

CORSO DI STUDIO *Bioteχνologie Mediche e Farmaceutiche (L-2)*

ANNO ACCADEMICO *2024-2025*

DENOMINAZIONE DELL'INSEGNAMENTO *Laboratorio di Tecnologie Biochimiche e Bioenergetica Cellulare*

Principali informazioni sull'insegnamento	
Anno di corso	III
Periodo di erogazione	07, Ottobre 2024 – 17, Gennaio 2025
Crediti formativi universitari (CFU/ETCS):	5 (2+3)
SSD	BIO/10
Lingua di erogazione	Italiano
Modalità di frequenza	La frequenza è raccomandata per lezioni frontali e obbligatoria per il 75% dei laboratori

Docente	
Nome e cognome	Vito Porcelli (Unità A) – Ruggiero Gorgoglione (Unità B)
Indirizzo mail	vito.porcelli@uniba.it – ruggiero.gorgoglione@uniba.it
Telefono	Porcelli: 0805442772 – Gorgoglione: 0805443551
Sede	Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologia e Ambiente
Sede virtuale	Porcelli Codice Teams: dfwgux7 – Gorgoglione Codice Teams: nqi4x56
Ricevimento	Venerdì 9:00 - 12:00

Organizzazione della didattica			
Ore			
Totali	Didattica frontale	Pratica (laboratorio, campo, esercitazione, altro)	Studio individuale
125	16	36	73
CFU/ETCS			
5	2	3	

Obiettivi formativi	<i>L'insegnamento si propone di fornire agli studenti la chiave di comprensione delle principali tecniche di laboratorio biochimico e come esse possano essere applicate per lo studio qualitativo e quantitativo delle principali macromolecole biologiche quali proteine, lipidi e acidi nucleici. Particolare attenzione sarà data allo studio della bioenergetica mitocondriale. Infine, l'insegnamento ha la finalità di rendere lo studente autonomo in laboratorio sia nella manualità che nell'interpretazione dei dati sperimentali.</i>
Prerequisiti	<i>Conoscenza di Biochimica ed elementi di enzimologia.</i>

<p>Metodi didattici</p>	<p>L'insegnamento non è erogato in modalità e-learning. La parte teorica del corso si effettua in aule dotate di pc, proiettore e connessione internet, avvalendosi di diapositive in powerpoint. I laboratori e le esercitazioni si effettuano presso i laboratori didattici del Labobiotech. Gli studenti operano in laboratorio in postazione singola, sotto la supervisione del docente, pertanto, si rende necessario suddividere il numero totale degli studenti in più gruppi.</p> <p>Le principali esperienze di laboratorio sono:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Saggio di attività enzimatica in campioni biologici; 2. Saggio spettrofotometrico per la determinazione enzimatica della concentrazione di un metabolita in campione biologico; 3. Estrazione di DNA plasmidico da culture di <i>E. Coli</i>; 4. Preparazione di terreni (solido e liquido) per batteri e loro sterilizzazione. Trasformazione batterica; 5. Espressione eterologa e purificazione; 6. SDS-PAGE; 7. Western Blot; 8. Misura del consumo di ossigeno in cellule eucariotiche e/o mitocondri.
<p>Risultati di apprendimento previsti</p> <p>DD1 Conoscenza e capacità di comprensione</p> <p>DD2 Conoscenza e capacità di comprensione applicate</p> <p>DD3-5 Competenze trasversali</p>	<p>DD1:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Acquisizione di adeguate conoscenze teoriche inerenti alle tecniche biochimiche per lo studio di macromolecole biologiche. ○ Analisi e interpretazione del dato sperimentale. <p>DD2:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ La consistente attività di laboratorio permetterà di saper usare tecniche biochimiche per lo studio di sistemi e componenti cellulari di interesse biotecnologico. <p>DD3:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ capacità di valutazione ed interpretazione del dato sperimentale di laboratorio sotto il profilo della sua valenza scientifica e rigore metodologico. ○ capacità di approfondire in modo autonomo gli aspetti più innovativi delle applicazioni biotecnologiche in campo medico e farmaceutico, e di raccogliere ed analizzare criticamente dati sperimentali; ○ capacità di giudizio nella valutazione della sicurezza di laboratorio in ambito chimico-biologico e biotecnologico. <p>DD4:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Acquisizione della terminologia scientifica relativa alle tecniche biochimiche per poter comprendere e comunicare con chiarezza l'attività sperimentale effettuata e i risultati ottenuti. <p>DD5:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ L'acquisizione delle capacità di risoluzione di problemi nell'ambito delle tecniche biochimiche per lo studio delle macromolecole biologiche potrà aiutare al raggiungimento di maggiori opportunità di inserimento nel mercato del lavoro.

Contenuti di insegnamento	
Programma	<p>Tecniche spettroscopiche: Proprietà della radiazione elettromagnetica, spettri di assorbimento atomico e molecolare, legge di Lambert-Beer, classificazione degli spettrofotometri: a raggio singolo, a doppio fascio e a doppia lunghezza d'onda; Struttura e funzione di sorgenti, monocromatori, portacampioni e rivelatori. Richiami di cinetica enzimatica, misura del coefficiente di estinzione molare, dosaggio dell'attività enzimatica, dosaggio del substrato, dosaggio dei complessi della catena respiratoria mitocondriale.</p> <p>Tecniche cromatografiche: Classificazione e principi. Fattori che influenzano il processo cromatografico: coefficiente di ripartizione, fattore di capacità, fattore di selettività ed efficienza della colonna. Cromatografia per ripartizione, scambio ionico, esclusione molecolare e per affinità. Sistemi biologici di biotecnologia molecolare.</p> <p>Espressione di proteine ricombinanti in organismi modello: terreni di coltura, vettori di espressione, operone lac, trasformazione batterica ed espressione di proteine eterologhe ricombinanti in E. coli e loro purificazione.</p> <p>Tecniche di centrifugazione: tecniche di centrifugazione preparativa e analitica, campo centrifugo e campo centrifugo relativo (uso del nomogramma), legge di Stokes e coefficiente di sedimentazione, centrifugazione differenziale e in gradiente di densità (zonale e isopicnica), tipologie di rotori.</p> <p>Analisi delle proteine mediante tecniche elettroforetiche: Classificazione e principi. Elettroforesi nativa, SDS-PAGE e calcolo del peso molecolare delle proteine, Focalizzazione isoelettrica (IEF), Blue PAGE nativa, Elettroforesi capillare, Elettroforesi bidimensionale, Elettroforesi su gel per differenza (DIGE), Metodi di colorazione.</p> <p>Tecniche immunochimiche: Produzione di anticorpi monoclonali e policlonali, immunoprecipitazione di proteine, western blot, ELISA.</p> <p>Purificazione delle proteine: omogeneizzazione e frazionamento di cellule e tessuti, preparazione di organelli; estrazione e solubilizzazione delle proteine (teoria e laboratorio). Metodi più comuni per la precipitazione delle proteine: variazione di temperatura, pH, forza ionica, costante dielettrica del solvente. Principali cause di inattivazione di un enzima: cause fisiche e chimiche.</p> <p>Obiettivi e strategie di purificazione: purificazione per scopi analitici o per scopi preparatori. Criteri di purezza di una proteina. Caratterizzazione di una proteina: punto isoelettrico, peso molecolare, composizione in aminoacidi.</p> <p>Ossigrafia e Bioenergetica: sensori di ossigeno: sensori elettrochimici (sensore Clark, ossigrafo, respirometro ad alta risoluzione) e sensori a fluorescenza (analizzatori Seahorse XF). Misura del consumo di ossigeno nelle sospensioni mitocondriali, nelle cellule eucariotiche intatte e nelle cellule eucariotiche permeabilizzate. Indice di controllo respiratorio. Inibitori dei complessi della catena respiratoria e disaccoppianti. Misurazione della velocità di produzione di ATP dalla glicolisi e dalla fosforilazione ossidativa (OXPHOS).</p>
Testi di riferimento	<p>Mauro Maccarrone - METODOLOGIE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI - Strumenti e tecniche per il laboratorio del nuovo millennio – Zanichelli METODOLOGIE BIOCHIMICHE - Espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine Seconda edizione – Zanichelli</p>
Note ai testi di riferimento	Integrare con le dispense delle lezioni e i protocolli distribuiti durante le esercitazioni in laboratorio.
Materiali didattici	Microsoft Teams e google drive

Valutazione	
Modalità di verifica	La valutazione delle conoscenze avviene tramite una prova orale da sostenere con entrambi i docenti.

<p>Criteri di valutazione</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Conoscenza e capacità di comprensione:</i> Verrà valutata l'acquisizione critica dei contenuti delle lezioni e la capacità di applicare tali conoscenze alle tecniche utilizzate nelle esercitazioni. • <i>Conoscenza e capacità di comprensione applicate:</i> Lo studente dovrà essere in grado di correlare le proprietà chimico-fisiche delle macromolecole biologiche con la scelta dell'opportuna tecnica di laboratorio da utilizzare. • <i>Autonomia di giudizio:</i> Lo studente dovrà essere in grado di organizzare autonomamente un ampio discorso che illustri una determinata tecnica di laboratorio biochimico e di come essa possa essere applicata per l'analisi quantitativa e qualitativa utilizzando campioni biologici. • <i>Abilità comunicative:</i> Lo studente dovrà essere in grado di utilizzare l'appropriata terminologia scientifica in maniera chiara e semplice, comprensibile anche a chi non avesse conoscenza approfondita della materia. • <i>Capacità di apprendere:</i> Lo studente dovrà essere in grado di correlare le nozioni acquisite integrandole e armonizzandole con i concetti precedentemente acquisiti nelle altre discipline correlate (es: fisica, chimica e biochimica).
<p>Criteri di misurazione dell'apprendimento e di attribuzione del voto finale</p>	<p>Il voto finale è espresso in trentesimi. L'esame si intende superato quando il voto è maggiore o uguale a 18/30. La conoscenza dei principi alla base delle principali tecniche di laboratorio biochimico e l'applicazione di esse è requisito indispensabile per il superamento dell'esame. L'utilizzo della corretta terminologia scientifica, la capacità di individuare le opportune tecniche di laboratorio per lo studio delle macromolecole, nonché la capacità di organizzare un discorso spaziando e correlando tra loro i diversi concetti acquisiti, concorreranno all'incremento del voto finale.</p>

Altro	

COURSE OF STUDY Medical and Pharmaceutical Biotechnology (L-2)
ACADEMIC YEAR 2024/2025
ACADEMIC SUBJECT Laboratory of biochemical and cellular bioenergetic technologies

General information	
Year of the course	3rd year
Academic calendar (starting and ending date)	1st semester; starting date: 7, October 2024; ending date 17, January 2025
Credits (CFU/ETCS):	5 (2+3)
SSD	BIO/10 Biochemistry
Language	Italian
Mode of attendance	Not compulsory for lessons, but compulsory for practical activities (minimum 75%)

Professor/ Lecturer	
Name and Surname	Vito Porcelli (Unità A) – Ruggiero Gorgoglione (Unità B)
E-mail	vito.porcelli@uniba.it – ruggiero.gorgoglione@uniba.it
Telephone	Porcelli: 0805442772 – Gorgoglione: 0805443551
Department and address	Department of Biosciences, Biotechnologies and Environment, University of Bari “Aldo Moro”, via Orabona, 4 Bari, Italy.
Virtual room	Porcelli Code Teams: dfwgux7 – Gorgoglione Code Teams: nqi4x56
Office Hours (and modalities: e.g., by appointment, on line, etc.)	Friday 9:00 - 12:00

Work schedule			
Hours			
Total	Lectures	Hands-on (laboratory, workshops, working groups, seminars, field trips)	Out-of-class study hours/ Self-study hours
125	16	36	73
CFU/ETCS			
5	2	3	

Learning Objectives	The course aims to provide adequate knowledge of the main biochemical techniques for the study of biological macromolecules. Particular attention will be given to mitochondrial bioenergetics. Finally, the teaching aims to make the student autonomous in the laboratory both in manual skills and in the interpretation of experimental data.
Course prerequisites	knowledge of general biochemistry

Teaching strategies	Teaching methods: Lectures and exercises are traditionally presented by the teacher in the classroom (no e-learning mode). The theoretical part of the course takes place in classrooms equipped with PC, projector and internet connection, using power point slides. The workshops and exercises are carried out in the Labobiotech educational laboratories. Students work in the laboratory in a single workstation; for this reason, the laboratory experience will be done dividing the students in two groups. Each student will use the principal techniques in the field of biochemistry under the supervision of teacher. The main laboratory experiences are: <ol style="list-style-type: none"> 1. Enzymatic activity assay in biological sample. 2. Spectrophotometric assay for determination of metabolite concentration. 3. Plasmid DNA extraction from <i>E. coli</i> culture.
----------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<ol style="list-style-type: none"> 4. Preparation and sterilization of medium specific for bacteria (liquid and solid), bacteria transformation. 5. Heterologous expression and purification. 6. SDS-PAGE. 7. Western Blot. 8. Measurement of oxygen consumption rate in eukaryotic cells or isolated mitochondria.
Expected learning outcomes in terms of	
Knowledge and understanding on:	<ul style="list-style-type: none"> • The course intends to provide appropriate knowledge of the main biochemical techniques for the study of biological macromolecules. • Analysis and interpretation of the experimental data.
Applying knowledge and understanding on:	The substantial laboratory activity intends to provide basic skills on the main biochemical techniques for the study of cellular system and components of biological interest.
Soft skills	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Making informed judgments and choices</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ The ability to evaluate and interpret the experimental data in terms of its scientific value and methodological rigor; ○ The bases for an autonomous investigation of the most innovative aspects of biotechnological applications in the medical and pharmaceutical fields; ○ The ability to collect and critically analyze experimental data; • <i>Communicating knowledge and understanding</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Acquisition of scientific terminology relating to biochemical techniques, in order to understand and clearly communicate the experimental activity carried out and the results obtained in the laboratory experiences. • <i>Capacities to continue learning</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Acquisition of problem solving skills in the field of biochemical techniques for the study of biological macromolecules as well as the use of databases for the interpretation of data and consultation of scientific articles.

Syllabus	
Content knowledge	<p>Spectroscopic techniques: Properties of electromagnetic radiation, atomic and molecular absorption spectra, Lambert-Beer law, classification of spectrophotometers: single beam, double beam and double wavelength; Structure and function of sources, monochromators, sample holders and detectors. Review of enzymatic kinetics, measurement of the molar extinction coefficient (theory and laboratory), dosage of enzymatic activity (theory and laboratory), dosage of the substrate (theory and laboratory), dosage of mitochondrial respiratory chain complexes.</p> <p>Chromatographic techniques: Classification and principles. Factors influencing the chromatographic process: partition coefficient, capacity factor, selectivity factor and column efficiency. Chromatography by partition, ion exchange, molecular exclusion and by affinity. Biological Systems of Molecular Biotechnology.</p> <p>Expression of recombinant proteins in model organisms: culture media, expression vectors, lac operon, bacterial transformation and expression of recombinant heterologous proteins in <i>E. coli</i> and their purification.</p> <p>Centrifugation techniques: preparative and analytical centrifugation techniques, centrifugal field and relative centrifugal field (use of nomogram), Stokes' law and sedimentation coefficient, differential and density gradient centrifugation (zonal and isopycnic), types of rotors.</p> <p>Protein analysis by electrophoretic techniques: Classification and principles. Native electrophoresis, SDS-PAGE and calculation of the molecular weight of proteins, isoelectric focusing (IEF), Blue native PAGE, capillary electrophoresis, two-dimensional electrophoresis, Difference in Gel Electrophoresis (DIGE), Staining methods.</p> <p>Immunochemical techniques: Production of monoclonal and polyclonal antibodies, immunoprecipitation of proteins, western blot (theory and laboratory), ELISA.</p> <p>Protein purification: homogenization and fractionation of cells and tissues, preparation of organelles; extraction and solubilization of proteins (theory and laboratory). Most common methods for protein precipitation: temperature variation, pH, ionic strength, dielectric constant of the solvent. Main causes of inactivation of an enzyme: physical and chemical causes; methods of prevention.</p> <p>Purification objectives and strategies: purification for analytical purposes or for preparatory purposes. Purity criteria of a protein. Characterization of a protein: isoelectric point, molecular weight, composition in amino acids.</p> <p>Oxygraphy and Bioenergetics: oxygen sensors: electrochemical sensors (Clark sensor, Oxygraph, high resolution respirometer) and fluorescence sensors (Seahorse XF Analyzers). Measurement of oxygen consumption in mitochondrial suspensions, in intact eukaryotic cells and in permeabilized eukaryotic cells (theory and laboratory). Respiratory control index. Inhibitors of respiratory chain complexes and uncouplers. Measurement of the rate of ATP production from glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS). Fluorescence techniques: measurement of the mitochondrial membrane potential by JC-1, rhodamine 123 (R123), tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) and tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE).</p>
Texts and readings	<p>Mauro Maccarrone - METODOLOGIE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI - Strumenti e tecniche per il laboratorio del nuovo millennio - Zanichelli</p> <p>METODOLOGIE BIOCHIMICHE - Espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine Seconda edizione - Zanichelli</p>
Notes, additional materials	<p>Integrate with notes taken during the lesson.</p> <p>The pdf files relating to the lessons are available.</p>
Repository	<p>Microsoft Teams and google drive</p>
Assessment	
Assessment methods	<p>The examination consists in oral test based on the course contents.</p>

Assessment criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Knowledge and understanding The critical acquisition of the contents will be assessed. Furthermore, students must be able to apply the knowledge described during the course to the techniques used in the laboratory experience. • Applying knowledge and understanding Students must be able to correlate the chemical and physical properties of biological macromolecules with the choice of the appropriate laboratory technique. • Autonomy of judgment Students must be able to autonomously organize a talk on a specific biochemical laboratory technique and how this technique can be applied for quantitative and qualitative analyzes using biological samples. • Communicating knowledge and understanding Students must be able to use the correct form to describe the contents of course using scientific terminology. • Communication skills Students must be able to use the correct form to describe the techniques using scientific terminology, moreover the discussion of contents must be clear and simple for people of the field and not. • Capacities to continue learning Students must be able to integrate the theoretical knowledge of biochemistry, also acquired in other courses, with the experimental activities carried out in this course to increase the knowledge of the basic techniques of biochemistry.
Final exam and grading criteria	<p>The final grade is expressed out of thirty. The exam is passed when the grade is greater than or equal to 18/30. Knowledge of the main laboratory techniques in the field of biochemistry is a prerequisite for passing the exam. The use of correct scientific terminology, the ability to identify the appropriate laboratory techniques for the study of macromolecules, as well as the ability to organize a discourse, correlating the various concepts acquired, will contribute to the increase of the final grade.</p>
Further information	