

TLB Rieti - Corso integrato di Tecnologie avanzate nella diagnostica di laboratorio
3° anno 1° semestre, aa 2017-2018
Metodologie di Diagnostica Molecolare
Docente: prof. Carla Carducci

Richiami di struttura e funzione delle macromolecole
Mutazioni. Effetti delle mutazioni: la patologia dei vari tipi di alterazione
Nomenclatura delle mutazioni.

Cenni di bioinformatica

Principali database e ricerca di informazioni. Utilizzo dei principali database
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ensembl.org/>) per le applicazioni di diagnostica molecolare.

Estrazione DNA e RNA

Fase preanalitica e preparazione del campione. Estrazione acidi nucleici: metodi manuali e commerciali. L'automazione nel lab. di biologia molecolare diagnostica. Concentrazione acidi nucleici e valutazione della qualità tramite tecniche spettrofotometriche classiche e micrometodi.

PCR: principi e applicazioni alla patologia molecolare diagnostica

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

Elettroforesi acidi nucleici, metodi classici e semi-automatizzati. Metodi di colorazione

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., Dot/slot blot.

Elettroforesi capillare degli acidi nucleici

Diagnosi molecolare di fibrosi cistica

- Ruolo dell'analisi molecolare, tecniche utilizzate per l'analisi di mutazioni più frequenti (RBD, PCR-ARMS,), sensibilità e specificità.

Real Time PCR : utilizzo del metodo per il genotyping: esempio :diagnosi molecolare delle trombofilie ereditarie

Ricerca di mutazioni non note

Analisi di SNPs tramite sequenziamento diretto: metodi, marcature e funzionamento della strumentazione automatizzata. Lettura degli elettroferogrammi e interpretazione di risultato.

Tecnica MLPA per analisi di delezioni/duplicazioni esoniche presenti in eterozigosi

Cenni sulle tecniche di sequenziamento di nuova generazione.