UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA APPLICATA

MARIA ROSA MAZZONI

Anno accademico	2021/22
CdS	CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE
Codice	022EE
CFU	9

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOCHIMICA APPLICATA	BIO/10	LEZIONI	74	CHIARA GIACOMELLI MARIA ROSA MAZZONI

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze
Lo studente acquisirà conoscenze teoriche e pratiche sulle metodologie e le tecnologie utilizzate nello studio della struttura e della funzione delle macromolecole biologiche.

Modalità di verifica delle conoscenze
Per l'accertamento delle conoscenze acquisite saranno svolti sia una prova in itinere scritta al termine dell'attività di laboratorio (domande a risposta multipla ed esercizi) che un esame finale scritto (tre domande aperte, 2 domande a risposta multipla od 1 domanda a risposta multipla ed 1 esercizio).

Capacità
Al termine del corso lo studente conescerà e sarà anche in grado di utilizzare varie metodiche per lo studio e la purificazione di proteine ed acidi nucleici.

Modalità di verifica delle capacità
Durante la sessione di laboratorio gli studenti, suddivisi in gruppi, utilizzeranno metodiche per determinare la concentrazione proteica in un campione biologico, per frazionare un campione, per determinare l'attività enzimatica e ricavarne i parametri all'equilibrio, per separare le proteine e gli acidi nucleici mediante elettroforesi, e per effettuare saggi immunoenzimatici. Al termine del periodo di laboratorio l'acquisizione delle capacità pratiche verrà valutata mediante tests a risposta multipla e/o brevi relazioni.

Comportamenti
Lo studente acquisirà le conoscenze ed i comportamenti atti a permettergli di svolgere attività di analisi e di ricerca in un laboratorio biochimico.

Modalità di verifica dei comportamenti
Durante la sessione di laboratorio sarà valutato il grado di accuratezza e precisione dell'attività svolte.

Prerequisiti (conoscenze iniziali)
Sono richieste conoscenze teoriche di biologia cellulare, di chimica e chimica organica, e di biochimica.

Indicazioni metodologiche

- Frequenza alle lezioni teoriche in aula
- Frequenza all'esercitazioni in aula
- Frequenza all'attività di laboratorio
- Studio individuale

La frequenza è obbligatoria (60-70% delle lezioni; 30% delle lezioni per studenti lavoratori/genitori)

UNIVERSITÀ DI PISA

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Richiami sulla struttura delle cellule eucariotiche e procariotiche. Le colture di cellule eucariotiche, loro separazione, analisi e conteggio.
LE PROTEINE: 1) Estrazione delle proteine da tessuti animali e culture cellulari. Allestimento di omogenati d'organo, di lisati cellulari; frazionamento dei componenti subcellulari. 2) Determinazione quantitativa delle proteine totali: dosaggio dell'azoto proteico, metodi del biureto, di Folin-Ciocalteau, di Lowry; spettrofotometria diretta con applicazione delle formule di Kalckar-Warburg, turbidometria, nefelometria. 3) Determinazione qualitativa e quantitativa delle proteine mediante saggi di attività biologica: a) saggi di attività enzimatica «in vitro», criteri orientativi per la scelta delle condizioni di saggio (temperatura, pH, concentrazione dell'enzima e del substrato, cofattori, tempi di incubazione), calcolo delle unità e dell'attività specifica; b) determinazione immunologica delle proteine: generalità sugli anticorpi mono- e policlonali; saggi di immunodiffusione, saggi radioimmunologici (RIA), saggi immunoenzimatici (ELISA). 4) Tecniche radioisotopiche: rilevazione e misura della radioattività; utilizzo di molecole radiomarcate in biochimica; studio di proteine di legame mediante ligandi radiomarcati (studi di legame all'equilibrio e studi di competizione). 5) Metodi di purificazione delle proteine: precipitazione frazionata al calore, al punto isoelettrico, con solventi organici e sali neutri. Centrifugazione frazionata in mezzo omogeneo ed in gradienti di densità continui e discontinui. Tecniche cromatografiche (gel filtrazione, a scambio ionico, di affinità, cromatografia liquida ad alta pressione); tecniche elettroforetiche: elettroforesi su gel di poliacrilammide (in condizioni native e denaturanti), immunoelettroforesi, elettrofocusing, elettroforesi bidimensionale. Criteri di purezza delle preparazioni proteiche: cristallizzazione, ultracentrifugazione, disc-elettroforesi, curve di solubilità. Ingegnerizzazione di proteine per la purificazione. 6) Determinazione della struttura proteica: analisi di aminoacidi; determinazione della struttura primaria.
GLI ACIDI NUCLEICI 1) Composizione e struttura degli acidi nucleici: DNA e RNA. 2) Isolamento e separazione degli acidi nucleici: separazione dalle macromolecole proteiche mediante fenolizzazione, frazionamento degli acidi nucleici per centrifugazione in gradienti di densità autoformati, per cromatografia ed elettroforesi in gel di agarosio e poliacrilammide. 3) Il comportamento del DNA in soluzione, la denaturazione del DNA, la renaturazione, il punto di fusione. Determinazione spettrofotometrica quantitativa del DNA e RNA. 4) Manipolazione degli acidi nucleici: gli enzimi di restrizione.
TECNICHE AVANZATE: 1) Fluorimetria e spettrofluorimetria: applicazioni. 2) Chemiluminescenza e bioluminescenza: applicazioni. 3) Risonanza Magnetica Nucleare (NMR): applicazioni in biologia. 4) Spettrometria di massa: applicazione allo studio delle proteine. 5) Risonanza plasmonica di superficie (SPR): applicazione per lo studio dell'interazione delle biomolecole.
ESERCITAZIONI PRATICHE DI LABORATORIO: 1) Saggi di attività enzimatica: cinetica enzimatica dell'adenosina deaminasi; dipendenza della cinetica enzimatica dal pH; dosaggio dell'enzima lattico deidrogenasi. 2) Frazionamento subcellulare. 3) Determinazione quantitativa delle proteine totali: metodo del biureto e di Bradford. 4) Separazione elettroforetica di proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti. Western-blot. 5) Separazione elettroforetica del RNA totale su gel di agaroso. 6) Immunodosaggio: ELISA di tipo competitivo od a sandwich.

Bibliografia e materiale didattico

Testi consigliati

- D.L. Nelson, M.M. Cox: PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER. Zanichelli 2018;
- C. De Marco, C. Cini: PRINCIPI DI METODOLOGIA BIOCHIMICA. Piccin 2009;
- **M.C. Bonaccorsi Di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo: METODOLOGIE BIOCHIMICHE. Zanichelli, 2019**;
- **M. Maccarone METODOLOGIE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI. Zanichelli, 2019.**

Modalità d'esame

L'esame è composto da:

- Una prova in itinere al termine dell'attività di laboratorio che verterà su argomenti affrontati durante tale attività. Tale prova sarà scritta con tests a risposta mutipla ed esercizi. In alternativa tale prova può essere svolta durante l'esame finale.
- Una prova finale scritta sarà costituita da tre domande aperte su argomenti svolti durante il corso, una domanda a risposta multipla o similare su argomenti riguardanti le tecnologie avanzate, ed eventaulmente una domanda in cui si richiede di svolgere un calcolo che potrebbe essere necessario lavorando in un laboratorio di biochimica.

Ultimo aggiornamento 21/09/2021 14:25