

Metodologia Diagnostica Molecolare

3° TLB – 1° semestre

A.A. 2015-16

Docente Prof Carla Carducci

Richiami di struttura e funzione delle macromolecole

Mutazioni. Effetti delle mutazioni: la patologia dei vari tipi di alterazione

Cenni di nomenclatura delle mutazioni.

Estrazione DNA e RNA

Fase preanalitica e preparazione del campione. Estrazione acidi nucleici: metodi manuali e commerciali Concentrazione acidi nucleici e valutazione della qualità tramite tecniche spettrofotometriche.

PCR: principi e applicazioni alla patologia molecolare diagnostica

Organizzazione del laboratorio. Rischi di contaminazioni e strategie per evitarli. Controlli di qualità.

Tecniche di indagine di mutazioni note e applicazioni

Uso della PCR nella diagnosi di patologie causate da microdelezioni:

- microdelezioni del cromosoma Y
- analisi delle delezioni esoniche nella Distrofia Muscolare Duchenne/Becker

PCR-ARMS

- Principio del metodo. Sensibilità e specificità. Applicazioni.

Analisi di restrizione

- Enzimi di restrizione. Come le endonucleasi riconoscono una mutazione. Metodi di rilevazione. Sensibilità e specificità. Applicazioni (anemia falciforme, emocromatosi, malattie mitocondriali) Analisi di restrizione con la tecnica "PCR-mediated site direct mutagenesis"

Tecniche di ibridazione

- Principi. Marcatura delle sonde. Southern Blot, Dot/slot blot.

Elettroforesi capillare degli acidi nucleici

Diagnosi molecolare di fibrosi cistica

- Test del sudore e analisi molecolare. Tecniche utilizzate per l'analisi di mutazioni più frequenti (RBD, PCR-ARMS, PCR-OLA), sensibilità e specificità. Analisi di secondo (sequenziamento) e terzo livello (MLPA e analisi dei trascritti)

Real Time PCR: analisi espressione trascritti e analisi di mutazioni puntiformi con HRM. Applicazioni della real time PCR in oncoematologia: valutazione della MMR

Diagnosi molecolare delle trombofilie ereditarie

Analisi di SNPs tramite sequenziamento diretto: Tecnica di Sanger, "Cycle sequencing", analisi e interpretazione dei risultati.