

## **SCHEDA DELL'INSEGNAMENTO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI APPLICATE BIOMOLECULAR TECHIQUES**

Il corso di "Tecniche Biomolecolari applicate" (*curriculum* Biologia della nutrizione) è costituito da un modulo di "Analisi di macromolecole" (4 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e di esercitazioni di laboratorio), da un modulo di "Diagnostica biomolecolare" (4 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e di esercitazioni di laboratorio).

### **OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE:**

#### **Conoscenze:**

Conoscenza teorico/ pratica di metodologie biomolecolari e delle tecniche bioinformatiche di base di supporto all'analisi sperimentale. Competenze applicative da impiegare nel campo delle discipline biomolecolari. Applicazioni dell'ingegneria genetica e dello studio delle proteine ricombinanti. Acquisizione delle conoscenze teorico pratiche delle moderne metodologie applicate alla diagnostica per la tipizzazione di individui, varietà e specie.

#### **Capacità:**

Capacità di applicare metodologie biochimiche e biotecnologiche di base. Analisi biologiche, biochimiche e biomediche.

#### **Comportamenti:**

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, capacità di lavorare in gruppo, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica

### **PROPEDEUTICITA'**

Gli insegnamenti di "Chimica generale ed inorganica e laboratorio", "Chimica organica e laboratorio", "Matematica", "Fisica e laboratorio".

### **PREREQUISITI:**

Si consiglia sia preceduto da Chimica Biologica e Biologia Molecolare o Genetica

### **PROGRAMMA**

#### **1. Modulo di "Analisi di macromolecole"**

**La progettazione dell'indagine biochimica.** Tecniche separative ed analitiche.

**Purificazione, caratterizzazione strutturale e analisi funzionale delle proteine.**

**Purificazione delle proteine:** Criteri di purezza. Preparazione di omogenati di tessuti e di cellule. Centrifugazione preparativa. Separazione mediante solubilità. Separazione con membrane.

**Tecniche cromatografiche:** a scambio ionico, di esclusione, di affinità. Rappresentazione grafica dei risultati e loro interpretazione.

Produzione di proteine per via ricombinante. Esempi

**Tecniche spettroscopiche:** Spettrofotometria nell'ultravioletto e nel visibile, spettri di assorbimento; legge di Lambert e Beer, dosaggi colorimetrici. Dosaggio delle proteine. Fluorescenza, bioluminescenza. Le proteine fluorescenti. Trasferimento di energia per risonanza. Metodi per lo studio dell'attività enzimatica; esempi di saggi enzimatici.

**Tecniche elettroforetiche:** elettroforesi di proteine, nativa e in condizioni denaturanti; rivelazione; focalizzazione isoelettrica. Saggi EMSA. Elettroforesi bidimensionale. Proteoma: definizione e finalità. Elettroforesi di acidi nucleici: nativa e denaturante; saggi EMSA. Applicazioni.

**Tecniche immunochimiche:** principi generali, produzione di anticorpi policlonali e monoclonali, *Western blotting*, dosaggi immunoenzimatici (ELISA, RIA), immunofluorescenza.

**Esercitazioni di laboratorio:** Determinazione della concentrazione proteica di una soluzione di proteina pura e di una miscela proteica; dosaggi spettrofotometrici di attività enzimatica in funzione di pH e temperatura.

#### **2. Modulo di "Diagnostica biomolecolare"**

**Tecniche e metodiche applicate allo studio dei geni e della loro espressione:**

Reazione a catena della polimerasi PCR: principio molecolare, condizioni di utilizzo, limiti, precauzioni, applicazioni (diagnostica, clonaggio, studi evolutivi).

**Cenni sull'organizzazione dei geni nucleari** - Concetto di Genomi e Trascrittomi Concetto di genoteca-generazione di librerie genomiche e di cDNA - significatività di una libreria. Estrazione di RNA totale da cellule e tessuti Northern blotting, marcatura di sonde, sintesi di cDNA, RT-PCR, quantificazione di acidi

nucleici mediante Real-Time RT-PCR Ibridazione in situ, realizzazione ed analisi di Expressed Sequence Tagged (ESTs), Realizzazione ed analisi di microarray e macroarray per lo studio dell'espressione dei geni.

**Tecniche e metodiche applicate allo studio dei genomi.** Il sequenziamento dei genomi: metodiche, significato e applicazioni.

**Analisi di un cariotipo.** Applicazioni nella diagnostica, nell'analisi pre e post-natale. **Concetto di polimorfismo e il loro uso nell'analisi diagnostica, forense e della mappatura dei genomi.**

**Tecniche applicate allo studio delle modifiche epigenetiche:** analisi del DNA metilato attraverso la tecnica del Sodio Bisolfito e sequenziamento; analisi delle modifiche cromatiniche attraverso immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

**Esercitazione di laboratorio:** Allestimento, esecuzione e visualizzazione di una reazione PCR per l'isolamento genico da genomi. Digestione con enzimi di restrizione del prodotto PCR ottenuto per identificazione di polimorfismi.

### **MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO**

Si consiglia di seguire le lezioni perché la prova finale verterà su quanto è stato trattato durante il corso.

1. Bonaccorsi di Patti MC, Contestabile R, Di Salvo ML: Metodologie biochimiche- Casa Editrice Ambrosiana. Stoppini M, Bellotti V- Biochimica Applicata - EDISES
2. Per integrazione, qualsiasi testo di Genetica che comprenda elementi di Ingegneria Genetica Molecolare quali, ad esempio: Hartl, D.L. e Jones, E.W. **Genetica, analisi di geni e genomi.** Ed. Edises. Griffiths, A.J.F. - Miller, J.H.- Gelbart, W.M.-Lewontin, R. C.- **Genetica moderna**-Ed. Zanichelli Russel, P. **Genetica, un approccio molecolare.** Ed. Pearson

### **Altro materiale didattico**

Appunti del docente, reperibili sul sito [www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it)

### **MODALITA' VERIFICA E VALUTAZIONE DELL'APPRENDIMENTO**

Verifiche di apprendimento mediante test on-line (piattaforma ESOL).

La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base di un adeguato numero di prove e di verifiche. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

## **COURSE OF APPLIED BIOMOLECULAR TECHNIQUES IS MADE UP OF TWO MODULES:**

### **1. Module of "Macromolecules Analysis" (4 CFU).**

How to develop an experimental design in biochemistry. Preparative and analytical techniques. Purification, structural characterization and functional analysis of proteins.

Purification of Proteins: Purity Criteria. Preparation of homogenate samples from different sources (tissues and cells). Preparative centrifugation. Separation by solubility. Membranes-based separation. Chromatographic techniques: ion exchange, size-exclusion and affinity chromatography. Graphical representation of the results and their interpretation. Recombinant protein production. Spectroscopic techniques: UV and visible spectrophotometry, absorption spectra; Lambert and Beer law, colorimetric assays. Colorimetric protein assay. Fluorescence and bioluminescence. Fluorescent proteins. Fluorescence Resonance Energy Transfer. Methods for the analysis of enzymatic activity. Examples of enzymatic assays. Electrophoretic techniques: protein electrophoresis in native and denaturing conditions; revelation by staining methods; Isoelectric focusing. Electrophoretic Mobility Shift Assay. Two-dimensional electrophoresis. Proteome and proteomics: definition and purpose. Nucleic acid electrophoresis in native and denaturing conditions; Electrophoretic Mobility Shift Assay of nucleic acids. Applications.

Immunochemical techniques: general basis, production of polyclonal and monoclonal antibodies, Western blotting, immunoenzymatic assays (ELISA, RIA), immunofluorescence.

Laboratory experiences: Determination of protein concentration of a pure protein solution and of a mixture of proteins; Spectrophotometric assays to evaluate the effect of pH and temperature on enzyme activity.

### **2. Module of "Biomolecular Diagnostic" (4CFU).**

Acquisition of theoretical/practical skills on basic Biomolecular Diagnostic techniques with a particular focus on PCR methods. PCR polymerase chain reaction: molecular principle, conditions of use, limits, precautions and applications (diagnostics, cloning, evolutionary studies). Generation of genomic and cDNA libraries. Gene expression analysis by Real-Time PCR, *in situ hybridization* and *microarray* analysis. Karyotype analysis, sequencing of genomes: methodology, meaning and applications in diagnostics, in pre and post-natal analysis. Polymorphisms and their use in diagnostic, forensic and mapping of genomes. Epigenetic modifications: bisulfite method for DNA methylation analysis; chromatin modifications by chromatin immunoprecipitation (ChIP).

Laboratory experiences: Design, execution and display of a PCR reaction and enzymatic digestion of PCR product for the identification of polymorphisms.

## **TEXTBOOKS**

K. Wilson, J. Walker: **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche**- Raffaello Cortina Editore

Bonaccorsi di Patti MC, Contestabile R, Di Salvo ML: **Metodologie biochimiche**- Casa Editrice Ambrosiana

Stoppini M, Bellotti V- **Biochimica Applicata** - EDISES

J M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: **Biochimica** - V edizione - Zanichelli Editore

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Hartl, D.L. e Jones, E.W. **Genetica, analisi di geni e genomi**. Ed. Edises.

Griffiths, A.J.F. - Miller, J.H.- Gelbart, W.M.-Lewontin, R. C.- **Genetica moderna**-Ed. Zanichelli

Russel, P. **Genetica, un approccio molecolare**. Ed. Pearson