

Attività formativa:	BIOCHIMICA			
Modulo didattico:	LABORATORIO DI BIOCHIMICA			
CFU:	3			
ORE:	45			
TIPO:	Laboratorio			
Obiettivo formativo:	Al termine del modulo, lo studente conosce le le principali tecniche di base per le colture cellulari animali; - le basi di biochimica strutturale e di enzimologia; - i principali metodi di dosaggio delle proteine in spettrofotometria; - l'impiego di protocolli sperimentali per il calcolo dell'attività specifica degli enzimi. Lo studente sa inoltre valutare criticamente i risultati ottenuti tramite la stesura di una relazione riguardante gli esperimenti effettuati.			
TEMA	OBIETTIVO	ORE	ARGOMENTI	DURATA
Sicurezza nei Laboratori Didattici	Lo studente conosce le norme di sicurezza per il lavoro e lo smaltimento dei rifiuti in un Laboratorio di Colture cellulari	2	Illustrazione delle norme di sicurezza e dei dispositivi di protezione individuale (DPI) per il lavoro in un laboratorio di colture cellulari. Organizzazione di un laboratorio per colture cellulari: cappe a flusso laminare, incubatore, microscopio diritto e rovesciato, centrifughe, autoclave. Illustrazione delle regole di smaltimento differenziato dei rifiuti prodotti in un laboratorio di colture cellulari	2
Preparazione dei terreni	Lo studente conosce le modalità di preparazione dei terreni di crescita cellulare, e le manovre in sterilità per l'inoculo di cellule adese	3	Il mezzo di coltura utilizzato normalmente in queste esercitazioni è RPMI-1640 addizionato di: <ul style="list-style-type: none"> • siero fetale bovino (Fetal Bovin Serum o FBS) ad una concentrazione finale del 10% (v/v). Il siero utilizzato è SCOMPLEMENTATO cioè è rimasto a 56 °C per 30 min per denaturare le proteine termolabili, tra cui le proteine del complemento, che possono interferire con la coltura di cellule linfocitarie o con eventuali marcature con anticorpi monoclonali. • L-glutamina, fondamentale per la sintesi degli acidi nucleici. Preparata come soluzione stock 200 mM, deve avere una concentrazione finale 2 mM. La glutamina si decompone rapidamente a 37°C; a 4 °C ha una durata di circa 4 settimane, dopo di che va riaggiunta nel terreno • Antibiotici. Miscela di penicillina/streptomycin o di gentamicina. Le concentrazioni finali di penicillina e streptomycin devono essere 	

			rispettivamente di 100 U/ml e di 100 mg/ml mentre nella soluzione madre sono presenti alla concentrazione rispettivamente di 10.000 U/ml per la penicillina e 10.000 mg/ml. La gentamicina deve essere alla concentrazione finale di 50 μ g/mL, mentre nella soluzione madre e' 50 mg/mL. Gli antibiotici non vanno somministrati alle cellule continuamente, per evitare di selezionare ceppi batterici inquinanti resistenti.	
colture cellulari e curva di crescita	Lo studente conosce le differenze tra crescita di cellule adese e in sospensione. Allestisce una curva di crescita cellulare per conoscere il tempo di duplicazione. Lo studente apprende le modalita' per la tripsinizzazione e la conta di cellulare.	5	Inoculo di una linea cellulare in sospensione. Tripsinizzazione enzimatica. Conta cellulare utilizzando la camera di Kova	
Laboratorio di biochimica: dosaggio delle proteine	Lo studente conosce la composizione dei buffer e le tecniche per la lisi cellulare	5	Lisi cellulare in tampone basico per saggiare l'attività della fosfatasi alcalina. I principi della spettrofotometria. La legge di Lambert-Beer e le sue possibili applicazioni. Analisi qualitative e quantitative. Un esempio pratico di analisi quantitativa: il dosaggio della concentrazione di proteina in campioni biologici. Costruzione della curva di taratura e determinazione della concentrazione incognita.	
Laboratorio di biochimica: attività e cinetica enzimatica	Gli argomenti trattati nel corso riguardano gli enzimi come catalizzatori biologici, adattamento indotto e affinità dell'enzima per lo stato di transizione della reazione catalizzata, con cenni agli inibitori analoghi dello stato di transizione e agli anticorpi catalitici; la cinetica enzimatica, la definizione e misura delle costanti fondamentali dell'azione enzimatica; regolazione degli enzimi e saggio dell'attività ; inibitori.	5	La determinazione dell'attività enzimatica, con particolare riferimento ai metodi spettrofotometrici; definizione internazionale, formula per ricavare il risultato in unità per millilitro dai dati sperimentali. Dosaggio dell'attività e della cinetica enzimatica della fosfatasi alcalina	

Laboratorio di biochimica: affinità e specificità		5	Dipendenza del pH sulla attività della saccarasi. Definizione sperimentale di affinità e specificità enzimatica	