* **Informazioni Corso**

Corso integrato di Biotecnologie Biologiche

Modulo di Biochimica Clinica

4 CFU

A.A. 2018/2919

* **InformazioniDocente**

Camillo Palmieri

Professore associato di Biochimica Clinica

email: cpalmieri@unicz.it

tel.studio: 09613695181

Orario ricevimento: dopo accordo via mail.

* **Descrizione del Corso**

Conoscenza delle principali metodologie di laboratorio per applicazioni biotecnologiche.

**Obiettivi del Corso e Risultati di apprendimento attesi**

- Conoscenza delle principali metodologie di laboratorio per l'analisi di proteine e acidi nucleici.

- Interpretazione dell'accetabilità di un risultato di laboratorio.

- Sapere utlizzare i principali database di proteine e acidi nucleici.

- Saper disegnare della strategie di purificazione di proteine.

**Programma**

Concetti generali. Richiami di statistica descrittiva per le misure di laboratorio: media, deviazione standard, coefficiente di variazione di una distribuzione di dati. Fonti di errore di una misura: la variabilità analitica e biologica. Concetti di esattezza, accuratezza, bias, precisione, ripetibilità e riproducibilità. Linearità, sensibilità e specificità analitiche.

Concetto di curva di calibrazione e di funzione di calibrazione.

Accuretezza diagnostica: la sensibilità e la specificità diagnostica; valori predittivi dei positivi e dei negativi.

Elettroforesi: principi generali; definizione della mobilità elettroforetica; fenomeno dell’elettroendosmisi. Supporti per elettroforesi: gel di agarosio e di poliacrilammide. Elettroforesi delle proteine: ionizzazione degli amminoacidi, punto isoelettrico; profilo proteico del siero. Elettroforesi di proteine in condizioni native e SDS-PAGE. Visualizzazione di proteine su gel. Stima dei pesi molecolari. Trasferimento di proteine su filtro: Western Blotting.

Isoelettrofocusing. Elettroforesi bidimensionale. Elettroforesi capillare.

Elettroforesi di acidi nucleici. Trasferimento di acidi nucleici su filtro: Southern e Northern Blotting.

Applicazioni: elettroforesi delle sieroproteine; principali frazioni elettroforetiche delle sieroproteine; gammopatie monoclonali in elettroforesi.

Determinazione dell’emoglobina glicata in elettroforesi capillare.

Tecniche immunochimiche. Struttura delle immunoglobuline. Produzione di anticorpi monoclonali e policlonali. Anticorpi coniugati. Reazione antigeni-anticorpi; metodi di agglutinazione (per la valutazione dei gruppi sanguigni; test di Coombs diretto e indiretto) e immunoprecipitazione: immunodiffusione radiale semplice, immunoprecipitazione in soluzione per lo studio di complessi proteici.

Metodi immunochimica diretti e indiretti: esempi di anticorpi coniugati. Immunoblotting.

Dosaggi immunologici competitivi: Radio-Immuno Assay (RIA); Dosaggi immunoenzimatici: ELISA

Tecniche spettroscopiche. Proprietà della radiazione elettromagnetica e sua interazione con la materia. Spettroscopia nell'UV e nel visibile. La legge di Lambert-Beer. Spettrofotometria: quantificazione di acidi nucleici e proteine. Determinazione della concentrazione di proteine in soluzione: metodi diretti e indiretti.

La fluorescenza: principi; caratteristiche dei fluorocromi (energia di attivazione e di emissione). Immunofluorescenza: cenni di microscopia a fluorescenza e microscopia confocale; la Green Fluorescent Protein (GFP). La citofluorimetria a flusso: esempio di analisi dei leucociti. Applicazioni della citofluorimetria a flusso nel laboratorio di ricerca: ciclo cellulare, contenuto del DNA, apoptosi.

Tecniche cromatografiche. Principi di cromatografia. Il coefficiente di ripartizione; il coefficiente effettivo distribuzione. Meccanismi della separazione cromatografica. Cromatografia di adsorbimento. Cromatografia a scambio ionico.

Cromatografia di esclusione molecolare (gel filtration) Cromatografia di affinità: purificazione di anticorpi e di immunocomplessi; purificazione di mRNA.

Manipolazione degli acidi nucleici.

Isolamento e separazione degli acidi nucleici. Denaturazione (temperatura di fusione, effetto ipercromico, ibridizzazione). Ibridazione standard e inversa: ibridazione di Southern e Northern blots. Microarrays per l’analisi del trascrittoma

La reazione a catena della polimerasi (PCR). Real Time PCR: differenze con la PCR tradizionale; SYBR Green e sonde TaqMan; quantificazione assoluta e relativa in Real Time PCR.

Metodiche di sequenziamento degli acidi nucleici: di prima generazione (metodo di Sanger); next generation sequencing

Modificazione del DNA: enzimi di restrizione (endonucleasi sito-specifiche), endonucleasi ed eso-nucleasi, DNA polimerasi, RNA polimerasi, trascrittasi inversa.

Clonaggio di un frammento di DNA. Vettori per la clonazione di geni: i plasmidi.

**Stima dell’impegno orario richiesto per lo studio individuale del programma**

2-4 settimane

**Metodi Insegnamento utilizzati**

Lezioni frontali.

**Risorse per l’apprendimento**

Biochimica e Biologia Molecolare: Principi e Tecniche (*Wilson- Raffaello Cortina Editore).*

Altro materiale didattico scaricabile dalla risorsa e-resource d'ateneo.

**Attività di supporto**

nessuna

**Modalità di frequenza**

Le modalità sono indicate dall’art.8 del Regolamento didattico d’Ateneo.

**Modalità di accertamento**

Le modalità generali sono indicate nel regolamento didattico di Ateneo all’art.22 consultabile al link <http://www.unicz.it/pdf/regolamento_didattico_ateneo_dr681.pdf>

*Opzionale* (Durante il corso sarà svolto un esame in itinere in forma scritta che prevede n.ro 10-15 quiz. Il risultato dell’esame sarà considerato per la l'esame finale.

L’esame finale sarà svolto in forma(scegliere scritta/orale)

I criteri sulla base dei quali sarà giudicato lo studente sono:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Conoscenza e comprensione argomento** | **Capacità di analisi e sintesi** | **Utilizzo di referenze** |
| Non idoneo | Importanti carenze.Significativeinaccuratezze | Irrilevanti. Frequenti generalizzazioni. Incapacità di sintesi | Completamente inappropriato |
| 18-20 | A livello soglia. Imperfezionievidenti | Capacità appena sufficienti | Appena appropriato |
| 21-23 | Conoscenza routinaria | E’ in grado di analisi e sintesi corrette. Argomenta in modo logico e coerente | Utilizza le referenze standard |
| 24-26 | Conoscenza buona | Ha capacità di a. e s. buone gli argomenti sono espressi coerentemente | Utilizza le referenze standard |
| 27-29 | Conoscenza più che buona | Ha notevoli capacità di a. e s. | Ha approfondito gli argomenti |
| 30-30L | Conoscenza ottima | Ha notevoli capacità di a. e s. | Importanti approfondimenti |