UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA APPLICATA

CHIARA GIACOMELLI

Academic year	2023/24
Course	CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE
Code	022EE
Credits	9

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
BIOCHIMICA APPLICATA	BIO/10	LEZIONI	84	CHIARA GIACOMELLI REBECCA PICCARDUCCI NICOLE ZILIOTTO

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze
Al termine del corso lo studente sarà in grado di conosce e comprende i principi e le applicazioni delle metodologie di indagine biochimica sia per la caratterizzazione della struttura e della funzione delle macromolecole biologiche, sia per la conoscenza dei meccanismi dei processi metaboliche dei fenomeni biologici, anche in rapporto all'azione dei farmaci e dei dispositivi diagnostici per analisi biologiche.
Le attività di laboratorio saranno finalizzate ad avviare gli studenti all'approccio sperimentale e a condurre in modo corretto un esperimento permetterà allo studente di acquisire competenze teorico/pratiche di alcune metodologie applicate nella sperimentazione biochimica e sviluppare autonomia nell'impostazione degli esperimenti e della raccolta dati.

Modalità di verifica delle conoscenze
Per l'accertamento delle conoscenze acquisite sarà valutato, durante la discussione in aula e in sede d'esame scritto, la conoscenza dei principali contenuti del corso. Sarà inoltre valutato l'utilizzo di una terminologia appropriata. A tal fine la partecipazione alle lezioni in aula sarà valutata positivamente.

Capacità
Il corso si prepone di dare allo studente la consapevolezza delle operazioni sperimentali proprie delle metodiche utilizzate nella ricerca biochimica per lo studio di struttura e funzione delle macromolecole biologiche. Inoltre, al termine del corso lo studente avrà acquisito la capacità di assumere un comportamento responsabile e critico nello svolgimento delle attività di laboratorio.

Modalità di verifica delle capacità
Le capacità saranno verificate tramite esercitazioni in laboratorio, eventuali prove in itinere da concordare durante il corso, e nella prova scritta finale. In particolare sarà valutato: la capacità di comprensione dei metodi di analisi; autonomia nello svolgimento delle esercitazioni pratiche tramite anche il rispetto delle normative di sicurezza; capacità di interpretare criticamente i risultati di laboratorio.

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
Le lezioni saranno tenute in lingua italiana tramite lezioni frontali in aula. Saranno svolte delle ore di esercitazione in aula. La frequenza ai laboratori didattici è obbligatoria. Le tematiche affrontate in aula dovranno essere approfondite tramite lo studio individuale dello studente.
La frequenza è obbligatoria (60-70% delle lezioni; 30% delle lezioni per studenti lavoratori/genitori)

UNIVERSITÀ DI PISA

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Parte teorica (7 CFU)

Introduzione - Principii della ricerca biochimica. Sperimentazione biochimica.

Tecniche preparative

Colture cellulari eucariotiche: strumentazione di base di un laboratorio di colture cellulari (cappe a flusso laminare, incubatori). Colture cellulari primarie e linee cellulari. Terreni di coltura e tecniche di coltura. Tecniche di trasfezione cellulare

Preparazione di campioni da tessuti biologici: Scelta del tampone. Omogeneizzazione (scelta delle metodiche e dei media). Richiami di spettroscopia UV-Vis, legge di Lambert Beer, strumentazione, cromofori. Dosaggi colorimetrici per la determinazione del contenuto proteico di un campione biologico.

Fluidi biologici e Anticorpi: caratteristiche dei fluidi biologici. Struttura degli anticorpi, reazione antigene-anticorpo. Produzione di antisieri, anticorpi monoclonali. Metodi per dosare anticorpi e antigeni: saggi di immunodiffusione, saggi radioimmunologici (RIA), saggi immunoenzimatici (ELISA).

Tecniche centrifugative (principii della sedimentazione; velocità, RCF, coefficiente di sedimentazione e tempi di sedimentazione). Centrifughe e rotori. Centrifugazione differenziale: separazione e analisi di frazioni subcellulari. Centrifugazione in gradiente di densità, zonale e isopicnica. Applicazioni: separazione di cellule, organelli subcellulari, proteine, acidi nucleici. Valutazione della resa e dell'arricchimento: “marcatori” subcellulari.

Metodiche di purificazione delle proteine: precipitazione frazionata; precipitazione con solventi e polimeri organici; precipitazione al calore. Dialisi ed ultrafiltrazione: principii ed applicazioni. Metodi di purificazione dai corpi di inclusione. Criteri di purezza delle preparazioni proteiche: cristallizzazione, ultracentrifugazione, disc-elettroforesi, curve di solubilità. Ingegnerizzazione di proteine per la purificazione

Tecniche elettroforetiche

Principii generali, fattori che influenzano la mobilità elettroforetica. Elettroforesi su gel: PAGE, PAGE-SDS. Metodi di rivelazione e valutazioni quantitative. Focalizzazione isoelettrica (IEF). Elettroforesi bidimensionale. Metodi di rivelazione e valutazioni quantitative. Blotting - Western blotting nello studio delle proteine: applicazioni biochimiche e diagnostiche.

Tecniche cromatografiche

Principii generali, risoluzione e piatti teorici. Tipologie di cromatografia su colonna. Cromatografia liquida ad alta pressione: HPLC.

Dosaggi enzimatici

Metodi di purificazione di enzimi. Richiami di cinetica enzimatica, ed equazione di Michaelis-Menten. Determinazione dell'attività specifica e valutazione della resa di purificazione. Determinazione sperimentale della velocità delle reazioni catalizzate da enzimi: Dosaggio dell'attività enzimatica. Studio dell'inibizione enzimatica: inibitori competitivi, non competitivi e misti. Grafico di Lineweaver-Burk determinazione della Ki.

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).

Tecniche spettrofluorimetriche

Richiami di spettrofluorimetria, resa quantica, decadimento di fluorescenza, strumentazione, cromofori intrinseci ed estrinseci. strumentazione. Uso delle tecniche fluorimetriche nell'analisi qualitativa e quantitativa (linearità della relazione tra l'intensità di fluorescenza e la concentrazione della soluzione, effetto di filtro interno). Applicazione sullo studio dell’interazione delle proteine-proteina, ac nucleico e lipidi (es FRET) e dell’aggregazione proteica (es. ThT)

Tecniche di microscopia

Microscopia ottica e microscopia elettronica. applicazioni biologiche delle tecniche in fluorescenza per la determinazione della localizzazione e delle interazioni molecolari.

Tecniche di spettrocopia di assorbimento in luce polarizzata

Dicroismo circolare: principi di base ed applicazioni per lo studio della struttura della proteine (determinazione del contenuto di alfa elica e foglietto beta). Principi di base del light-scattering e suo utilizzo per lo studio delle dimensioni di particelle (citofluorimetro). Risonanza plasmonica di superficie (SPR): applicazione per lo studio dell’interazione delle biomolecole.

Biologia strutturale

Applicazioni della spettrometria di massa allo studio di macromolecole biologiche. Esempi di applicazione della massa per lo studio/identificazione di un polipeptide. Uso della spettroscopia di massa per la determinazione delle modificazioni indotte sulle proteine: grado di fosforilazione, alchilazione/acetilazione di residui aminoacidici, studio dell'interazione con farmaci ecc. Determinazione della sequenza di proteine (sequenziamento di Edman e mediante spettrometria di massa). Accenni su cristallografia a raggi X, NMR, crio-microscopia elettronica e TEM applicata alla struttura delle macromolecole biologiche.

Tecniche elettrochimiche

Elettrodo ad ossigeno; studi sulla respirazione mitocondriale. Biosensori.

ESERCITAZIONI PRATICHE DI LABORATORIO (2 CFU)

1) Saggi di attività enzimatica: cinetica enzimatica dell’adenosina deaminasi; 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) Purificazione di proteine tramite SEC. 6) Immunodosaggio: ELISA.

Bibliografia e materiale didattico

Testi consigliati

- K.Wilson e J.Walker - Biochimica e Biologia Molecolare: Principi e tecniche – NUOVA EDIZIONE (VIII), 2019
- M. Maccarone METODOLOGIE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI. Zanichelli, 2019.
- M.C. Bonaccorsi Di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo: METODOLOGIE BIOCHIMICHE. Zanichelli, 2019;

Modalità d'esame

L'esame è costituito da una prova finale scritta con domande aperte e/o a risposta multipla su argomenti svolti durante il corso, ed

eventualmente delle domande in cui si richiede di svolgere un calcolo che potrebbe essere necessario lavorando in un laboratorio di biochimica.
La possibilità di effettuare una/due prove in itinere sui contenuti teorici sarà valutata con gli studenti durante il corso.
L'esame di fine corso mira a verificare e valutare il raggiungimento degli obiettivi didattici:
- conoscere i principi di base delle principali metodologie biochimiche utilizzate nella separazione, identificazione, caratterizzazione ed analisi di biomolecole;
- essere in grado di disegnare o di valutare protocolli sperimentali impiegati nella ricerca biochimica.
Per la parte pratica di laboratorio sarà effettuata una prova scritta contestuale alla prova finale sulla parte teorica del corso che verterà su argomenti affrontati durante tale attività. Tale prova sarà scritta con test a risposta multipla o aperta ed esercizi. La possibilità di effettuare una prova in itinere sui contenuti pratici sarà valutata con gli studenti durante il corso.
Lo studente dovrà ottenere una votazione di almeno 18/30 in entrambe le prove e il voto finale sarà definito dalla media pesata tra il voto del modulo di laboratorio e quello della prova scritta.

Ultimo aggiornamento 21/09/2023 18:39