

**SCHEMA DELL' INSEGNAMENTO DI BIOCHIMICA APPLICATA
E INGEGNERIA PROTEICA**

APPLIED BIOCHEMISTRY AND PROTEIN ENGINEERING

Corso di Studio
BIOLOGIA

Insegnamento

Laurea Magistrale

A.A. 2018/2019

Docente: Prof. Simonetta Bartolucci

☎ +39081679052

email: simonetta.bartolucci@unina.it

SSD

CFU

Anno di corso (I, II, III)

Semestre (I, II e LMcu)

Insegnamenti propedeutici previsti: NESSUNO

RISULTATI DI APPRENDIMENTO ATTESI

Conoscenza e capacità di comprensione (max 4 righe, Arial 9)

Conoscenze teorico pratiche delle tecniche utilizzate nei laboratori biochimici per lo studio di biomolecole in particolare proteine ed enzimi; le applicazioni degli enzimi nella diagnostica e nell'industria. Realizzazione e caratterizzazione di proteine ingegnerizzate.

Theoretical and practical knowledge of the techniques used in biochemical laboratories to analyze biomolecules, proteins and enzymes; enzyme applications in diagnostics and industry. Construction and characterization of engineered proteins.

Conoscenza e capacità di comprensione applicate (max 4 righe, Arial 9)

Capacità di applicare metodologie strumentali biochimiche e biotecnologiche. Analisi biochimiche e biomediche. Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio e di dati di letteratura. Sicurezza in laboratorio.

Ability to understand and to apply the basic principles of modern biochemistry and biotechnology techniques and their application. Evaluation and discussion of experimental and literature data, laboratory safety.

Eventuali ulteriori risultati di apprendimento attesi, relativamente a:

- **Autonomia di giudizio:** Saranno forniti gli strumenti necessari per consentire agli studenti di analizzare in autonomia e di giudicare i dati di letteratura. Lo studente migliorerà inoltre le proprie capacità in merito alla valutazione della didattica.
- **Abilità comunicative:** Lo studente deve saper spiegare a persone non esperte le nozioni apprese. Deve saper presentare o riassumere in maniera completa ma concisa i risultati raggiunti utilizzando correttamente il linguaggio tecnico. Lo studente è stimolato a familiarizzare con i termini propri della disciplina, e a trasmettere a non esperti i principi, i contenuti e le possibilità applicative con correttezza e semplicità.

SCHEDA DELL' INSEGNAMENTO DI BIOCHIMICA APPLICATA E INGEGNERIA PROTEICA

APPLIED BIOCHEMISTRY AND PROTEIN ENGINEERING

Corso di Studio
BIOLOGIA

☐ Insegnamento

☐ Laurea Magistrale

A.A. 2018/2019

- **Capacità di apprendimento:** Lo studente deve essere in grado di aggiornarsi o ampliare le proprie conoscenze attingendo in maniera autonoma a testi, articoli scientifici propri del settore, e deve poter acquisire in maniera graduale la capacità di seguire seminari specialistici, conferenze, master ecc.
- **Making judgements:** Students will receive skills for the evaluation and interpretation of experimental data from the scientific literature. The student will in addition improve its skills in the field of teaching evaluation.
- **Communication abilities:** The student must be able to communicate his knowledge to non-experts. He will learn how to present and summarize his results using the technical language.
- **Knowledge ability:** The student will acquire the ability to widen its knowledge on books and scientific papers, as well as by attending specialistic seminars, conferences, masters, etc.

PROGRAMMA

Tecniche separative ed analitiche e loro applicazioni alla ricerca biochimica. 5 CFU

Purificazione e caratterizzazione delle proteine: Criteri di purezza delle proteine. Dosaggio delle proteine. Metodi per lo studio dell'attività enzimatica. Determinazione della massa molecolare relativa, del numero e del peso molecolare delle subunità. Determinazione del proteoma: *Spettrometria di massa*. 2 CFU

Analisi conformazionali: cromatografia per esclusione molecolare; ultracentrifugazione analitica; parziale proteolisi; spettrofotometria, fluorescenza intrinseca ed estrinseca; Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). 1 CFU

Proteine fluorescenti e bioluminescenti: GFP, RedFP, Aequorin: applicazioni in esperimenti di FRET, FRAP. 0.5 CFU

Interazioni proteina-ligandi, proteina-proteina: fluorescenza intrinseca; FRET; Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET); equilibrio di dialisi; ultrafiltrazione; cromatografia per esclusione molecolare; ultracentrifugazione analitica; Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA); *Immunoprecipitazione; pull down; cross linking; surface plasmon resonance*. (0,5 CFU)

Diagnostica molecolare: analisi con radioisotopi; citometria a flusso, Fluorescence-activated cell sorter (FACS); elettroforesi capillare. 0.5 CFU

Ingegneria proteica ed esempi da letteratura. Progettazione di nuove proteine ed Analisi e Selezione dei prodotti ottenuti.

Modifica chimica di specifici residui di una proteina. Rational design: Mutagenesi sito-diretta; Mutagenesi semi-rational Consensus guided mutagenesis. Directed Evolution: Mutagenesi random Point: Error-prone PCR; Site-saturation Mutagenesis; Somatic Hypermutation (SHM). Ricombinazione *in vitro*: DNA-Shuffling, SCOPE, Step, Rachitt, Shiprec, Scratchy; Permutazione Circolare Progettazione e costruzione di proteine chimeriche e multifunzionali. Singoli Domini. Single Chain Variable Fragment; Anticorpi chimerici; Diabodi; proteine bispecifiche; Immunotossine chimeriche. Esempi di proteine ingegnerizzate con nuove proprietà: proteine fluorescenti e bioluminescenti. 3.5 CFU

Analytical and preparative techniques and their applications 5 CFU

Protein purification and characterization: Monitoring protein purification. Protein estimation. Enzyme assays. Protein structure determination: Determination of relative molecular mass, number and relative molecular mass of subunits: Proteome analysis: *Mass spectrometry*. 2 CFU

Protein structure and conformational changes: Molecular exclusion chromatography; Analytical ultracentrifugation; Limited proteolysis; Ultraviolet spectroscopy; Intrinsic and extrinsic fluorescence; Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). 1 CFU

Fluorescent and bioluminescent proteins: GFP, RedFP, Aequorin and their applications in FRET and FRAP experiments. 0.5 CFU

Protein-ligand binding techniques: Intrinsic fluorescence; FRET; Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET); Equilibrium dialysis; Ultrafiltration; Molecular exclusion chromatography; Analytical ultracentrifugation; Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA); *Immunoprecipitation; Pull down; cross linking; Surface Plasmon Resonance*. 0.5 CFU

Molecular diagnostics: applications of radioisotopes in the biological sciences. Flow cytometry; Fluorescence-activated cell sorter; Capillary electrophoresis. 0.5 CFU

Protein Engineering and Examples of proteins with new properties. Design of new proteins and Analysis and selection of the products obtained. Chemical approaches to protein engineering. Rational design: Site-directed mutagenesis; semi-rational Consensus guided mutagenesis. Directed Evolution: Random Point Mutagenesis: Error-prone PCR; Site-saturation Mutagenesis; Somatic Hypermutation (SHM). *In vitro* Recombination: DNA-Shuffling, SCOPE, Step, Rachitt, Shiprec, Scratchy; Circular Permutation. Construction of chimeric proteins. Isolated domains; Single Chain Variable Fragment; Chimeric antibodies. Diabody structure; bifunctional engineered bispecific proteins; chimeric immunotoxins. Examples of proteins with new properties: protein engineering of fluorescent and bioluminescent proteins. 3.5 CFU

**SCHEMA DELL' INSEGNAMENTO DI BIOCHIMICA APPLICATA
E INGEGNERIA PROTEICA**

APPLIED BIOCHEMISTRY AND PROTEIN ENGINEERING

Corso di Studio
BIOLOGIA
CONTENTS

☐ Insegnamento

☐ Laurea Magistrale

A.A. 2018/2019

MATERIALE DIDATTICO

K. Wilson, J. Walker: **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche**-Raffaello Cortina Editore
R.L. Dryer, G.F. Lata: **Metodologia biochimica** -Antonio Delfino Editore
AJ Ninfa, DP Ballou: **Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia** -Zanichelli
A.L. Lehninger: **Principi di Biochimica** -Zanichelli
L. Stryer: **Biochimica** -Zanichelli
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
Appunti delle lezioni e articoli originali che saranno illustrati durante il corso.

FINALITA' E MODALITA' PER LA VERIFICA DI APPRENDIMENTO

- A) L'esame di fine corso mira a verificare e valutare il raggiungimento degli obiettivi didattici relativi agli argomenti riportati in grassetto nel programma.
- B) Durante la prova finale lo studente verrà interrogato sugli argomenti indicati nella sezione "domande di esame più frequenti". Sarà oggetto di valutazione il grado di completezza della risposta, il livello di integrazione tra i vari contenuti del corso e l'appropriatezza scientifica del linguaggio. Il raggiungimento da parte dello studente di una visione organica dei temi affrontati a lezione, congiunta alla loro utilizzazione critica, la capacità di fare collegamenti, la dimostrazione del possesso di una padronanza espressiva e di linguaggio specifico saranno valutati con voti di eccellenza. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula saranno considerati elementi positivi di valutazione.

PURPOSES AND MODALITIES OF LEARNING VERIFICATION

- A) The final exam is aimed to verify and evaluate the achieving of educational targets concerning the subjects that are highlighted in bold in the contents.
- B) During the final test the student will be asked about the subjects indicated in the section "frequently asked questions during exam". The degree of completeness of the answer, the level of integration between the different topics of the course and the scientific suitability of the speech will be assessed. The achievement of comprehensive view of themes mentioned during lessons, together with their critical utilization, the ability of making connection, the proof of possession of language skills, will be evaluated with excellent scores. The score will be given also taking into account the frequent attendance to the course and the participation in the classroom activities.

Modalità di esame:

L'esame si articola in prova	Scritta e orale		Solo scritta		Solo orale	X
The exam will be:	Written and oral		Written		oral	X

In caso di prova scritta i quesiti sono (*)	A risposta multipla		Risposta libera		Esercizi numerici	
Written exam will be based on:	Multiple choice test		Free answer		Numerical exercises	

**SCHEDA DELL' INSEGNAMENTO DI BIOCHIMICA APPLICATA
E INGEGNERIA PROTEICA**

APPLIED BIOCHEMISTRY AND PROTEIN ENGINEERING

Corso di Studio
BIOLOGIA

☐ Insegnamento

☐ Laurea Magistrale

A.A. 2018/2019

DOMANDE D'ESAME PIU' FREQUENTI

- Tappe della purificazione delle proteine
- Criteri di purezza delle proteine
- Dosaggio delle proteine
- Metodi per lo studio dell'attività enzimatica
- Determinazione della massa molecolare relativa,
- Determinazione del numero e del peso molecolare delle subunità
- Applicazioni della Spettrometria di massa
- Determinazione del proteoma
- Analisi di cambi conformazionali
- Interazioni proteina-ligandi, proteina-proteina
- Diagnostica molecolare: impiego dei radioisotopi in biochimica
- Rational design: Mutagenesi Sito-diretta
- Directed Evolution: Mutagenesi Random
- Ricombinazione *In vitro*
- Progettazione e costruzione di proteine chimeriche
- Esempi di proteine fluorescenti con nuove proprietà

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS DURING EXAM

- Steps of Protein purification
- Methods for Monitoring protein purification
- Methods for Protein estimation
- Enzyme assays
- Determination of relative molecular mass
- Determination of number and relative molecular mass of protein subunits
- Applications of Mass spectrometry
- Proteome analysis
- Protein structure and conformational changes_
- Protein-ligand binding techniques
- Applications of radioisotopes in the biological sciences
- Rational design: Site-directed mutagenesis
- Directed Evolution: Random Point Mutagenesis
- *In vitro* Recombination
- Design and construction of chimeric proteins
- Examples of fluorescent proteins with new properties