UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

SYLLABUS DEL CORSO

Introduzione alle Tecniche di Laboratorio

2122-2-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

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

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

3. Tecniche per il dosaggio delle proteine e dell'attività enzimatica

4. Tecniche preparative per la purificazione di proteine

5. Tecniche elettroforetiche ed immunochimiche

6. Tecniche biofisiche per l'analisi conformazionale delle proteine

Programma esteso

1. Metodi del DNA ricombinante, per il clonaggio e la produzione di proteine ricombinanti. Metodi per la produzione di proteine ricombinanti; Enzimi di restrizione e di ligazione; Scelte di vettori e di ospiti di clonaggio; Amplificazione del DNA (polymerase chain reaction); Metodi di estrazione del DNA plasmidico; Elettroforesi del DNA; Introduzione alle tecniche di sequenziamento.

2. Tecniche preparative per l'estrazione e l'arricchimento di proteine. Tecniche centrifugative e di ultrafiltrazione; Precipitazione e frazionamento in ammonio solfato; Tecniche di lisi cellulare e centrifugazione frazionata.

3. Tecniche per il dosaggio delle proteine e dell'attività enzimatica. Dosaggio della concentrazione proteica; Saggi di attività' enzimatica; Tabella di purificazione.

4. Tecniche preparative per la purificazione di proteine. Introduzione alle tecniche cromatografiche; Introduzione alle tecniche cromatografiche; Cromatografia di esclusione molecolare; Cromatografia a scambio ionico; Cromatografia di interazione idrofobica e *reverse phase*; Cromatografia di affinità; HPLC ed FPLC; Valutare l'andamento di una purificazione.

5. Tecniche elettroforetiche ed immunochimiche. Elettroforesi in condizioni native e denaturanti (SDS-PAGE); Isoelettrofocalizzazione (IEF) ed elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE); Western blotting; Introduzione alle tecniche immunochimiche; Immunoprecipitazione, ELISA

6. Tecniche biofisiche per l'analisi conformazionale delle proteine. Spettrometria di massa; Introduzione alla spettrofotometria e assorbimento in UV-vis; Spettroscopia di dicroismo circolare; Spettrofluorimetria; Tecniche di *fluorescence resonance energy transfer* (FRET).

Prerequisiti

È necessaria la conoscenza di concetti basilari di fisica, chimica generale ed organica. I principi chimico-fisici e le nozioni di biochimica essenziali per la comprensione delle diverse metodologie verranno esposti brevemente o ricordati all’inizio delle lezioni.

Modalità didattica

Lezioni frontali con presentazione powerpoint; video; 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

Primo semestre

Modalità di verifica del profitto e valutazione

Esame scritto + orale. Esame scritto (90 min): consiste in 10 quesiti a risposta multipla, 2 esercizi e 2 domande aperte. 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