

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

# SYLLABUS DEL CORSO

# Introduzione alle Tecniche di Laboratorio

2526-2-E1301Q079

## Obiettivi

Questo insegnamento si propone di fornire agli studenti una conoscenza di base delle più comuni tecniche biochimiche e del DNA ricombinante. Il corso mira inoltre a illustrare la complementarietà tra le strategie di clonaggio, la produzione, purificazione e caratterizzazione (strutturale e funzionale, con particolare enfasi sull'attività enzimatica) delle proteine ricombinanti.

Conoscenza e capacità di comprensione - al termine dell'insegnamento lo studente dovrà conoscere i principi teorici 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 riconoscere e comprendere i passaggi principali di un protocollo di clonaggio di DNA plasmidico, produzione di proteine ricombinanti, purificazione e caratterizzazione strutturale di proteine.

Abilità comunicative - alla fine dell'insegnamento lo studente avrà acquisito un vocabolario tecnico-scientifico adeguato e saprà esporre con proprietà di linguaggio gli argomenti trattati nel corso.

Capacità di apprendimento - alla fine dell'insegnamento è atteso che lo studente sia in grado di comprendere e riconoscere le metodologie apprese in diversi contesti (ad esempio, in articoli scientifici, relazioni e protocolli sperimentali).

#### 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 elettroforetiche ed immunochimiche
- 4. Tecniche per il dosaggio delle proteine e dell'attività enzimatica
- 5. Tecniche preparative per la purificazione di proteine
- 6. Alcune tecniche spettroscopiche per l'analisi conformazionale delle proteine

# Programma esteso

- 1. Metodi del DNA ricombinante, per il clonaggio e la produzione di proteine ricombinanti. Strategia di produzione di proteine ricombinanti; Clonaggio genico con 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; Elettroforesi capillare; Sequenziamento del DNA con metodo di Sanger.
- 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 elettroforetiche ed immunochimiche.** Elettroforesi in condizioni native e denaturanti (SDS-PAGE); Western blotting; Introduzione alle tecniche immunochimiche; Immunoprecipitazione, ELISA
- **4. Tecniche per il dosaggio delle proteine e dell'attività enzimatica.** Dosaggio della concentrazione proteica; Saggi di attività enzimatica; Tabella di purificazione.
- **5. 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.
- **6. Tecniche biofisiche per l'analisi conformazionale delle proteine.** 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 ricapitolati all'inizio delle lezioni.

## Modalità didattica

L'insegnamento prevede 24 lezioni (6 CFU) che si svolgeranno in modalità mista. Le lezioni saranno sia 'erogative' (convenzionali, in presenza) sia 'interattive', promuovendo la partecipazione attiva e il coinvolgimento degli studenti nell'analisi e interpretazione di metodi sperimentali. Il materiale di studio includerà *protocol book*, riviste di metodologia scientifica e articoli scientifici.

Ciascuna lezione sarà supportata da presentazioni PowerPoint, video e analisi di metodi sperimentali. In base alle richieste degli studenti frequentanti, potranno essere introdotti nuovi argomenti di studio.

In base al numero e alle richieste degli studenti frequentanti, potranno essere svolti lavori di gruppo, volti all'analisi di metodi sperimentali ed alla loro complementarietà.

#### Materiale didattico

#### 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

## Materiale didattico reperibile sulla pagina Moodle dell'insegnamento:

- Slide delle lezioni
- Domande ed esercizi d'esame
- · Articoli scientifici selezionati dal docente

# Periodo di erogazione dell'insegnamento

Secondo semestre

# Modalità di verifica del profitto e valutazione

## Esame scritto + orale.

L'esame consiste in una prova scritta (60 minuti) e una prova orale (circa 20 minuti).

La prova scritta comprende quesiti a risposta multipla ed esercizi, con un punteggio massimo di 15 punti. Per essere ammessi alla prova orale, è necessario ottenere un minimo di 10 punti.

La prova orale si basa su due o tre domande relative all'intero programma, con un punteggio massimo di 15 punti. Il voto finale è la somma dei punteggi ottenuti nella prova scritta e in quella orale. La soglia di sufficienza per il superamento dell'esame è fissata a 18 punti.

Entrambe le prove mirano a valutare le conoscenze teoriche, la capacità di interpretare dati sperimentali e di stabilire relazioni tra tecniche e approcci sperimentali diversi. Verranno inoltre valutate le capacità espositive e l'uso di un linguaggio scientificamente e tecnicamente appropriato.

Non sono previste prove in itinere.

# Orario di ricevimento

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

# **Sustainable Development Goals**

ISTRUZIONE DI QUALITÁ

