

COURSE SYLLABUS

Introduction To Laboratory Techniques

2021-2-E1301Q079

Obiettivi

Obiettivo di questo insegnamento è fornire agli studenti una conoscenza di base delle più comuni tecniche del DNA ricombinante e di biochimica. L'insegnamento mira inoltre a sviluppare un senso critico nella scelta di strategie di clonaggio, produzione di proteine ricombinanti, per la purificazione di proteine e di metodi per il dosaggio di proteine e dell'attività enzimatica.

Conoscenza e capacità di comprensione - al termine dell'insegnamento lo studente dovrà conoscere la teoria alla base delle principali tecniche di laboratorio biochimico e di tecniche di base per la manipolazione del DNA ricombinante.

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 il clonaggio di DNA, la produzione, purificazione e caratterizzazione di proteine; tali conoscenze verranno anche applicate nei corsi successivi, in particolare nel corso di Laboratorio Integrato di Biologia (LIB).

Autonomia di giudizio - al termine dell'insegnamento, lo studente sarà in grado di mettere a punto un protocollo di clonaggio di DNA plasmidico, produzione di proteine ricombinanti, purificazione di proteine e di operare una scelta tra i diversi metodi di caratterizzazione.

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.

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 del DNA ricombinante per il clonaggio e la produzione di proteine ricombinanti

Tecniche preparative per l'estrazione e l'arricchimento di proteine

Tecniche preparative per la purificazione di proteine

Tecniche elettroforetiche e di dosaggio

Tecniche per l'analisi della struttura secondaria e terziaria delle proteine

Programma esteso

Metodi del DNA ricombinante

Amplificazione del DNA (polymerase chain reaction)

Elettroforesi del DNA; enzimi di restrizione e di ligazione, scelte di vettori e di ospiti di clonaggio;

Metodi per la produzione di proteine ricombinanti

Tecniche preparative per l'estrazione e l'arricchimento di proteine

Tecniche di lisi cellulare; tamponi e stabilità delle proteine; salting out

Precipitazione e frazionamento in ammonio solfato e dialisi

Tecniche centrifugative (differenziale; in gradiente di densità)

Tecniche preparative per la purificazione di proteine

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

Strategie per la purificazione di proteine

Tecniche elettroforetiche e di dosaggio

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

Spettroscopia UV-VIS

Metodi di dosaggio della concentrazione proteica e dell'attività enzimatica

Tecniche per l'analisi della struttura secondaria e terziaria delle proteine

Dicroismo circolare

Spettrofluorimetria

Spettrometria di massa

Prerequisiti

È 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 delle lezioni

Modalità didattica

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

Materiale didattico

Slides: reperibili sulla pagina Moodle dell'insegnamento

Libri di testo:

- K. Wilson & J. Walker (2000) "Biochimica e Biologia Molecolare" Cortina, 2006
- M. C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M. L. Di Salvo "Metodologie Biochimiche" Casa Editrice Ambrosiana, 2012

Periodo di erogazione dell'insegnamento

Secondo semestre

Modalità di verifica del profitto e valutazione

Esame scritto + orale. Esame scritto (90 min): consiste nel rispondere a 10 quesiti/esercizi su argomenti teorici e su dati sperimentali ottenuti con le tecniche oggetto di questo insegnamento. Esame orale (ca. 15 min): consiste in una-due domande che, nella maggior parte dei casi, traggono spunto dall'esame scritto. Attraverso entrambe le prove saranno valutate le conoscenze acquisite in ambito teorico e nella interpretazione di dati sperimentali. Sono inoltre valutate le capacità espositive, in base alla loro coerenza e all'utilizzo di un linguaggio scientificamente e tecnicamente appropriato. Il voto di entrambe le prove, scritta e orale, è assegnato in trentesimi. Il voto finale si ottiene dalla media dei due voti.

Orario di ricevimento

Su appuntamento, per mail a stefania.brocca@unimib.it