

# SCHEDA DOCENTE PROGRAMMA - A.A. 2017-2018

Programma dell'insegnamento di:

## “METODOLOGIE BIOCHIMICHE”

I modulo del Corso Integrato di “TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO”

del corso di studio: BIOTECNOLOGIE

NOMERO DI CREDITI: 6

SEMESTRE : I

COGNOME E NOME DOCENTE: D'ALESSANDRO ANNA MARIA

SSD: BIO/10

ORARIO DI RICEVIMENTO: MARTEDI' E MERCOLEDI' DALLE 12 ALLE 13.30 e per appuntamento negli altri giorni

SEDE PER IL RICEVIMENTO: studio B4.34; terzo piano, corridoio B, Coppito II

N. TELEFONO (eventuale): 0862 433454

E-MAIL: [anna.dalessandro@cc.univaq.it](mailto:anna.dalessandro@cc.univaq.it)

1	<b>Obiettivi del Corso</b>	Il modulo di <b>Metodologie Biochimiche</b> del Corso Integrato di <b>Tecniche di Laboratorio Biomedico</b> si propone di fornire agli studenti le basi teoriche delle diverse metodologie per la purificazione delle macromolecole biologiche e per la loro caratterizzazione strutturale e funzionale, con particolare riferimento alle strategie applicate allo studio delle proteine. Il modulo prevede la frequenza di 16 ore di laboratorio (frequenza obbligatoria). Durante le attività di laboratorio gli studenti applicheranno le tecniche cromatografiche, elettroforetiche, spettrofotometriche, oggetto delle lezioni teoriche per la caratterizzazione di macromolecole di interesse biologico.
2	<b>Contenuti del corso e gli esiti di apprendimento</b>	<b>Metodologie della Ricerca scientifica.</b> Disegno sperimentale. Sistemi e Unità di misura. <b>Richiami di chimica delle soluzioni.</b> Sistemi Tampone; Forza Ionica di una soluzione; detergenti <b>Strategie per la purificazione delle proteine.</b> Tecniche preparative e tecniche analitiche. Procedure di omogeneizzazione dei tessuti e lisi

		<p>cellulare. Tecniche di frazionamento cellulare. Tecniche centrifugative. Centrifugazione differenziale e in gradiente di densità. Procedure basate sulla solubilità differenziale di proteine: <i>salting out</i>, precipitazione con solventi organici, precipitazione isoelettrica. Dialisi.</p> <p><b>Tecniche cromatografiche:</b> principi generali. Matrici, fasi stazionarie e fasi mobili nei diversi tipi di cromatografia. Sistemi cromatografici a bassa pressione su colonna: cromatografia a scambio ionico, cromatografia ad esclusione molecolare, cromatografia per interazioni idrofobiche, cromatografia di affinità. Sistemi cromatografici ad alta pressione (HPLC): cromatografia in fase inversa. Gas cromatografia.</p> <p><b>Tecniche elettroforetiche:</b> principi generali. Elettroforesi zonale: apparecchi per i diversi supporti utilizzati (cellulosa, acetato di cellulosa, gel di poliacrilamide e gel di agarosio). Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilamide in condizioni native, elettroforesi denaturante in presenza di sodiododecilsolfato (SDS-PAGE), elettroforesi discontinua ed elettroforesi in gradiente di poliacrilamide. Isoelettrofocalizzazione. Elettroforesi bidimensionale. Rivelazione colorimetrica mediante Coomassie Brilliant Blue. Elettroforesi su gel di agarosio: caratteristiche, apparecchi e applicazioni. Western blot.</p> <p><b>Fotometria e Spettrofotometria UV/VIS:</b> Assorbanza e trasmittanza. Fotometri e spettrofotometri (a singolo raggio, a doppio raggio, a fotodiodi): caratteristiche e principi di funzionamento. Determinazione qualitativa e quantitativa. Metodi di determinazione della concentrazione delle proteine: Metodo di Bradford. Determinazione dell'attività enzimatica.</p> <p><b>Fluorimetria:</b> Analisi in fluorescenza. Spettrofluorimetro: caratteristiche e principi di funzionamento. Determinazione qualitativa e quantitativa. Tecniche che utilizzano sonde fluorescenti: Fluorescenza e quenching di fluorescenza, Anisotropia di fluorescenza, Energy transfer e FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), imaging, immunofluorescenza.</p> <p><b>Purificazione delle proteine:</b> considerazioni generali. Monitoraggio del processo di purificazione mediante determinazione del contenuto totale di proteine, saggi dell'attività enzimatica, determinazione di attività specifica, fattore di purificazione e resa. Utilizzo di un software didattico di simulazione della purificazione di proteine.</p> <p><b>Caratterizzazione delle proteine:</b> Determinazione del PM delle proteine mediante cromatografia per gel filtrazione ed elettroforesi in SDS. Determinazione del punto isoelettrico delle proteine mediante isoelettrofocalizzazione. Determinazione della concentrazione proteica. Metodi diretti e indiretti.</p> <p><b>Spettrometria di massa.</b></p> <p><b>Tecniche immunochimiche:</b> tecniche di immunoprecipitazione, tecniche ELISA, Immunoistochimica, Western blotting.</p> <p><b>Analisi delle interazioni molecolari.</b></p> <p><b>Studi di ligand binding.</b> interazioni proteina-proteina; proteina - piccole molecole.</p>
3	<p><b>Conoscenze di base richieste e attività di apprendimento</b></p>	<p><b>Prerequisiti:</b> il possesso di competenze delle seguenti materie: Chimica Generale e inorganica, Chimica organica e Fisica e il possesso di conoscenze inerenti la struttura base delle proteine e degli enzimi. Tali conoscenze sono fornite attraverso l'insegnamento di Biochimica.</p> <p><b>Attività di apprendimento:</b></p> <p><b>LEZIONI TEORICHE</b> con ausilio di slides, fornite anche come materiale di studio.</p> <p><b>ESERCITAZIONI PRATICHE di LABORATORIO</b> sulle materie del corso che si</p>

		svolgeranno in laboratorio al termine delle lezioni teoriche, dove gli studenti familiarizzeranno con le comuni attrezzature e tecniche di laboratorio. Saranno richiamate le basi teoriche delle tecniche adottate, al fine di verificarne l'applicazione. Si tratterà di: soluzioni tampone per sistemi biologici e misurazione del pH; tecniche cromatografiche per la separazione di proteine; spettrofotometria; elettroforesi di proteine; saggi per la quantificazione della concentrazione proteica.
4	<b>Metodi e criteri di valutazione e verifica</b>	L'esame si svolge nelle forme stabilite dal Regolamento Didattico di Ateneo. L'esame è orale e si basa sulla valutazione delle conoscenze acquisite dallo studente, con particolare riguardo alla capacità di fare collegamenti fra i vari argomenti trattati. Trattandosi di un corso metodologico, lo studente deve dimostrare di saper applicare quanto studiato alla soluzione di problemi e/o indagini che vengono normalmente svolte in un laboratorio di ricerca. Nella valutazione della prova e nell'attribuzione del voto finale si terrà anche conto della capacità di analisi, di sintesi e della padronanza di espressione. Il voto è espresso in trentesimi, con eventuale lode. Il superamento dell'esame presuppone il conferimento di un voto non inferiore ai diciotto/trentesimi. Il voto attribuito al modulo in esame sarà inviato al Presidente della commissione per la verbalizzazione finale sul libretto elettronico e la relativa acquisizione dei crediti.
5	<b>Materiale Didattico (Testi di riferimento)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keith Wilson John Wolker <b>Metodologia Biochimica: le tecniche biochimiche in laboratorio</b>. Ed. Raffaello Cortina</li> <li>• Bonaccorsi di Patti, Contestabile, Di Salvo, <b>Metodologie biochimiche</b>. Ed. Casa Editrice Ambrosiana.</li> <li>• Reed, Holmes, Weyers &amp; Jones, <b>Metodologie di base per le scienze biomolecolari</b>. –Ed. Zanichelli</li> </ul>