



UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA APPLICATA

GINO GIANNACCINI

Academic year	2017/18
Course	FARMACIA
Code	030EE
Credits	6

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
BIOCHIMICA APPLICATA	BIO/10	LEZIONI	58	LAURA BETTI ELEONORA DA POZZO GINO GIANNACCINI

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Metodi di coltura delle cellule

Citofluorimetro

Metodi di rottura delle cellule:

Omogenizzazione, French Press, sonicazione, metodi meccanici, metodi enzimatici e con l'uso di abrasivi. Importanza e contenuti dei principali tamponi di estrazione.

Tecniche di centrifugazione:

Principi di base della sedimentazione, tipi di rotori (angolo fisso, alloggiamento verticale, bracci oscillanti, elutriatori). Tipi di centrifughe.

Tecniche di sedimentazione (differenziale, in gradiente di densità, per elutriazione). Materiali per gradienti. Ultracentrifughe: generalità di utilizzo.

Purificazione e caratterizzazione delle proteine:

Proprietà ioniche degli aminoacidi e delle proteine native e in soluzione. Punto isoelettrico. Stabilità (termica e in presenza di pH variabile). Criteri di solubilità e loro utilizzo per la purificazione delle proteine (frazionamento con sali, solventi organici, PEG, precipitazione isoelettrica). Utilizzo della metodi di quantificazione delle proteine in soluzione: spettrofotometria ottica e all'ultravioletto per la determinazione della concentrazione di campioni proteici, colorazione di Bradford, Lowry.

Tecniche elettroforetiche e di trasferimento su carta, immunoblotting analysis:

Principi generali dell'elettroforesi su matrici solide. Elettroforesi su Gel di agarosio e poliacrilammide (PAGE). Matrici per elettroforesi e loro utilizzo. Elettroforesi su SDS-PAGE. Tipi di tamponi utilizzati per l'analisi PAGE: continui e discontinui. Isoelettrofocusing (IEF) e gel bidimensionali: criteri generali. Generalità sull'uso di gel bidimensionali e il loro utilizzo in proteomica e spettrometria di massa (MALDI-TOF). Western blotting. Tipi di membrane utilizzate e criteri di utilizzo. Rivelazione delle proteine tramite colorazione su gel: Comassie brilliant Blue, Silver staining. Rivelazione delle proteine: tramite colorazione su membrana (Ponceau S) o con anticorpi coniugati ad enzimi o fluorocromi (immunodetection)

Tecniche cromatografiche:

Principi generali di cromatografia (Risoluzione, efficienza, capacità), cromatogramma. Cromatografia su colonna (setaccio molecolare, a scambio ionico, affinità, idrofobicità, HPLC, FPLC): generalità d'utilizzo.

Radio-isotopi:

Natura della radioattività: Tipi di radioattività. Decadimento. Unità di radioattività.

Sicurezza. Rivelamento e misura della radioattività: Tubi di Geiger-Muller. Contatori a scintillazione liquida.

Autoradiografia. Uso in biochimica dei radioisotopi. Traccianti.

Produzione di anticorpi:

Anticorpi policlonali. Anticorpi monoclonali. Tecniche di produzione degli anticorpi.

ESERCITAZIONI PRATICHE:

- 1) Frazionamento subcellulare: isolamento della frazione nucleare e mitocondriale da omogenato di tessuto muscolare bovino.
- 2) Determinazione quantitativa delle proteine totali: metodo del biuretto.
- 3) Saggi di attività enzimatica: dosaggio dell'enzima lattico deidrogenasi in sovrantante di tessuto muscolare bovino.
- 4) Saggi di attività enzimatica: cinetica enzimatica dell'adenosina deaminasi determinazione dei parametri Km e Vmax;
- 5) Saggi di attività enzimatica: cinetica enzimatica dell'adenosina deaminasi determinazione della dipendenza dal pH.
- 6) Separazione elettroforetica di proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti.

Testi consigliati

A.L. Lehninger: BIOCHIMICA. Zanichelli II

A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox: PRINCIPI DI BIOCHIMICA. Zanichelli

B. Mondovì: BIOCHIMICA APPLICATA. Idelson

Wilson K, Goulding K. METODOLOGIE BIOCHIMICHE Raffaello Cortina Editore.

