

**LABORATORIO DI METODOLOGIE BIOCHIMICHE E PROTEOMICHE**  
*Insegnamento di Biochimica Funzionale con Elementi di Laboratorio*

<b>Codice Disciplina:</b> MS0444 <b>Codice Insegnamento:</b> BT068	<b>Settore:</b> BIO/10	<b>N° CFU:</b> 5
<b>Docente:</b> Gianluca Baldanzi	<b>Ore:</b> 20 lezioni in aula 25 laboratorio x 2 turni	<b>Corso di Laurea :</b> Biotechnologie <b>Anno : II</b> <b>Semestre : I</b>

### Obiettivo del modulo

Le lezioni teoriche forniscono allo studente una panoramica delle tecniche biochimiche moderne e delle loro applicazioni. Allo stesso tempo il modulo teorico vuole fornire allo studente gli strumenti per una lettura clinica della letteratura.

Le esercitazioni mirano a far acquisire le capacità pratiche richieste per l'utilizzo 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, estrazione in fase organica, salting out, elettroforesi)
- tecniche per l'analisi della concentrazione di molecole biologiche (misura concentrazione delle proteine e 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, colesterolemia)
- quantificazioni con metodiche ELISA

### Conoscenze ed abilità attese

Nozioni di Fisica (proprietà delle radiazioni elettromagnetiche e radioattività).

Nozioni chimiche di base (peso molare, concentrazione, molarità, pH).

Nozioni di statistica ed analisi dati.

Conoscenze delle norme per la sicurezza in laboratorio (significato delle frasi di rischio, rischi chimici e biologici, dispositivi di protezione).

Tecniche base dei laboratori chimici: 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.

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

**Significato della misura** in ambito biologico: specificità, accuratezza, precisione e riproducibilità.

**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 ed acidi nucleici). Teoria della centrifugazione e tecniche di centrifugazione preparativa per il frazionamento di composti biologici. Utilizzo delle centrifughe e forza centrifuga.

**Principi di spettrofotometria.** Saranno trattate le basi teoriche e gli aspetti pratici delle tecniche spettroscopiche (assorbimento, fluorescenza, polarimetria) ed esempi del loro utilizzo per la quantificazione di analiti biologici. Caratteristiche di uno spettrofotometro ed un fluorimetro, loro utilizzo.

**Radioisotopi** in laboratorio: caratteristiche dei radioisotopi di uso più comune, loro utilizzi in biochimica e strumentazione utilizzata per la loro quantificazione.

**Principi alla base della cromatografia**, principali tecniche cromatografiche (affinità, gel filtrazione, scambio ionico e fase inversa) 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** con particolare attenzione al trazionamento e caratterizzazione delle proteine. IEF, SDS-PAGE, 2D-PAGE, elettroforesi capillare. Sistemi di rilevazione più comuni: coloranti e western blotting. **Caratterizzazione di proteine**: digestione, sequenziamento di Edman, utilizzo della spettrometria di massa per la caratterizzazione delle proteine, proteomica qualitativa e quantitativa con particolare attenzione alle tecniche di spettrometria di massa.

**Applicazioni degli anticorpi nelle biotecnologie**, saggi immunologici competitivi e non competitivi, RIA, ELISA, immunofluorescenza, western blotting, immunodiffusione e tecniche correlate.

**Utilizzo di enzimi** in diagnostica ed in ricerca. Caratterizzazione della cinetica enzimatica e studio degli inibitori. Utilizzo di enzimi in diagnostica clinica, assay cinetici ed end-point applicati alla ricerca ed alla diagnostica.

Saggi di **binding ed associazione**, analisi dell'equilibrio recettore-ligando. Metodiche per lo studio delle interazioni molecolari, saggi classici con molecole marcate, metodiche spettrometriche avanzate: **Fret, Bret, fluorescenza a tempo risolto**.

## Esercitazioni

### Esercitazione 1

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

TLC degli estratti lipidici precedentemente preparati e sviluppo con coloranti.

Identificazione e quantificazione dei lipidi presenti per co-migrazione con standard e confronto con la letteratura.

### Esercitazione 2

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

Centrifugazione preparativa.

Cromatografia su colonna (gel filtrazione o scambio ionico) dei campioni proteici precedentemente preparati.

### Esercitazione 3

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

### Esercitazione 4

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

### Esercitazione 5

Metodica ELISA per la quantificazione di analiti di interesse biotecnologico o clinico.

Utilizzo spettrofotometri e microplate readers.

## 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.

Materiali di consumo.

## 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

Al termine delle esercitazioni lo studente presenterà un quaderno di laboratorio che insieme al rendimento in laboratorio costituirà la base per la successiva valutazione. Si ricorda che la frequenza dei laboratori didattici è obbligatoria.

Il corso integrato prevede un esame unico costituito da uno scritto ed un orale.

Lo scritto riguarderà:

- formula dei più comuni composti organici di interesse biologico (aminoacidi, zuccheri, lipidi, acidi nucleici)
- metodiche di preparazione delle soluzioni e relativi calcoli stechiometrici
- Trattazione matematica e esercizi inerenti:
  - equilibri chimici
  - ossidoriduzioni e trasporto degli elettroni
  - interazioni ligando recettore
  - pH e tamponi
  - catalisi enzimatica

Gli argomenti trattati durante la parte di teoria del modulo di Laboratorio di Metodologie Biochimiche.

Il superamento dello scritto è indispensabile per l'accesso all'orale.

La prova orale verterà sugli argomenti trattati nel modulo di Biochimica Funzionale.