

COURSE SYLLABUS

Introduction To Laboratory Techniques

1920-2-E1301Q079

Obiettivi

Obiettivo di questo corso è fornire agli studenti una conoscenza di base delle più comuni tecniche in uso nel laboratorio biochimico. Il corso mira inoltre a sviluppare un senso critico nella scelta di strategie per la purificazione di proteine e di metodi per il dosaggio di attività enzimatica e per l'espressione di proteine ricombinanti.

1. Conoscenza e capacità di comprensione - al termine dell'insegnamento lo studente dovrà conoscere la teoria alla base delle principali tecniche utilizzate nel laboratorio biochimico
2. Capacità di applicare conoscenza e comprensione - al termine dell'insegnamento lo studente dovrà essere in grado di applicare le conoscenze acquisite nella scelta di un approccio sperimentale per la purificazione e caratterizzazione di proteine; tali conoscenze verranno anche applicate nei corsi successivi, in particolare nel corso di "laboratorio integrato di biologia"
3. Autonomia di giudizio - al termine del corso, lo studente sarà in grado di mettere a punto un protocollo di purificazione di proteine e di operare una scelta tra i diversi metodi di caratterizzazione.
4. Abilità comunicative - alla fine dell'insegnamento lo studente avrà acquisito una terminologia scientifica adeguata e saprà esporre con proprietà di linguaggio gli argomenti trattati nel corso.
5. Capacità di apprendimento - alla fine dell'insegnamento lo studente sarà in grado di comprendere e valutare criticamente l'uso delle metodologie riportate nella letteratura scientifica.

Contenuti sintetici

Metodi per la rottura di cellule; centrifugazioni; spettroscopia UV-VIS; spettrofluorimetria; metodi di dosaggio della concentrazione proteica e dell'attività enzimatica; cromatografie; strategie per la purificazione di proteine; elettroforesi; produzione di proteine ricombinanti; tecniche immunochimiche; tecniche radioisotopiche; tecniche manometriche; metodi per l'analisi della struttura primaria di proteine.

Programma esteso

Metodi per la rottura di cellule – tamponi e stabilità delle proteine; metodi per la rottura delle cellule; salting out; dialisi

Centrifugazioni – principi generali; centrifugazione differenziale; centrifugazione in gradiente di densità; elutriazione

Spettroscopia UV-VIS spettrofluorimetria

Metodi di dosaggio della concentrazione proteica e dell'attività enzimatica – metodo di Bradford e BCA; dosaggi di attività enzimatica

Cromatografie – principi generali; gel filtrazione; cromatografia a scambio ionico; cromatofocusing; cromatografia in fase inversa; cromatografia idrofobica; cromatografia di affinità

Strategie per la purificazione di proteine

Elettroforesi – principi generali; SDS-PAGE; elettroforesi nativa; isoeletrofocalizzazione; elettroforesi bidimensionale

Produzione di proteine ricombinanti – vettori per la produzione di proteine ricombinanti “taggate”; purificazione e rimozione del tag

Tecniche immunochimiche – immunoprecipitazione; western blotting; ELISA; RIA; immunoistochimica

Tecniche radioisotopiche – radioattività e radioisotopi utilizzati nel laboratorio biochimico; contatore di Geiger-Muller; conteggio in scintillazione; autoradiografia

Tecniche manometriche – elettrodi di Clark e di Rank

Metodi per l'analisi della struttura primaria delle proteine – aminoacido analisi; degradazione di Edman; spettrometria di massa

Prerequisiti

E' necessaria la conoscenza delle basi della fisica, della chimica generale ed organica e della biochimica. I principi chimico-fisici e le nozioni di biochimica essenziali per la comprensione delle diverse metodologie verranno riassunti all'inizio della lezione.

Modalità didattica

Lezioni frontali con presentazione powerpoint; video; lezioni partecipate (discussione di dati sperimentali)

Materiale didattico

testi consigliati:

Wilson&Walker "Biochimica e Biologia molecolare" Ed. Cortina (2019); Bonaccorsi, Contestabile, Di Salvo
"Metodologie biochimiche" CEA

slides disponibili sulla piattaforma Moodle

Periodo di erogazione dell'insegnamento

Secondo semestre

Modalità di verifica del profitto e valutazione

Esame orale: attraverso la prova orale ci si propone di valutare le conoscenze acquisite dallo studente e la sua capacità di illustrarle in modo coerente; viene valutata anche la capacità di discutere dati sperimentali; consiste in 3-4 domande. Non sono previste prove in itinere.

Orario di ricevimento

su richiesta per e-mail (paola.fusi@unimib.it)
