e trasposoni. La mutagenesi per trasposizione. Mutagenesi con cassetta. Caratterizzazione di ceppi mutanti: analisi di stabilità, complementazione.
- I plasmidi. Tipi di plasmidi: funzioni. Replicazione plasmidica e funzioni dell'origine di replicazione. Controllo del numero di copie, specificità d'ospite, gruppi di incompatibilità. Partizione plasmidica. Storia dei vettori plasmidici. Seconda generazione di vettori plasmidici (serie pUC). Plasmidi zero background-TOPO. Plasmidi di espressione. Plasmidi reporter.
- Trasferimento genetico nei batteri. Meccanismi molecolari della coniugazione e trasduzione. La trasformazione naturale nei batteri. Induzione della competenza. Particolari su *B. subtilis* e *S. pneumoniae*. Meccanismi molecolari della trasformazione. Dettagli su *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *V. cholerae*. Trasformazione artificiale: meccanismi. Calcolo dell'efficienza di trasformazione.



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

- Preparazione di DNA plasmidico: crescita e lisi dei batteri, purificazione blanda. Purificazione accurata di plasmidi. Analisi qualitativa e quantitativa del DNA plasmidico.
- Metodi di elettroforesi del DNA. Elettroforesi su gel di agarosio, di poliaccrilamide. Elettroforesi in campo pulsato: principi, apparati, metodologie applicate.
- Valutazione delle interazioni proteina-proteina in vivo ed in vitro.
- Ottimizzazione di una reazione di PCR. RT-PCR, multiplex PCR, nested PCR, RAPD-PCR, PCR quantitativa e realtime PCR.
- Metodi di sequenziamento e interpretazione dei risultati.
- Metodi di classificazione dei batteri. Microbiologia determinativa. Ibridazione DNA/DNA, sequenziamento di specifici geni. Il sistema MALDI-TOF MS per la classificazione e la tipizzazione batterica.
- Metodi di tipizzazione fenotipici: biotipizzazione, sierotipizzazione, tipizzazione fagica. Tipizzazioni tramite amplificazione, MLEE e MLST.
- Procedure diagnostiche: esami diretti ed indiretti. Le metodologie in microbiologia convenzionale. Campioni biologici particolari: liquor, sangue, urine e feci per la ricerca microbiologica.
- Chemioterapia antibiotica: introduzione e criteri di classificazione dei farmaci antibatterici. Antibiotici beta lattamici, glicopeptidi, aminoglicosidi, tetracicline, macrolidi, cloramfenicolo, chinoloni, rifamicine, polimixine, sulfamidici. Meccanismi molecolari dell'antibiotico-resistenza.
- Ruolo degli anticorpi nella risposta immune verso gli agenti infettanti. Risposta primaria e secondaria ad uno stimolo antigenico. Diagnosi sierologica. Concetto di titolo anticorpale. Reazioni di neutralizzazione, precipitazione e agglutinazione. Reazione di fissazione del complemento, EIA, immunofluorescenza, western blotting. Valutazione della risposta immune verso antigeni micobatterici.
- Metodi molecolari in microbiologia diagnostica. Sonde. Tecniche di amplificazione del target: PCR, TMA, SDA. Amplificazione delle molecole sonda: Qbeta replicasi, LCR. Metodi di amplificazione di segnale: branched DNA.
- Vaccini: caratteristiche e tipi. Vaccini convenzionali. Vaccini ricombinanti. Nuove generazioni di vaccini.
- Tecniche di microbiologia ambientale. Tecniche basate sulla coltivazione: arricchimento, coltivazione, identificazione. Tecniche basate sulla marcatura cellulare: colorazioni fluorescenti, live-dead, citofluorimetria. Tecniche di amplificazione per la valutazione della biodiversità microbica. Tecniche metagenomiche. Misurazioni delle attività microbiche nell'ambiente.

### Modalità d'esame

Esame orale finale

Ultimo aggiornamento 06/09/2022 12:52