

## ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Programma dell'insegnamento: **BIOCHIMICA APPLICATA**

Docente Titolare del corso: Prof.ssa DI NOIA MARIA ANTONIETTA

Corso di Laurea : FARMACIA

Denominazione insegnamento in lingua inglese: APPLIED BIOCHEMISTRY

Obiettivi formativi generali (risultati di apprendimento previsti e competenze da acquisire):

Al termine del corso lo studente acquisisce le conoscenze di base delle principali metodologie biochimiche utilizzate nella separazione, identificazione, caratterizzazione ed analisi di biomolecole; è in grado di disegnare o di valutare protocolli sperimentali impiegati nella ricerca biochimica.

### Programma del Corso:

**La ricerca e le indagini in campo biomedico.** Modelli di studio e modelli sperimentali. Progettazione delle indagini biochimiche, disegno sperimentale. Raccolta ed espressione dei dati. Sicurezza nel laboratorio biochimico. Sviluppo di farmaci e sperimentazione biochimica

**Campioni biologici.** Soluzioni-tampone e pH: scelta dei tamponi per uso biochimico. Amminoacidi e punto isoelettrico. Omogenizzazione: scelta delle metodiche e dei *media*.

**La tecnologia delle colture cellulari.** Laboratorio per colture cellulari. Tipi di colture cellulari. Criogenia. Banche cellulari. Colture procariotiche. Potenziali applicazioni delle colture cellulari.

**Tecniche centrifugative:** principi della sedimentazione; velocità, RCF, coefficiente di sedimentazione e tempi di sedimentazione. Centrifughe e rotor. 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: principi ed applicazioni.

**Tecniche cromatografiche:** principi 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:** principi generali, fattori che influenzano la mobilità elettroforetica. Elettroforesi in fase libera. Elettroforesi zonale su acetato di cellulosa; proteine seriche. 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. Microscopia confocale. 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, incompetitivi. 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 immunochemiche.** 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 e PEIA. 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.

Testi di riferimento:

Maria Carmela Bonaccorsi di Patti, Roberto Contestabile, Martino Luigi Di Salvo, *Metodologie Biochimiche. Ambrosiana ed.*

WILSON, J. WALKER, *Metodologia Biochimica. Le Tecniche Biochimiche in Laboratorio*, Raffaello Cortina Editore, 2001 Milano.

Monica Stoppini, Vittorio Bellotti, *Biochimica applicata*. EDISES

Appunti delle lezioni sotto forma di set di diapositive in formato Power Point

Propedeuticità consigliate:

Biologia , Chimica generale ed inorganica, Biochimica

Note: verranno svolte esercitazioni pratiche di laboratorio

|                  |                                        |                                                 |                                                |
|------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Esame integrato  | <input type="checkbox"/> SI            | <input checked="" type="checkbox"/> NO          |                                                |
| Modalità d'esame | <input type="checkbox"/> Prova scritta | <input checked="" type="checkbox"/> Prova orale | <input type="checkbox"/> Prova scritta e orale |