Programma di BIOCHIMICA APPLICATA
A.A. 2013-2014
Corso di Laurea in Farmacia
Docente: Dott.ssa Maria Antonietta DI NOIA
e-mail: maria.dinoia@unibas.it

La ricerca e le indagini in campo biomedico. Modelli di studio e modelli sperimentali. Progettazione delle indagini biochimiche, disegno sperimentale. Sicurezza nel laboratorio biochimico.

La tecnologia delle colture cellulari. Laboratorio per colture cellulari. Tipi di colture cellulari. Potenziali applicazioni delle colture cellulari.

Campioni biologici: omogenizzazione, scelta delle metodiche e dei *media;* soluzioni-tampone e pH; amminoacidi e punto isoelettrico.

Tecniche centrifugative: principi della sedimentazione; velocità, RCF, coefficiente di sedimentazione e tempi di sedimentazione. Centrifughe e rotori. Centrifugazione differenziale: separazione e analisi di frazioni subcellulari. Centrifugazione in gradiente di densità, zonale e isopicnica. Applicazioni: separazione di cellule, organelli subcellulari, proteine, acidi nucleici. Valutazione della resa e dell'arricchimento: "marcatori" subcellulari

Precipitazione frazionata di proteine: precipitazione frazionata con solfato d'ammonio e isoelettrica; precipitazione con solventi e polimeri organici; precipitazione al calore.

Dialisi ed ultrafiltrazione: principii ed applicazioni.

Tecniche cromatografiche: principii generali, risoluzione e piatti teorici. Cromatografia su colonna. Cromatografia di adsorbimento e ripartizione. Cenni sulla TLC: cromatografia bidimensionale. Cromatografia a scambio ionico di proteine. Analizzatore automatico di amminoacidi. Cromatografia ad esclusione (gel filtrazione).Cromatografia di affinità. Immunoaffinità. Cromatografia con coloranti e con lectine. Cromatografia con metalli; purificazione di proteine "etichettate" con istidina. HPLC.

Purificazione di enzimi: attività specifica e resa. Enzimi immobilizzati. Determinazione della sequenza di proteine (sequenziamento di Edman e mediante spettrometria di massa).Proteine ricombinanti e loro applicazioni terapeutiche. Reazioni enzimatiche ed applicazioni degli enzimi in campo analitico e biomedico.

Tecniche elettroforetiche: principii generali, fattori che influenzano la mobilità elettroforetica. Elettroforesi in fase libera. Elettroforesi zonale su acetato di cellulosa; proteine sieriche. Elettroforesi su gel: PAGE, PAGE-SDS, Agarosio. Metodi di rivelazione e valutazioni quantitative. Blotting: Western blotting nello studio delle proteine; applicazioni biochimiche e diagnostiche.

Focalizzazione isoelettrica (IEF). Elettroforesi bidimensionale.

Spettroscopia di assorbimento atomico e molecolare. Spettrofotometria di assorbimento UV e visibile. Principi generali della spettroscopia. Cromofori. Applicazioni della spettroscopia UV-Vis: analisi qualitativa e quantitativa. Legge di Lambert-Beer. Spettrofotometri. Spettroscopia IR.

Spettroscopia di emissione molecolare. Luminescenza. Principi fondamentali della fluorimetria. Fluoroforo. Fluorimetri. Applicazioni della spettrofluorimetria: analisi qualitative e quantitative. Fluorescenza intrinseca ed estrinseca. Sonde fluorescenti. Citofluorimetria. Applicazione alle biomolecole dei metodi spettrofotometrici e fluorimetrici.

Tecniche elettrochimiche. Elettrodo ad ossigeno; studi sulla respirazione mitocondriale. Biosensori.

Tecniche enzimatiche. Richiami di cinetica enzimatica: velocità iniziale, effetto della concentrazione di enzima e substrato, pH e temperatura. Inibizione irreversibile e reversibile. Inibitori competitivi, non competitivi, acompetitivi. Modificazione chimica di proteine, inibitori come farmaci. Dosaggio dell'attività enzimatica: metodi continui, discontinui, diretti, indiretti e accoppiati.

Valutazione di enzimi e metaboliti a scopo diagnostico Caratteristiche generali, ruolo biochimico e metodi di dosaggio dei principali enzimi di interesse clinico: LDH, CPK, AST e ALT, fosfatasi alcalina, colinesterasi. Profili enzimatici: cardiaco, epatico e pancreatico. Metaboliti di interesse clinico: glucosio (glicemia, test di tolleranza al glucosio, emoglobina glicata) e colesterolo.

Metodi radioisotopici. Principi, strumentazione ed applicazioni. Richiami sui tipi di decadimento radioattivo. Energia e velocità del decadimento radioattivo. Rivelazione e misura della radioattività. Efficienza di conteggio e quenching. Autoradiografia. Applicazioni dei radioisotopi in biochimica: studio di vie metaboliche, studio di sistemi di trasporto e assorbimento, studi di legame. Applicazione dei radioisotopi nell'analisi clinica.

Tecniche immunochimiche. Struttura degli anticorpi, reazione antigene-anticorpo. Produzione di antisieri, anticorpi monoclonali. Metodi di analisi: reazione di immunoprecipitazione in fase libera ed in gel, immunodiffusione; metodi radioimmunologici: RIA ed IRMA; dosaggi immunoenzimatici: EMIT, ELISA. Dosaggi ormonali: metodiche e applicazioni. Diagnosi di laboratorio della gravidanza: dosaggio della gonadotropina corionica umana.

Tecniche di biologia molecolare. Cenni di tecnologia del DNA ricombinante: principi generali. Reazione a Catena della Polimerasi (PCR): principi e applicazioni diagnostiche, forensiche e paleobiologiche.. Identificazione di specifiche sequenze di DNA ed RNA: ibridizzazione di Southern (Southern blotting) e applicazioni nella diagnosi di malattie genetiche. Northern blotting e applicazioni nello studio dell'espressione genica

Biochimica dei bersagli farmacologici .I farmaci: definizione, proprietà generali. La natura dei bersagli farmacologici DNA come bersaglio farmacologico: Farmaci che interagiscono con il DNA. RNA come bersaglio farmacologico: Nucleotidi antisenso e analoghi strutturali. Farmaci che interagiscono con RNA ribosomiale e altri ribozimi. Farmaci basati sul meccanismo della RNA interference.Lipidi di membrana come bersaglio farmacologico. Proteine come bersaglio farmacologico: Enzimi come bersagli farmacologici. Recettori e vie di trasduzione del segnale

come bersagli farmacologici. Proteine di trasporto transmembrana come bersagli farmacologici. Pompe e canali come bersagli farmacologici.

The research and investigation in the biomedical field: study models and experimental models; design of biochemical investigations ; security in the biochemical laboratory .
The technology of cell cultures: laboratory for cell culture; types of cell culture;. potential applications of cell cultures
.
Biological samples: homogenization, choice of methods and media; buffer solutions and pH; amino acids and isoelectric point

Centrifugative techniques : principles of sedimentation; speed, RCF, sedimentation coefficient and sedimentation times; centrifuges and rotors; differential centrifugation: separation and analysis of subcellular fractions; density gradient centrifugation. Applications: separation of cells, subcellular organelles, proteins, nucleic acids . Evaluation of yield and enrichment, subcellular “markers”

Fractional precipitation of proteins: fractional precipitation with ammonium sulfate and isoelectric precipitation with organic solvents and polymers ; precipitation heat . Dialysis and ultrafiltration : principles and applications.

Chromatographic techniques: general principles , resolution and theoretical plates. Chromatography on column. Adsorption chromatography; two-dimensional chromatography . Ion-exchange chromatography of proteins . Automated analyzer of aminoacids. Exclusion chromatography (gel filtration) . Affinity chromatography . Immunoaffinity . Chromatography with dyes and lectins . Chromatography with metals; histidine" labeled "protein purification. HPLC .

Purification of enzymes: specific activity and yield. Enzymes immobilized. Determination of the protein sequence (Edman sequencing and mass spectrometry). Recombinant proteins and their therapeutic applications. Enzymatic reactions and applications of enzymes in analytical and biomedical field .

Electrophoretic techniques: general principles, factors that influence the electrophoretic mobility . Free phase electrophoresis. Zone electrophoresis on cellulose acetate , serum proteins . Gel Electrophoresis: PAGE, SDS - PAGE , Agarose . Methods of detection and quantitative assessments. Blotting: western blotting in the study of proteins; biochemical and diagnostic applications.
Isoelectric focusing (IEF). Two-dimensional electrophoresis.

Atomic and molecular absorption spectroscopy: UV and visible absorption spectrophotometry . General principles of spectroscopy. Chromophores. Applications of UV -Vis spectroscop : qualitative and quantitative analysis. Beer -Lambert la. Spectrophotometers . IR spectroscopy .

Molecular emission spectroscopy: luminescence. Basic principles of fluorimetry . Fluorophore . Fluorimeters . Applications of spectrofluorimetry : qualitative and quantitative analysis . Intrinsic and extrinsic fluorescence . Fluorescent probes . Flow cytometry. Spectrophotometric and fluorimetric methods applications to biomolecules.

Electrochemical techniques: oxygen electrode; studies on mitochondrial respiration. Biosensors .

Enzymatic techniques: elements of enzyme kinetics: initial speed , effect of the concentration of enzyme and substrate, pH and temperature. Reversible and irreversible inhibition . Competitive

inhibitors, non-competitive, acompetitive. Chemical modification of proteins, inhibitors as drugs. Measurement of enzyme activity: continuous, discontinuous , direct, indirect methods .

Evaluation of enzymes and metabolites for diagnostic use: features, role and biochemical methods for the determination of the key enzymes of clinical interest: LDH, CPK, AST and ALT , alkaline phosphatase, cholinesterase. Enzymatic profiles: heart, liver and pancreatic. Metabolites of clinical interest: glucose (blood sugar, glucose tolerance test , glycated hemoglobin) and cholesterol.

Radioisotopic methods: principles, instrumentation and applications. Types of radioactive decay. Energy and speed of radioactive decay . Detection and measurement of radioactivity . Counting efficiency and quenching . Autoradiography. Applications of radioisotopes in biochemistry: study of metabolic pathways , study of systems of transport and absorption, binding studies. Application of radioisotopes in clinical analysis .

Immunochemical techniques: structure of antibodies, antigen-antibody reaction. Production of antisera, monoclonal antibodies. Methods of analysis: reaction of free phase and gel immunoprecipitation, immunodiffusion, radioimmunoassay RIA and IRMA ; Enzyme immunoassays : EMIT , ELISA. Hormone assays: methods and applications. Laboratory diagnosis of pregnancy: dosage of human chorionic gonadotropin .

Molecular biology techniques: recombinant DNA technology, general principles. Polymerase Chain Reaction (PCR): principles and diagnostic, forensic applications. Identification of specific sequences of DNA and RNA : Southern hybridization (Southern blotting) and applications in the diagnosis of genetic diseases. Northern blotting and applications in the study of gene expression

Biochemistry of drug targets. Drugs: definition, general properties . The nature of drug targets: DNA as pharmacological target: Drugs that interact with DNA . RNA as a drug target: antisense nucleotides and structural analogues . Drugs that interact with ribosomal RNA and other ribozymes. Drugs based on the mechanism of RNA interference. Membrane lipid as a drug target . Proteins as drug target : Enzymes as drug targets . Receptors and signal transduction pathways as drug targets . Transmembrane transport proteins as drug targets. Pumps and channels as drug targets .