

LABORATORIO DI METODOLOGIE BIOCHIMICHE
corso integrato di *Biochimica Funzionale con Elementi di Laboratorio*

Codice Disciplina : BT0070 Codice Corso integrato : BT068	Settore: BIO/10	N° CFU: 4
Docente: Baldanzi Gianluca	Ore : 40	Corso di Laurea : Biotechnologie Anno : II Semestre : I

Obiettivo del modulo

Acquisire le conoscenze teoriche e pratiche di base richieste per il lavoro in un laboratorio. Acquisire la conoscenza teorica e pratica delle tecniche biochimiche di base:

- preparazione e frazionamento del campione (lisi cellulare, omogenizzazione, centrifugazione)
- tecniche per la separazione di campioni complessi (tecniche cromatografiche applicate a lipidi e proteine, salting out, elettroforesi)
- tecniche per l'analisi della concentrazione di molecole biologiche (misura concentrazione delle proteine ed eventualmente di altre molecole di interesse biologico)
- misura dell'attività enzimatica di un campione e suo uso per la purificazione di un enzima
- utilizzo di enzimi per la quantificazione di composti ed applicazioni cliniche (glicemia, uricemia, colesterolemia)

Conoscenze ed abilità attese

Nozioni chimiche di base (peso molare, concentrazione, molarità).
Conoscenze delle norme di base per la sicurezza in laboratorio (significato delle frasi di rischio, rischi chimici e biologici, dispositivi di protezione).
Conoscenza della natura dei principali composti biologici (molecole organiche di interesse biologico, classi di macromolecole e loro proprietà).
Concetti di base di enzimologia.

Programma del corso

Attrezzature di base in un laboratorio biochimico: vetreria e suo utilizzo, plastiche e suo utilizzo, bilance e loro utilizzo, pH metri. Misura di volumi, misura di piccoli volumi con pipette Gilson.
Come preparare soluzioni a concentrazione e pH noti nella teoria e nella pratica. Teoria della centrifugazione e tecniche di centrifugazione preparativa per il frazionamento di composti biologici. Utilizzo delle centrifughe e forza centrifuga.
Tecniche di preparazione del campione per analisi biochimiche (omogenizzazione, lisi con detergenti). Estrazione con solventi e precipitazione selettiva, loro applicazione al frazionamento dei composti biologici (estrazione di lipidi, salting out di proteine).
Principi di spettrofotometria (assorbimento e fluorescenza) e suo utilizzo per la quantificazione di analiti biologici. Caratteristiche di uno spettrofotometro ed un fluorimetro, loro utilizzo. Utilizzo e quantificazione dei radioisotopi in laboratorio.
Principi alla base della cromatografia, principali tecniche cromatografiche e relative matrici. Utilizzo della cromatografia per la separazione di miscele complesse di proteine e di lipidi in base alle proprietà chimiche e fisiche. Strumentazione utilizzata (cromatografie su colonna, su strato sottile, HPLC, ecc). Rivelatori ed analisi risultati (coefficienti di ritenzione, analisi qualitative e quantitative).
Principi alla base dell'elettroforesi e comuni applicazioni al frazionamento del DNA e delle proteine. IEF, SD-PAGE, 2D-PAGE. Sistemi di rilevazione più comuni: coloranti, ibridizzazione e western blotting. Caratterizzazione di proteine: digestione, sequenziamento, spettrometria di massa, proteomica.
Applicazioni degli anticorpi nelle biotecnologie, RIA, ELISA, immunofluorescenza, western blotting.
Utilizzo di enzimi in diagnostica clinica, assay cinetici ed end-point applicati alla ricerca ed alla diagnostica.

I marcatori biologici e loro utilizzo nella diagnosi delle patologie.
Significato della misura in ambito biologico: specificità, accuratezza, precisione e riproducibilità.

Esercitazioni

Esercitazione 1

Preparazione dei reagenti e delle soluzioni per le esperienze successive con almeno:

- a) 1 pesata su bilancia preparativa
- b) 1 preparazione di una soluzione a concentrazione nota
- c) 1 diluizione
- d) 1 misura del pH e correzione dello stesso per ottenere soluzioni a pH noto

Esercitazione 2

Estrazione lipidi con solventi da campioni biologici (batteri non patogeni, preparati vegetali o animali).

TLC degli estratti lipidici precedentemente preparati.

Sviluppo con coloranti.

Identificazione dei lipidi presenti per co-migrazione con standard.

Esercitazione 3

Omogenizzazione di campioni biologici (batteri non patogeni, preparati vegetali o animali).

Centrifugazione preparativa.

Cromatografia su colonna dei campioni proteici precedentemente preparati.

Esercitazione 4

Analisi delle frazioni ottenute determinando concentrazione proteica ed attività enzimatica. Elaborazione dei risultati e calcolo attività specifica e determinazione dell'arricchimento.

Esercitazione 5

Utilizzo di enzimi per la quantificazione di analiti di interesse biologico/clinico in diagnostica clinica. Misura glicemia, uricemia, colesterolemia.

Attività a scelta dello studente

Ricerche bibliografiche, frequenza del laboratorio di biochimica per attività pratiche.

Supporti alla didattica in uso alla docenza

Videoproiettore e computer con collegamento Internet in dotazione all'aula.
Laboratorio Esercitazioni con strumentazione.

Strumenti didattici

Presentazioni in formato MS-Power Point, CD-ROM interattivi, dispense e siti internet didattici.

Materiali di consumo previsti

Reagenti e plastiche monouso per esercitazioni.

Eventuale bibliografia

Testi consigliati:

PRINCIPI DI METODOLOGIA BIOCHIMICA di C. De Marco, C. Cini – Ed. Piccin

METODOLOGIE DI BASE PER LE SCIENZE BIOMOLECOLARI di REED Rob , HOLMES David ,

WEYERS Jonathan , JONES Allan - 2002 Zanichelli Editore

METODOLOGIE DI BASE PER LA BIOCHIMICA E LA BIOTECNOLOGIA di NINFA Alexander J ,
BALLOU David P - 2000 Zanichelli Editore

Verifica dell'apprendimento

Il corso integrato prevede un esame unico costituito da uno scritto ed un orale che, per quanto riguarda il modulo di laboratorio, verteranno sulla parte di teoria.

Al termine delle esercitazioni lo studente presenterà un quaderno di laboratorio che insieme al rendimento in laboratorio costituirà la base per la valutazione.