



UNIVERSITÀ DI PISA BIOCHIMICA APPLICATA

MARIA ROSA MAZZONI

Anno accademico
CdS

2016/17
CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE
022EE
9

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOCHIMICA APPLICATA	BIO/10	LEZIONI	84	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 che un esame finale.

Capacità

Al termine del corso lo studente conoscerà 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 delle attività svolte.

Prerequisiti (conoscenze iniziali)

Sono richieste conoscenze teoriche di biologia cellulare, di chimica e chimica organica, e di biochimica delle macromolecole.

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 biuretto, di Folin-Ciocalteu, 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



UNIVERSITÀ DI PISA

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 biuretto 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 2010;
- C. De Marco, C. Cini: PRINCIPI DI METODOLOGIA BIOCHIMICA. Piccin 2009;
- M.C. Bonaccorsi Di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo: METODOLOGIE BIOCHIMICHE. Casa Editrice Ambrosiana 2012;
- A.J. Ninfa, D.P. Ballou: METODOLOGIE DI BASE PER LA BIOCHIMICA E LA BIOTECNOLOGIA. Zanichelli, 2000;
- B. Mondovì : BIOCHIMICA APPLICATA. Idelson 1977.

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 multipla e domande aperte.
- 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 eventualmente una domanda in cui si richiede di svolgere un calcolo che potrebbe essere necessario lavorando in un laboratorio di biochimica.

Ultimo aggiornamento 14/11/2016 17:27