

INDICE

1. TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE 1

VALENTINO BEZZERRI • GIOVANNI BELLOMO • MONICA BORGATTI • EMANUELA MARI • VINCENZO MATTEI

1.1 COLTURE CELLULARI	2
1.1.1 Introduzione alle colture cellulari	2
1.1.2 Colture cellulari e tissutali animali	3
1.1.3 Le colture primarie	8
1.1.4 Colture 3D e organoidi	12
1.1.5 Metodologie delle colture cellulari eucariotiche	16
1.1.6 Applicazioni cliniche	22
1.2 TECNICHE DI SEPARAZIONE E ANALISI DELLE PROTEINE	25
1.2.1 Estrazione di proteine da cellule e tessuti	25
1.2.2 Tecniche elettroforetiche	28
1.2.3 Tecniche immunoenzimatiche	34
1.2.4 Citofluorimetria	38
1.2.5 Applicazioni cliniche	41

<i>Bibliografia</i>	43
---------------------	----

2. TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE 47

EMANUELA PALDINO • ANTONIO FACCHIANO • ROSELLINA M. MANCINA • STEFANO MARTELLUCCI • TIZIANA SQUILLARO

2.1 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI (DNA E RNA) DA CELLULE, TESSUTI E BATTERI	48
2.1.1 Raccolta e trattamento preliminare del campione	48
2.1.1.1 Principi della lisi cellulare	49
2.1.1.2 Inattivazione delle nucleasi	49
2.1.1.3 Dissociazione dei complessi nucleoproteici	50
2.1.2 Differenze tra estrazione del DNA e dell'RNA	50
2.1.3 Estrazione da cellule eucariotiche in coltura	50
2.1.3.1 Estrazione da tessuti	51
2.1.3.2 Estrazione da batteri	51
2.1.3.3 Metodi classici: estrazione con fenolo-cloroformio	51
2.1.3.4 Metodi moderni: colonne di silice	52
2.1.3.5 Metodi basati su particelle magnetiche	52
2.1.3.6 Protocollo generale di estrazione del DNA da cellule o tessuti	52
2.1.3.7 Protocollo generale di estrazione dell'RNA totale	53
2.1.3.8 Criticità e fonti di errore nell'estrazione	53
2.1.4 Purificazione degli acidi nucleici	53
2.1.4.1 Purificazione per precipitazione alcolica	54
2.1.4.2 Purificazione su colonne di silice	54
2.1.4.3 Purificazione con particelle magnetiche	54
2.1.4.4 Rimozione di contaminanti specifici	54
2.1.4.5 Protocollo generale di purificazione mediante precipitazione con etanolo	55
2.1.4.6 Protocollo generale di purificazione su colonna	55
2.1.5 Conservazione degli acidi nucleici	55

2.2 DNA CROMOSOMIALE	56
2.2.1 Principi dell'isolamento del DNA genomico	56
2.2.1.1 DNA genomico da cellule eucariotiche	56
2.2.1.2 DNA genomico da sangue e tessuti	56
2.2.1.3 Protocollo di isolamento del DNA genomico da cellule eucariotiche	57
2.2.1.4 Fonti di errore	57
2.2.2 DNA plasmidico	57
2.2.2.1 Principio della lisi alcalina	57
2.2.2.2 Importanza della fase di crescita batterica	57
2.2.2.3 Protocollo di isolamento del DNA plasmidico mediante lisi alcalina	58
2.2.2.4 Miniprep, midiprep e maxiprep	58
2.2.2.5 Purezza topologica del plasmide	58
2.2.2.6 Problemi frequenti	58
2.3 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI	59
2.3.1 Gel d'agarosio	60
2.3.2 Sistema per la corsa elettroforetica	61
2.3.3 Metodi di colorazione sul gel	63
2.4 TECNICHE SPETTROSCOPICHE PER L'ANALISI DEL DNA	65
2.4.1 Fondamenti spettroscopici	65
2.4.1.1 Rapporti di purezza	65
2.4.1.2 Effetto ipercromico e stato conformazionale	65
2.4.1.3 Strumentazione	66
2.4.1.4 Protocollo di quantificazione spettrofotometrica	66
2.4.1.5 Limiti della spettrofotometria UV	66
2.4.1.6 Fluorimetria come tecnica complementare	66
2.4.1.7 Controllo qualità pre-elettroforesi e pre-PCR	67
2.4.2 Collegamento con le tecniche elettroforetiche	67
2.5 CENTRIFUGAZIONE E ULTRACENTRIFUGAZIONE	67
2.6 REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)	68
2.6.1 Principi di base	68
2.6.2 Nuova generazione di PCR	70
2.6.2.1 RealTime PCR (quantitative PCR, qPCR)	71
2.6.2.2 Digital PCR (dPCR)	73
2.6.2.3 Digital Droplet PCR (ddPCR)	75
2.6.2.4 Multiplex PCR e qPCR multiplex	75
2.6.2.5 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)	75
2.6.2.6 Isothermal PCR (LAMP, RPA, NASBA, HDA, SDA)	76
2.7 TECNOLOGIE DEL DNA RICOMBINANTE	78
2.7.1 Enzimi di restrizione	78
2.7.2 Ligazione del DNA	79
2.7.3 Vettori plasmidici	79
2.7.3.1 Vettori di clonaggio alternativi ai plasmidi	80
2.7.4 Tecniche di clonaggio	81
2.7.4.1 Espressione genica in cellule procariotiche o eucariotiche	82
2.8 PRINCIPI DI BASE PER L'ANALISI DEL TRASCRITTOMA	83
2.8.1 Southern blotting e Northern blotting	83
2.8.2 Principali differenze tra Southern blotting e Northern blotting	84
2.8.3 Tecnologia microarray	85
2.8.3.1 Principi molecolari della tecnologia microarray	85
2.8.4 Ibridazione in situ	86

2.9 ANALISI IN SILICO DELL'ESPRESSIONE GENICA SU BANCHE DATI PUBBLICHE	89
2.9.1 Strumenti utili per raccogliere informazioni su geni/proteine/molecole di interesse	90
2.9.2 Strumenti utili per approfondire caratteristiche specifiche per le molecole di interesse	91
2.9.3 Analisi di espressione genica o proteica, e correlazioni con la sopravvivenza di pazienti selezionati per patologia e per gene di interesse	94
2.9.4 Strumenti utili all'analisi accurata della struttura/funzione di geni/proteine/farmaci	96
2.10 TECNICHE AVANZATE PER L'EDITING DEL GENOMA: DAGLI RNA ANTISENTO AL SISTEMA CRISPR/CAS9	98
2.10.1 Dalla mutagenesi a CRISPR: storia e rivoluzione dell'editing genomico	98
2.10.1.1 RNA antisense	99
2.10.1.2 MicroRNA (miRNA)	99
2.10.1.3 Oligonucleotidi antisense (ASO)	100
2.10.1.4 Ribozimi e aptameri	101
2.10.1.5 Interferenza a RNA (RNAi)	102
2.10.2 Nucleasi programmabili e il principio di rottura mirata del DNA	103
2.10.3 Il sistema CRISPR/Cas: la rivoluzione dell'editing genomico	104
2.10.3.1 CRISPR/Cas9: struttura e funzione	104
2.11 ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI COME MODELLI DI PATOLOGIE	105
<i>Bibliografia</i>	107

3. METODOLOGIE PER LA RICERCA -OMICA DI NUOVA GENERAZIONE

LORENZA PUTIGNANI • GIUSEPPINA CATANZARO • FEDERICA CONTE • VERONICA FOLLIERO • ALESSANDRA FUSCO • MAURIZIO RONCI

3.1 METODOLOGIE DI HIGH-THROUGHPUT SCREENING: PRINCIPI, TECNOLOGIE E APPLICAZIONI NELLA RICERCA BIOMEDICA	116
3.2 METODOLOGIE DI SEQUENZIAMENTO E ANALISI BIOINFORMATICA SU SINGOLA CELLULA	118
3.2.1 Tecniche di isolamento di singole cellule	118
3.2.2 Preparazione delle sequenze	121
3.2.3 Pipeline Bioinformatiche per l'analisi di dati-omici a singola cellula	123
3.2.4 Strumenti e software di riferimento per l'analisi di dati -omici a singola cellula	124
3.2.5 Potenziali applicazioni e prospettive future	125
3.3 TECNOLOGIE DI TRASCRITTOMICA SPAZIALE: INTEGRAZIONE TRA PROFILAZIONE GENICA E ARCHITETTURA TISSUTALE	127
3.3.1 Overview delle tecnologie di trascrittomica spaziale	127
3.3.2 Pipeline Bioinformatiche per l'analisi di dati di trascrittomica spaziale	132
3.3.3 Strumenti software per i dati spaziali	132
3.4 TECNOLOGIE DI PROTEOMICA SPAZIALE: IMAGING E ANALISI DI DISTRIBUZIONE DI PROTEINE NEI TESSUTI ATTRAVERSO SPETTROMETRIA DI MASSA	133
3.5 TECNOLOGIE DI WHOLE GENOME E METAGENOMICA	136
3.5.1 Whole Genome Sequencing: principi e tecnologie	136
3.5.1.1 Tecnologie e pipeline bioinformatiche per il WGS	136
3.5.2 Metagenomica: principi e tecnologie	140
3.5.2.1 Tecnologie e pipeline bioinformatiche per il sequenziamento metagenomico	140
3.6 TECNOLOGIE DI METABOLOMICA	142
3.6.1 La (meta)metabolomica delle comunità microbiche complesse	142
3.7 TECNOLOGIE DI METAPROTEOMICA	146
3.7.1 La (meta)metaproteomica delle comunità microbiche complesse	146
3.8 APPROCCI BIOINFORMATICI PER L'INTEGRAZIONE DI DATI MULTI-OMICI	147
3.8.1 Background	147
3.8.2 Metodi e tool di integrazione di dati multi-omici	148
3.8.3 Risorse di dati multi-omici	149
<i>Bibliografia</i>	150

4. TECNICHE AVANZATE DI CROMATOGRAFIA**159**

STEFANO DUGHERI • STEFANO TOMASSI • GIANLUCA BARTOLUCCI • GIORGIO MARRUBINI • NICOLA MUCCI • LUCA CALAMAI • CLAUDIO FREZZA

4.1 GAS CROMATOGRAFIA	160
4.1.1 Introduzione	160
4.1.1.1 Breve storia della cromatografia	160
4.1.1.2 Classificazione delle tecniche cromatografiche	161
4.1.1.3 Classificazione in base allo stato fisico della fase mobile	161
4.1.1.4 Classificazione in base al formato	161
4.1.1.5 Classificazione in base al meccanismo di separazione	162
4.1.2 Principi teorici	163
4.1.2.1 Separazione cromatografica: concetti base	163
4.1.2.2 Fase mobile e fase stazionaria	166
4.1.3 Componenti principali dello strumento	168
4.1.3.1 Sistema di iniezione	168
4.1.3.2 Colonna (packed vs capillare)	170
4.1.3.3 Rivelatori (FID, TCD ECD, MS, etc.)	172
4.1.4. Campioni e preparazione	178
4.1.4.1 Tipi di campioni analizzabili (molto volatili, volatili e semivolatili) e trattamento delle matrici (solide, liquide e gassose)	178
4.1.4.2 Preparazione: diluizione, derivatizzazione, estrazione, head-space <i>L'estrazione liquido-liquido</i>	180
4.1.4.3 Tecniche di estrazione in fase solida	183
4.1.4.4 Tecniche di microestrazione in fase solida	185
4.1.4.5 Tecniche di microestrazione in fase liquida	186
4.1.5 Automazione on-line e off-line	187
4.1.5.1 Autocampionatori a due assi	188
4.1.5.2 Autocampionatori a tre assi	188
4.1.5.3 Robotica e antropomorfi	191
4.1.6 Interpretazione dei risultati	193
4.1.6.1 Cromatogramma: tempo di ritenzione, area del picco	193
4.1.6.2 Quantificazione (standard esterni/interni)	194
4.1.6.3 Qualificazione (banca dati, spettro di massa)	195
4.1.6.4 Limiti di rilevazione e quantificazione	196
4.1.7 Tendenze attuali e sviluppi futuri	198
4.1.7.1 Miniaturizzazione e dispositivi integrati	198
4.1.7.2 La gascromatografia bidimensionale (GC x GC)	199
4.1.7.3 Verso la GC "lab-on-chip"	203
4.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA	204
4.2.1 Introduzione	204
4.2.1.1 Storia e sviluppo della cromatografia liquida	204
4.2.2 Principi e tecniche di cromatografia liquida	205
4.2.2.1 Cromatografia in fase normale	205
4.2.2.2 Cromatografia in fase inversa	206
4.2.2.3 Cromatografia ad interazione idrofila	207
4.2.2.4 Cromatografia per affinità	207
4.2.2.5 Cromatografia a scambio ionico	208
4.2.2.6 Cromatografia di esclusione dimensionale	209
4.2.2.7 Cromatografia ad interazione idrofobica	209
4.2.2.8 Cromatografia chirale	210

4.2.3	Il sistema cromatografico	210
4.2.3.1	Composizione di un sistema HPLC	210
4.2.3.2	Pompe e iniettori	212
4.2.3.3	Principali sistemi di rilevazione	215
4.2.4	Parametri operativi e condizioni di separazione	219
4.2.4.1	Capacità di carico della colonna, flussi operativi, tipi di collegamenti e scelta di questi parametri	219
4.2.4.2	Effetti della temperatura sulla separazione	221
4.2.4.3	Scelta del solvente e miscela di solventi	221
4.2.4.4	Ottimizzazione delle condizioni di separazione	223
4.2.5	Cromatografia liquida portatile, trasportabile e mems	225
4.2.5.1	Introduzione alla cromatografia liquida portatile	225
4.2.5.2	Sfide e futuro della cromatografia liquida portatile	227
4.2.6	Spettrometria di massa e cromatografia liquida	227
4.2.6.1	Introduzione alla spettrometria di massa	227
4.2.6.2	Integrazione della spettrometria di massa con la cromatografia liquida	228
4.2.6.3	Applicazioni di LC-MS	230
4.2.7	Applicazioni avanzate e prospettive future	230
4.2.7.1	Cromatografia liquida in ambito farmaceutico, biologico, alimentare e ambientale	230
4.3	CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE AD ALTA PRESTAZIONE (HPTLC)	236
4.3.1	Principi della cromatografia su strato sottile ad alta prestazione	236
4.3.1.1	La cromatografia su strato sottile	236
4.3.1.2	Storia e sviluppo della cromatografia su strato sottile ad alta prestazione	238
4.3.2	Sviluppo metodi-rilevazione	238
	<i>Bibliografia</i>	240



MATERIALE SUPPLEMENTARE : SPETTROMETRIA DI MASSA

Per consultare il materiale supplementare inquadra il QR-CODE e scarica i materiali.

5. TECNICHE SPETTROSCOPICHE 247

CLAUDIO FREZZA • MARTINA BORTOLAMI • VIRGINIA CAMPANI • ALESSANDRA DEL GIUDICE • EGIDIO IORIO

	INTRODUZIONE ALLE TECNICHE SPETTROSCOPICHE DI ASSORBIMENTO MOLECOLARE	248
5.1	INFRAROSSO (IR)	250
5.1.1	Principi teorici	250
5.1.1.1	Modello classico e modello quantistico	250
5.1.1.2	Moti vibrazionali e caratteristiche degli spettri IR	252
5.1.2	Strumentazione	254
5.1.3	Preparazione del campione	256
5.1.3.1	Campioni solidi	256
5.1.3.2	Campioni liquidi	256
5.1.4	Applicazioni	257
5.2	ULTRAVIOLETTO-VISIBILE (UV-VIS)	257
5.2.1	Principi teorici	257
5.2.2	Strumentazione	258
5.2.3	Preparazione del campione e selezione dei parametri per le misure UV-Vis	260
5.2.3.1	Scelta del solvente	260
5.2.3.2	Cuvette	261
5.2.3.3	Ampiezza della banda spettrale	262

5.2.4	Applicazioni	262
5.2.4.1	Analisi qualitative	262
5.2.4.2	Analisi quantitative	263
5.2.4.3	Cinetiche	264
5.2.4.4	Applicazioni biotecnologiche	264
5.3.	ROTAZIONE OTTICA	265
5.3.1	Principi teorici	265
5.3.2	Strumentazione e procedura di analisi	266
5.3.3	Applicazioni	267
5.3.4	Dispersione ottica rotatoria	267
5.4.	DISCROISMO CIRCOLARE (CD)	268
5.4.1	Principi teorici	268
5.4.2	Strumentazione e procedura di analisi	268
5.4.3	Applicazioni	270
5.5.	FLUORESCENZA E FOSFORESCENZA	270
5.5.1	Principi teorici	270
5.5.2	Strumentazione	272
5.5.3	Applicazioni	275
5.5.3.1	Analisi qualitativa	275
5.5.3.2	Analisi quantitativa	276
5.6.	RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)	278
5.6.1	Principi fisici	278
5.6.2	Principi teorici dell'NMR monodimensionale (^1H , ^{13}C , altri nuclei)	280
5.6.2.1	Chemical shift	280
5.6.2.2	Accoppiamento spin-spin (J-coupling)	281
5.6.2.3	Costante di accoppiamento (J)	281
5.6.3	Principi teorici dell'NMR bidimensionale	281
5.6.4	Applicazioni	283
5.7.	SPETTROSCOPIA RAMAN	284
5.7.1	Principi teorici	284
5.7.2	Strumentazione e preparazione del campione	286
5.7.2.1	Sorgenti laser	286
5.7.2.2	Apparato di dispersione e rilevatori	287
5.7.2.3	Micro-Raman e mappatura chimica	288
5.7.2.4	Preparazione del campione e geometria delle misure	288
5.7.2.5	Ulteriori precauzioni	289
5.7.3	Applicazioni	289
5.7.3.1	Analisi di farmaci e formulazioni	289
5.7.3.2	Analisi tissutale, diagnosi e imaging	290
5.7.3.3	<i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i> (SERS)	290
5.7.3.4	Raman in vivo e diagnostica clinica	290
5.8	SPETTROSCOPIA A RAGGI X	291
5.8.1	Principi teorici	291
5.8.1.1	Assorbimento di raggi X	292
5.8.1.2	Fluorescenza a raggi X	292
5.8.1.3	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X	293
5.8.1.4	Diffrazione dei raggi X	293
5.8.2	Strumentazione e preparazione del campione	294
5.8.2.1	Sorgenti di raggi X	294
5.8.2.2	Tomografi	295

5.8.2.3 Spettrometri per assorbimento e fluorescenza di raggi X	295
5.8.2.4 Spettrometri per emissione di fotoelettroni	295
5.8.2.5 Diffrattometri	295
5.8.2.6 Preparazione del campione	296
5.8.3 Applicazioni	296
5.8.3.1 Tomografia	296
5.8.3.2 Analisi elementale e caratterizzazione di materiali biomedici	297
5.8.3.3 Caratterizzazione mediante XRD delle fasi solide di farmaci e principi attivi	297
5.8.3.4 Cristallografia di macromolecole biologiche	298
5.8.3.5 Bio-SAXS	298
5.8.3.6 Spettroscopia XANES/EXAFS in biologia	298
5.9 SINCROTRONE	299
5.9.1 Principi teorici	299
5.9.2 Strumentazione e procedura di analisi	300
5.9.3 Applicazioni	300
5.9.4 Il sincrotrone oggi	300
Bibliografia	301

6. PRINCIPI ED APPLICAZIONI DI ALCUNE TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICHE, TERMICHE E REOLOGICHE 303

VIRGINIA CAMPANI • MARCO BIONDI • MANUELA CURCIO • CLAUDIO FREZZA • LAURA MAYOL • CARLA SERRI

6.1 INTRODUZIONE	304
6.2 DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)	304
6.2.1 Principi fisici del DLS	305
6.2.2 Strumentazione e parametri sperimentali	308
6.2.3 Tipologie di distribuzione e fattori che influenzano la misura	309
6.2.4 Calcolo del diametro idrodinamico e misura dell'indice di polidispersione	310
6.2.5 Applicazioni: liposomi, nanoparticelle, proteine	311
6.3 POTENZIALE Z	312
6.3.1 Il doppio strato elettrico e la stabilità colloidale	312
6.3.2 Principi della misura elettroforetica	316
6.3.3 Preparazione del campione per la misura e interpretazione dei risultati	318
6.3.3.1 Strumentazione e tipologie di celle di misura	318
6.3.3.2 Preparazione del campione	319
6.3.3.3 Interpretazione dei risultati	320
6.3.4 Applicazioni del potenziale zeta nei sistemi colloidali per il <i>drug delivery</i>	320
6.4 CENNI DI REOLOGIA E REOMETRIA	322
6.4.1 Principi di reologia	322
6.4.1.1 Introduzione	322
6.4.1.2 La legge di Newton e i fluidi Newtoniani	322
6.4.1.3 Fluidi non-Newtoniani	324
6.4.1.4 Fluidi tissotropici	325
6.4.2 Principi di reometria: viscosimetri capillare, a sfera cadente e reometro rotazionale	326
6.5 CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSC)	329
6.5.1 Principi termici e curve di transizione	329
6.5.1.1 Introduzione alla DSC	329
6.5.1.2 Transizioni endotermiche ed esotermiche nel termogramma DSC	330
6.5.2 Tecniche di misura, preparazione del campione e interpretazione dei termogrammi	331

6.5.2.1 Strumentazione	331
6.5.2.2 Preparazione del campione e procedure sperimentali	332
6.5.2.3 Analisi dei dati DSC	333
6.5.3 Applicazioni a materiali polimerici e farmaci	333
6.5.3.1 Applicazioni della DSC in ambito farmaceutico	333
6.5.3.2 Analisi del polimorfismo	333
6.5.3.3 Valutazione della purezza	334
6.5.3.4 Valutazione della stabilità termica e della shelf life	334
6.5.3.5 Interazioni farmaco-eccipiente	334
6.5.3.6 Interazioni con membrane e sistemi biologici	335
6.5.3.7 Verifica della coerenza dei lotti	335
6.5.3.8 Caratterizzazione dei materiali polimerici	335
6.6 CALORIMETRIA ISOTERMICA DI TITOLAZIONE (ITC)	335
6.6.1 Principi e parametri termodinamici misurabili	336
6.6.2 Tecniche di misura e studio delle interazioni non covalenti	338
6.6.3 Procedure di titolazione e interpretazione dei termogrammi	339
6.6.4 Applicazioni alla ricerca farmaceutica	339
<i>Bibliografia</i>	340