

## CORSO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI APPLICATE

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

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. 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 e analisi elettroforetica in condizioni denaturanti e native di una miscela proteica; dosaggi di attività enzimatica attraverso spettrofotometria.

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.

Integrazione e differenze tra mappa genetica, mappe fisiche e di sequenza

Concetto di polimorfismo e il loro uso nell'analisi diagnostica, forense e della mappatura dei genomi.

### **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**

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/>**

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

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 CAMPUS).

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.

### **COMPOSIZIONE DELLA COMMISSIONE PER LA VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO**

Gabriella Fiorentino (presidente), Giuliana Napolitano, Eliodoro Pizzo.