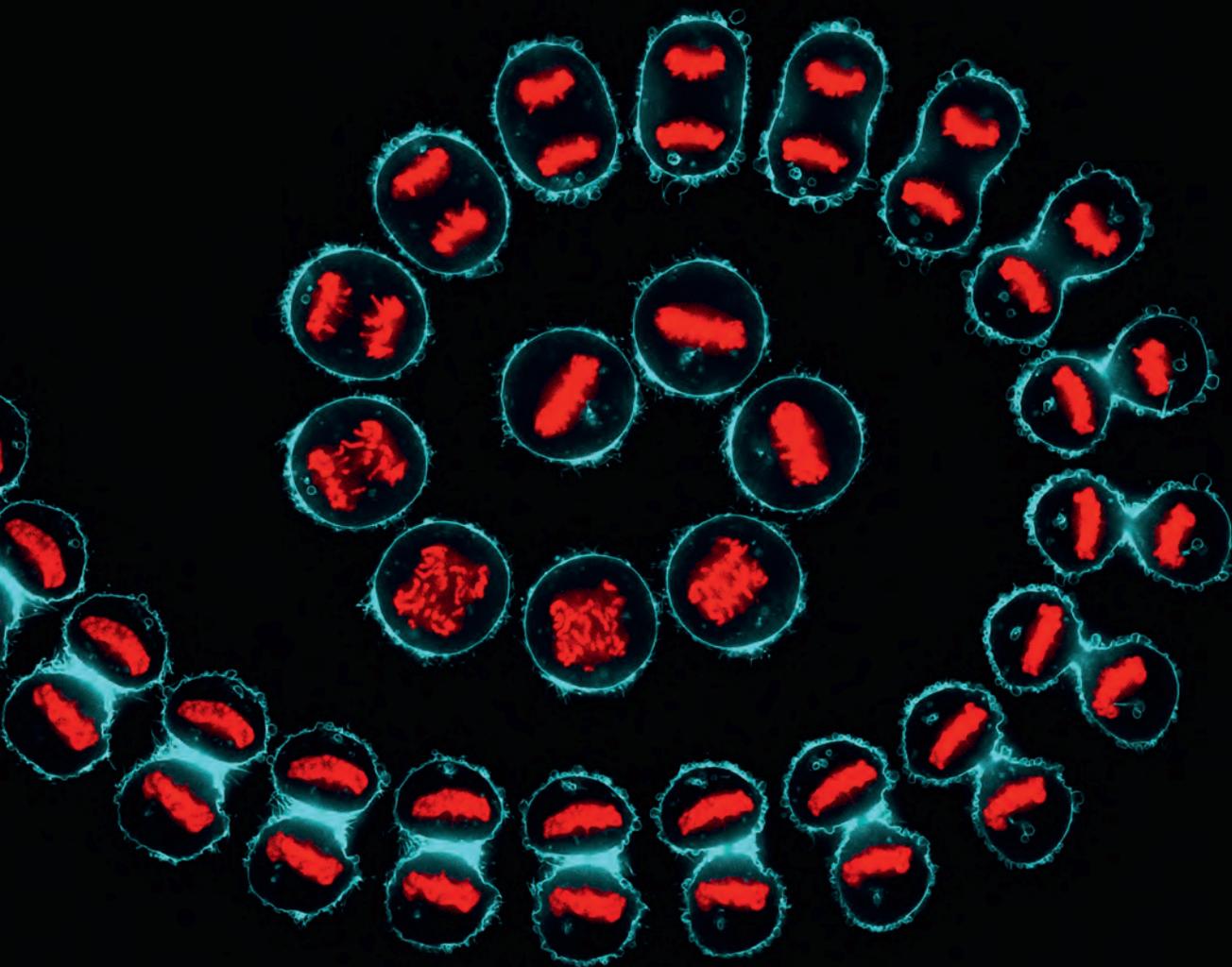


Mauro Maccarrone

Metodologie biochimiche e biomolecolari

Strumenti e tecniche per il laboratorio
del nuovo millennio



BIOCHIMICA

ZANICHELLI

Mauro Maccarrone

Metodologie biochimiche e biomolecolari

Strumenti e tecniche per il laboratorio
del nuovo millennio

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca la tua chiave di attivazione stampata in verticale sul bollino argentato in questa pagina.
7. Inseriscila nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati di altri volumi ti serve solo la relativa chiave di attivazione.

Indice generale

Prefazione

XV

Parte A

Metodologie biochimiche

CAPITOLO 1

Introduzione alle metodologie biochimiche e biomolecolari

3

di Annalaura Sabatucci e Mauro Maccarrone

- 1.1** L'indagine biochimica e biomolecolare 3
- 1.2** Il metodo scientifico 3
 - 1.2.1 Il quaderno di laboratorio 5
- 1.3** Le misure e la notazione scientifica 5
 - 1.3.1 Le unità di misura 5
 - 1.3.2 La capacità 6
- 1.4** L'errore 6
 - 1.4.1 La sensibilità e l'incertezza intrinseca 7
 - 1.4.2 La precisione e l'accuratezza 7
- 1.5** L'analisi statistica 8
 - 1.5.1 La media e la deviazione standard 8
 - 1.5.2 L'analisi inferenziale 8
 - 1.5.3 I test di adattamento 10

CAPITOLO 2

Sicurezza in laboratorio

11

di Annalaura Sabatucci e Mauro Maccarrone

- 2.1** Il rischio 11
- 2.2** Le sostanze chimiche pericolose 11
 - 2.2.1 Classificazione ed etichettatura 11
 - 2.2.2 Le etichette 12
 - 2.2.3 La scheda di sicurezza 14
 - 2.2.4 Lo smaltimento 14
- 2.3** I dispositivi di protezione individuale 15
- 2.4** La buona pratica di laboratorio 15
- 2.5** La radioprotezione 16

CAPITOLO 3

Allestimento del laboratorio	19
<i>di Filomena Fezza e Mauro Maccarrone</i>	
3.1 Introduzione	19
3.2 Vetreria e plasticheria	19
3.3 Strumentazione di base	19
3.3.1 pHmetro	19
3.3.2 Bilance	20
3.3.3 Sistemi di refrigerazione	20
3.3.4 Cappe chimiche	20
3.3.5 Armadi di sicurezza	20
3.3.6 Centrifughe	21
3.3.7 Agitatori e piastre riscaldanti	21
3.3.8 Stufe	21
3.3.9 Micropipette di precisione	21
3.3.10 Spettrofotometro	22
3.4 Laboratorio per le colture cellulari	22
3.4.1 Cappe a flusso laminare	22
3.4.2 Incubatori	23
3.4.3 Autoclave	23
3.4.4 Microscopi	23
3.4.5 Bagnetto termostato	24
3.5 Principi di biosicurezza	24

CAPITOLO 4

Volumetria e pesate	26
<i>di Clotilde Beatrice Angelucci e Roberto Giacomini Stuffer</i>	
4.1 Introduzione	26
4.2 Preparazione delle soluzioni	26
4.3 Modi per indicare la concentrazione di una soluzione	27
4.4 Linee guida per l'utilizzo della strumentazione di laboratorio	29
4.4.1 Classificazione della vetreria	29
4.4.2 Modi per misurare il volume e la massa	30
4.5 Lavaggio della vetreria	34

CAPITOLO 5

Tecniche centrifugative	35
<i>di Cinzia Rapino e Mauro Maccarrone</i>	
5.1 Scopo delle tecniche centrifugative	35
5.2 Principi generali della sedimentazione	36
5.2.1 Principali metodi di separazione per centrifugazione	38
5.2.2 Centrifugazione differenziale	38
5.2.3 Centrifugazione in gradiente di densità: centrifugazione zonale e isopicnica	39

5.3	Strumentazione utilizzata nelle tecniche centrifugative	40
5.3.1	Piccole centrifughe da banco	41
5.3.2	Centrifughe refrigerate a grande capacità	42
5.3.3	Centrifughe refrigerate ad alta velocità	42
5.3.4	Ultracentrifughe preparative	42
5.3.5	Ultracentrifughe analitiche	42
5.4	Tipi di rotori e manutenzione	42
5.4.1	Rotori ad angolo fisso	42
5.4.2	Rotori a bracci oscillanti	43
5.4.3	Rotori per tubi ad alloggiamento verticale	43
5.4.4	Contenitori del campione	43
5.4.5	Cura dell'attrezzatura per la centrifugazione	43
5.5	Applicazioni della centrifugazione nelle industrie farmaceutiche	44
5.5.1	Produzione di farmaci sfusi (<i>bulk drugs</i>)	44
5.5.2	Produzione di materiale biologico	44
5.5.3	Valutazione di sospensioni ed emulsioni	44
5.5.4	Determinazione del peso molecolare dei polimeri	44

CAPITOLO 6

	Tecniche spettroscopiche	45
	<i>di Gianfranco Gilardi</i>	
6.1	Spettroscopia	45
6.1.1	Radiazione elettromagnetica	45
6.1.2	Interazione della radiazione elettromagnetica con la materia	46
6.2	Spettroscopia di assorbimento della radiazione nell'ultravioletto e nel visibile	48
6.2.1	Livelli energetici e transizioni elettroniche	49
6.2.2	Cromofori e metalli di transizione nelle biomolecole	50
6.2.3	Applicazioni alle proteine	51
6.3	Fluorescenza	53
6.3.1	Spettri di eccitazione ed emissione	53
6.3.2	Tempi di vita e resa quantica	54
6.3.3	Polarizzazione	55
6.3.4	Effetto dell'intorno molecolare sulla fluorescenza e "quenching"	55
6.3.5	Fluorescenza risolta nel tempo	57
6.3.6	Misure di dinamica molecolare	57
6.3.7	Depolarizzazione della fluorescenza	58
6.3.8	Determinazione della distanza tra fluorofori nelle biomolecole	60
6.4	Spettroscopia di assorbimento della radiazione nell'infrarosso (IR)	62
6.4.1	Misura dello spettro IR	64
6.4.2	Assorbimento IR delle proteine e determinazione della struttura secondaria	65

CAPITOLO 7

Tecniche cromatografiche	68
<i>di Gennaro Agrimi e Luigi Palmieri</i>	
7.1 Introduzione e principi generali	68
7.2 Tempo di ritenzione e risoluzione cromatografica	69
7.2.1 Selettività	70
7.2.2 Fattore di capacità	70
7.2.3 Efficienza della colonna cromatografica	70
7.3 Tipologie di cromatografia su colonna	72
7.3.1 Cromatografia a scambio ionico (IEC)	72
7.3.2 Cromatografia a esclusione molecolare o gel-filtrazione (SEC)	74
7.3.3 Cromatografia di affinità (AC)	76
7.3.4 Cromatografia di partizione (PC)	78
7.3.5 Cromatografia di adsorbimento (AdC)	79
7.4 HPLC	80

CAPITOLO 8

Tecniche elettroforetiche	84
<i>di M. Eugenia Schininà e Alessandra Giorgi</i>	
8.1 Scopo della metodica	84
8.2 Principi generali	84
8.2.1 Grandezze e relazioni matematiche	85
8.2.2 Fattori che influenzano la migrazione elettroforetica	86
8.2.3 Principali tecniche elettroforetiche	87
8.3 Strumentazione	90
8.3.1 Apparati per elettroforesi zonale	90
8.3.2 Strumentazioni per l'elettroforesi capillare	92
8.4 Applicazioni e rilevanza biomedica	93
8.4.1 Il protidogramma	93
8.4.2 Diagnosi molecolare di emoglobinopatie	93
8.4.3 Determinazione del peso molecolare delle macromolecole	94
8.4.4 Elettrotrasferimento	95
8.4.5 Analisi di polimorfismi genetici	96
8.4.6 Studio di interazioni tra acidi nucleici e proteine	97
8.4.7 Mappe proteomiche	97
<i>In laboratorio 8.1 Elettroforesi in fase liquida (o a fronte mobile)</i>	98
<i>In laboratorio 8.2 Elettroforesi zonale</i>	99
<i>In laboratorio 8.3 Focalizzazione isoelettrica (IEF)</i>	100
<i>In laboratorio 8.4 SDS-PAGE e analisi delle proteine</i>	101
<i>In laboratorio 8.5 Elettroforesi capillare</i>	102
<i>In laboratorio 8.6 Elettroforesi e analisi degli acidi nucleici</i>	103

CAPITOLO 9

Tecniche radiochimiche	104
<i>di Anna Maria Sardanelli e Antonio Gnoni</i>	
9.1 La radiochimica	104

9.2	Gli isotopi	104
9.2.1	Decadimento radioattivo ed energia delle radiazioni	105
9.2.2	Unità di misura	109
9.3	Strumentazione	110
9.3.1	Rivelatori a gas	110
9.3.2	Contatori a scintillazione	110
9.4	Applicazioni dei radioisotopi	111
9.4.1	La diluizione isotopica	111
9.4.2	Radioimmunologia (RIA e IRMA)	112
9.4.3	Autoradiografia	114
9.4.4	Diagnostica <i>in vivo</i>	114
9.5	Norme per l'uso di radioisotopi	115

CAPITOLO 10

	Tecniche immunochimiche	117
	<i>di Paola Bruni e Francesca Cencetti</i>	
10.1	Scopo della metodica	117
10.2	Principi generali	118
10.2.1	Test di precipitazione	120
10.2.2	Test di agglutinazione	122
10.2.3	I dosaggi immunologici	122
10.2.4	Dosaggi immunometrici e immunodosaggi competitivi	123
10.2.5	Immunoblotting	124
10.2.6	Immunoistochimica e immunofluorescenza	125
10.2.7	Citofluorimetria a flusso	126
10.3	Strumentazione	126
10.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	128

Parte B

Metodologie biomolecolari

CAPITOLO 11

	Isolamento del DNA e Southern blot	133
	<i>di Alessandro Terrinoni</i>	
11.1	La tecnica del Southern blot	133
11.2	Estrazione del DNA	133
11.3	Utilizzo della tecnica del Southern blot in biologia molecolare	135
11.3.1	Prima fase: digestione e corsa elettroforetica	135
11.3.2	Seconda fase: trasferimento del DNA	137
11.3.3	Problematiche del trasferimento	138
11.4	Terza fase: ibridazione del DNA	138
11.4.1	Marcatura della sonda	138
11.4.2	Ibridazione	139
11.5	Stringenza	139
11.6	Rilevazione del segnale	139

CAPITOLO 12

Isolamento dell'RNA e Northern blot	141
<i>di Alessandro Terrinoni</i>	
12.1 La tecnica del Northern blot	141
12.2 Estrazione dell'RNA	141
12.3 Utilizzo della tecnica del Northern blot in biologia molecolare	142
12.4 Precauzioni nel trattamento dell'RNA	142
12.5 Fasi del Northern blot	143
12.5.1 Corsa dell'RNA in condizioni denaturanti	144
12.5.2 Trasferimento dell'RNA	145
12.5.3 Marcatura della sonda	145
12.5.4 Ibridazione	145
12.5.5 Rilevazione del segnale	146

CAPITOLO 13

Amplificazione mediante PCR	147
<i>di Mauro Magnani e Michele Menotta</i>	
13.1 Scopo della metodica	147
13.2 Principi generali	147
13.2.1 Miscela di reazione	149
13.2.2 Procedimento	149
13.2.3 Fattori limitanti	150
13.2.4 Protocolli a due temperature	150
13.2.5 Ottimizzazione del processo	150
13.2.6 Varianti della PCR	152
13.2.7 Analisi dei prodotti di PCR	152
13.3 Strumentazione	152
13.3.1 Termociclatore	153
13.4 Applicazioni e rilevanza biomedica	153

CAPITOLO 14

Clonaggio molecolare	156
<i>di Serena Rinaldo, Giorgio Giardina e Francesca Cutruzzolà</i>	
14.1 Scopo del clonaggio molecolare	156
14.2 Principi generali	157
14.2.1 Isolamento del gene	157
14.2.2 Scelta e preparazione del vettore	158
14.2.3 Metodi di clonaggio	158
14.3 Strumentazione	164
14.4 Applicazioni e rilevanza biomedica	165

CAPITOLO 15

Vettori di espressione	167
<i>di Giovanni Antonini e Manuela Cervelli</i>	
15.1 Scopo della metodica	167

15.2	Principi generali	168
15.2.1	Vettori di espressione in <i>Escherichia coli</i>	168
15.2.2	Vettori di espressione in lievito	170
15.2.3	Vettori di espressione in cellule di insetto	171
15.2.4	Vettori di espressione in cellule animali	174
15.2.5	Vettori di espressione in cellule vegetali	175
15.3	Strumentazione	180
15.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	180

CAPITOLO 16

	Trasfezione cellulare	181
	<i>di Monica Bari e Mauro Maccarrone</i>	181
16.1	Trasfezione	181
16.1.1	Modello cellulare	181
16.1.2	Cellule adese e in sospensione	182
16.1.3	Colture cellulari primarie e immortalizzate	182
16.2	Tecnica	183
16.2.1	Metodi chimici	184
16.2.2	Metodi biologici	184
16.2.3	Metodi fisici	184
16.2.4	Trasfezione transiente e stabile	185
16.3	Strumentazione	186
16.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	187

CAPITOLO 17

	Basi di epigenetica: focus sullo studio della metilazione del DNA gene-specifica	188
	<i>di Claudio D'Addario e Mariangela Pucci</i>	
17.1	Epigenetica	188
17.2	Metilazione del DNA	189
17.3	Valutazione dello stato di metilazione	190
17.3.1	Digestione con endonucleasi sensibili a metilazione	190
17.3.2	Trattamento con bisolfito di sodio	191
17.4	Pirosequenziamento	192
17.4.1	Analisi dei risultati	195
17.5	Applicazioni e rilevanza biomedica	195

CAPITOLO 18

	Silenziamento e overespressione genica	197
	<i>di Michele Sallese e Vincenzo De Laurenzi</i>	
18.1	Perché modificare i livelli di espressione di un gene?	197
18.2	Silenziamento genico	197
18.2.1	Silenziamento genico con oligonucleotidi antisenso	197
18.2.2	Silenziamento genico tramite RNAi	199
18.2.3	Overespressione genica	201
18.3	Applicazioni terapeutiche del silenziamento e dell'overespressione genica	202

CAPITOLO 19

Tecnologia CRISPR	206
<i>di Michele Sallese e Vincenzo De Laurenzi</i>	
19.1 Scopo della tecnologia CRISPR/Cas9	206
19.2 Editing genomico	206
19.2.1 Dagli enzimi di restrizione all'editing genomico	206
19.2.2 La scoperta del sistema CRISPR/Cas9	207
19.2.3 CRISPR/Cas9 per modificare il genoma umano	208
19.2.4 Isolamento di cellule con DNA modificato	209
19.2.5 Principali problematiche associate all'uso del sistema CRISPR/Cas9	210
19.3 Ulteriori utilizzi di CRISPR/Cas9	210
19.4 Applicazioni biotecnologiche e clinico-terapeutiche di CRISPR/Cas9	211

CAPITOLO 20

Bioinformatica	214
<i>di Rita Casadio e Pier Luigi Martelli</i>	
20.1 Premessa	214
20.2 L'annotazione funzionale	214
20.2.1 La funzione proteica in bioinformatica	215
20.2.2 La banca dati di termini Gene Ontology (GO)	215
20.3 La superfamiglia delle amminotrasferasi	218
20.4 Le famiglie proteiche	219
20.5 Le basi teoriche del processo di annotazione	220
20.5.1 Come risolvere il problema dell'annotazione funzionale	220
20.5.2 I casi difficili	222
20.6 Conclusioni	223

Parte C

Parte speciale

CAPITOLO 21

Produzione di anticorpi policlonali e monoclonali	227
<i>di Sergio Oddi, Lucia Scipioni e Mauro Maccarrone</i>	
21.1 Scopo della metodica	227
21.2 Principi generali e strumentazione	228
21.2.1 Produzione di anticorpi policlonali	228
21.2.2 Produzione di anticorpi monoclonali	230
21.2.3 Produzione di anticorpi ingegnerizzati	231
21.3 Applicazioni e rilevanza biomedica	231
21.3.1 Tecniche preparative	232
21.3.2 Tecniche analitiche	232
21.3.3 Applicazioni diagnostiche e terapeutiche	232

CAPITOLO 22

Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa*di Fabiana Piscitelli e Tiziana Bisogno*

22.1	Introduzione	233
22.2	La tecnica LC-MS	233
22.3	Lo spettrometro di massa	234
	22.3.1 Sorgenti ioniche	234
	22.3.2 Analizzatori	236
22.4	Modalità di acquisizione	237
	22.4.1 Full scan MS	238
	22.4.2 Selected Ion Monitoring	238
	22.4.3 Product ion scan	238
	22.4.4 Selected Reaction Monitoring e Multiple Reaction Monitoring	238
	22.4.5 Neutral Loss Scan	238
	22.4.6 Precursor Ion Scan	239
22.5	Applicazioni	239
	22.5.1 Screening biochimico per i disordini genetici	239
	22.5.2 Tossicologia forense	239

CAPITOLO 23

Biologia strutturale*di Martino Bolognesi, Giovanna Musco e Paolo Swuec*

23.1	Scopo della metodica	241
23.2	Principi generali	242
	23.2.1 Cristallografia a raggi X	242
	23.2.2 Risonanza magnetica nucleare in soluzione	244
	23.2.3 Crio-microscopia elettronica	248
23.3	Strumentazione	252
	23.3.1 Cristallografia a raggi X	252
	23.3.2 Risonanza magnetica nucleare	255
	23.3.3 Crio-microscopia elettronica	256
	23.3.4 Analisi tramite TEM	257
23.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	258

CAPITOLO 24

Metodica SAXS*di Enrico Dainese*

24.1	Scopo della metodica	261
24.2	Principi generali	262
24.3	Strumentazione	266
24.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	268

CAPITOLO 25

Citofluorimetria*di Valerio Chiurchiù e Mauro Maccarrone*

25.1	Introduzione alla citofluorimetria	270
25.2	Principi di base della citofluorimetria	270

25.3	Strumentazione: il citofluorimetro e le sue componenti	271
25.3.1	Sistema fluidico	272
25.3.2	Sistema ottico	272
25.3.3	Sistema elettronico	273
25.4	Marcatori fluorescenti	274
25.5	Vantaggi e limiti della citofluorimetria	275
25.6	Applicazioni e rilevanza biomedica della citofluorimetria	276

CAPITOLO 26

Analisi al citofluorimetro	279	
<i>di Valerio Chiurchiù</i>		
26.1	Preparazione dei campioni	279
26.2	Marcatura delle cellule	279
26.2.1	Marcatura di superficie e intracellulare	280
26.2.2	Scelta dei fluorocromi	280
26.2.3	Compensazione	281
26.3	Rappresentazione dei dati citofluorimetrici	281
26.3.1	Software di analisi	282
26.3.2	Strategia di <i>gating</i> e analisi dei dati	282
26.4	Esempi di analisi citofluorimetrica	284
26.4.1	Immunofenotipizzazione	284
26.4.2	Ciclo cellulare	285
26.4.3	Apoptosi e necrosi	286
26.4.4	Produzione di citochine	287

CAPITOLO 27

Analisi in <i>live imaging</i>	289	
<i>di Lucia Scipioni e Sergio Oddi</i>	289	
27.1	Scopo della metodica	289
27.2	Principi generali	289
27.3	Strumentazione	292
27.3.1	Scelta del microscopio	292
27.3.2	Scelta del fluoroforo	293
27.3.3	Camere di <i>imaging</i>	293
27.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	294

CAPITOLO 28

Risonanza plasmonica di superficie e tecniche <i>label-free</i>	295	
<i>di Enrico Dainese</i>		
28.1	Scopo della metodica	295
28.2	Principi generali	296
28.3	Strumentazione	299
28.4	Applicazioni e rilevanza biomedica	301

CAPITOLO 29

Metodiche per l'analisi trascrittomiche	302
<i>di Daniele F. Condorelli, Vincenza Barresi e Giacomo Cinnirella</i>	
29.1 Trascrittomiche	302
29.2 Microarray per lo studio dell'espressione genica	302
29.2.1 Microarray fotolitografici	302
29.2.2 3' Expression array	303
29.2.3 Whole transcript expression array	304
29.3 RNA-Seq	306
29.4 Analisi dell'espressione genica differenziale	307
29.4.1 Analisi dei dati da microarray di espressione	307
29.4.2 Analisi dei dati da RNA-Seq	308

CAPITOLO 30

Applicazioni delle metodologie biomolecolari in biochimica clinica	310
<i>di Rosario Ammendola, Gabriella Esposito e Fabio Cattaneo</i>	
30.1 PCR digitale	310
30.1.1 Scopo della metodica	310
30.1.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	310
30.2 Citofluorimetria	313
30.2.1 Scopo della metodica	313
30.2.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	314
30.2.3 Limiti della metodica	316
30.3 Trascrittomiche	316
30.3.1 Scopo della metodica	316
30.3.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	316
30.3.3 Limiti della metodica	317
30.4 Metabolomica	317
30.4.1 Scopo della metodica	317
30.4.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	318
30.4.3 Limiti della metodica	320

Parte D

Eserciziario

Parte A – Esercizi di metodologie biochimiche	325
Parte B – Esercizi di metodologie biomolecolari	331
Parte C – Esercizi sulla parte speciale	337
Risposte agli esercizi	343
Glossario	357
Indice analitico	379

Prefazione

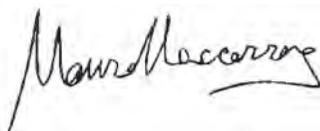
L'importanza delle "Metodologie biochimiche e biomolecolari" nella formazione scientifica moderna è testimoniata dal fatto che questa materia viene insegnata, sia pure con denominazioni differenti, nella maggior parte (se non in tutti) i corsi di laurea triennali e magistrali delle classi di Scienze Biologiche e Biotecnologie, oltre che in quelle biomediche in senso più lato. La platea di studenti interessati ad apprendere l'argomento è, quindi, assai ampia e per molti allievi una chiara comprensione dei principi di base dei metodi usati nei laboratori biomedici è uno strumento professionalizzante essenziale.

Per questo motivo ho ritenuto importante immaginare un testo che, in modo semplice ma rigoroso e completo, descrivesse le metodologie più attuali per la ricerca (sia di base sia clinica) e per l'attività diagnostica. Il piano dell'opera ha previsto, quindi, una suddivisione in tre parti: le prime due descrivono le metodologie biochimiche e biomolecolari più importanti (in 10 capitoli ciascuna), descrivendo lo scopo di ogni metodica, i suoi principi generali, la strumentazione e le applicazioni di maggior rilevanza. La terza parte, anch'essa di 10 capitoli, è una sezione speciale che tratta tecnologie impiegate in laboratori più specialistici, da quelle proprie della biologia strutturale a quelle citofluorimetriche. Inoltre, si è lasciato spazio anche alla descrizione di argomenti che sono sempre più importanti per una corretta applicazione dei metodi biochimici e biomolecolari, come i principi di sicurezza nella buona pratica di laboratorio, l'analisi bioinformatica dei dati e le applicazioni specifiche in biochimica clinica. Esercizi e contenuti multimediali completano la presentazione di ogni argomento e sono intesi come approfondimento e strumento di autoverifica dell'apprendimento.

Non sorprenderà che la realizzazione di un testo così ambiziosamente completo non sarebbe stata possibile senza il contributo di un congruo numero di esperti di ciascuna metodica. A loro va il mio più sincero ringraziamento per l'immediata adesione al progetto editoriale e per la passione con cui mi hanno aiutato a realizzarlo. All'Editore Zanichelli e ai suoi collaboratori della Redazione scientifica - Divisione Universitaria va, invece, il mio riconoscimento per la cura con cui hanno corretto le bozze e seguito la pubblicazione dell'opera in tutti i suoi dettagli, aggiungendo quel tasso di professionalità che solo la più alta tradizione editoriale italiana poteva garantire.

Non mi resta che augurare a tutti coloro che leggeranno il libro di poter considerare ben speso il tempo che gli dedicheranno, ponendo naturalmente al primo posto gli studenti, che spero lo trovino uno strumento efficace per navigare il *mare magnum* del sapere metodologico in biomedicina. Ringrazio in anticipo per ogni segnalazione di inesattezze che mi perverrà, così da poter migliorare ciò che non sarebbe mai stato pubblicato se ne avessi minimamente preteso la perfezione.

Roma, 6/05/2019



Prof. Mauro Maccarrone, Ordinario di Biochimica
Facoltà Dipartimentale di Medicina e Chirurgia
Università Campus Bio-Medico di Roma

Parte A

Metodologie biochimiche

Capitolo 1	Introduzione alle metodologie biochimiche e biomolecolari	3
Capitolo 2	Sicurezza in laboratorio	11
Capitolo 3	Allestimento del laboratorio	19
Capitolo 4	Volumetria e pesate	26
Capitolo 5	Tecniche centrifugative	35
Capitolo 6	Tecniche spettroscopiche	45
Capitolo 7	Tecniche cromatografiche	68
Capitolo 8	Tecniche elettroforetiche	84
Capitolo 9	Tecniche radiochimiche	104
Capitolo 10	Tecniche immunochimiche	117

Introduzione alle metodologie biochimiche e biomolecolari

di Annalaura Sabatucci e Mauro Maccarrone

1.1 L'indagine biochimica e biomolecolare

Lo scopo dell'indagine biochimica e biomolecolare è chiarire i meccanismi che regolano la vita in termini macromolecolari. Dunque, attraverso questo tipo di indagine possiamo conoscere la natura (*struttura*) e le interazioni (*funzione*) che si stabiliscono tra le macromolecole biologiche (carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici), capaci di permettere il funzionamento di un organismo vivente.

La conoscenza dei meccanismi d'azione di tali molecole si acquisisce mediante l'applicazione di tecniche analitiche e separative, da quelle tradizionali e imprescindibili, come le tecniche centrifugative, spettroscopiche, cromatografiche, immunochimiche o elettroforetiche, a quelle più moderne e sofisticate, quali per esempio la spettrometria di massa, la spettroscopia di risonanza plasmonica, l'NGS e la CRISPR/Cas9, tutte descritte in questo testo.

I risultati delle indagini biochimiche e biomolecolari trovano applicazione in vari campi, dalla diagnostica alla terapia di patologie sia umane sia animali, ai vari settori dell'industria (si pensi ai settori agroalimentare o spaziale). Essi permettono, per esempio, di:

- determinare la struttura e la funzione di metaboliti, enzimi e recettori coinvolti sia in processi fisiologici sia in patologie infiammatorie, neurodegenerative e tumorali;
- identificare nuovi marcatori molecolari da impiegare nella diagnosi clinica;
- disegnare nuovi farmaci sempre più efficaci e specifici per il bersaglio molecolare d'interesse;
- migliorare le conoscenze sui meccanismi alla base della regolazione genica;
- comprendere le cause di malattie genetiche e metaboliche.

Non sorprende il fatto che tutte le metodologie biochimiche e biomolecolari debbano rispettare le regole delle scienze esatte: matematica, fisica, chimica e statistica. In questo capitolo verranno richiamati alcuni concetti indispensabili per la comprensione degli argomenti che verranno trattati in dettaglio negli altri capitoli del testo.

1.2 Il metodo scientifico

Come si progetta un esperimento di tipo biologico-molecolare? Come si ottengono i risultati? Applicando il **metodo scientifico** (o metodo sperimentale) introdotto da Galileo Galilei, che può essere schematizzato brevemente come mostrato nella **Figura 1.1**.

Preparazione

1. Livello zero: l'idea. Identificazione dell'oggetto della ricerca. Si individua un problema da risolvere e si formulano ipotesi da verificare o domande che necessitano di risposta. A questo punto si procede per passi successivi.

2. Si inizia dalla valutazione dello stato dell'arte (la letteratura). Mediante la ricerca bibliografica di letteratura scientifica (principalmente su siti dedicati, per esempio PUBMED, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), si verifica se qualcun altro non abbia già dato una risposta al problema che ci si è posti. Se ciò non è avvenuto, si può procedere.

Progettazione

1. Si disegna, quindi, un piano sperimentale: si identifica il sistema biologico da utilizzare (per esempio cellule in coltura o analisi di laboratorio *in vitro* o *in vivo*) e si individuano tutte le variabili da studiare e da tenere in considerazione durante la fase sperimentale.
2. Si progettano le fasi sperimentali, scegliendo le metodologie adatte alla risoluzione del problema.
3. Si valutano i potenziali problemi economici e di sicurezza.

Fase sperimentale (finalmente in laboratorio!)

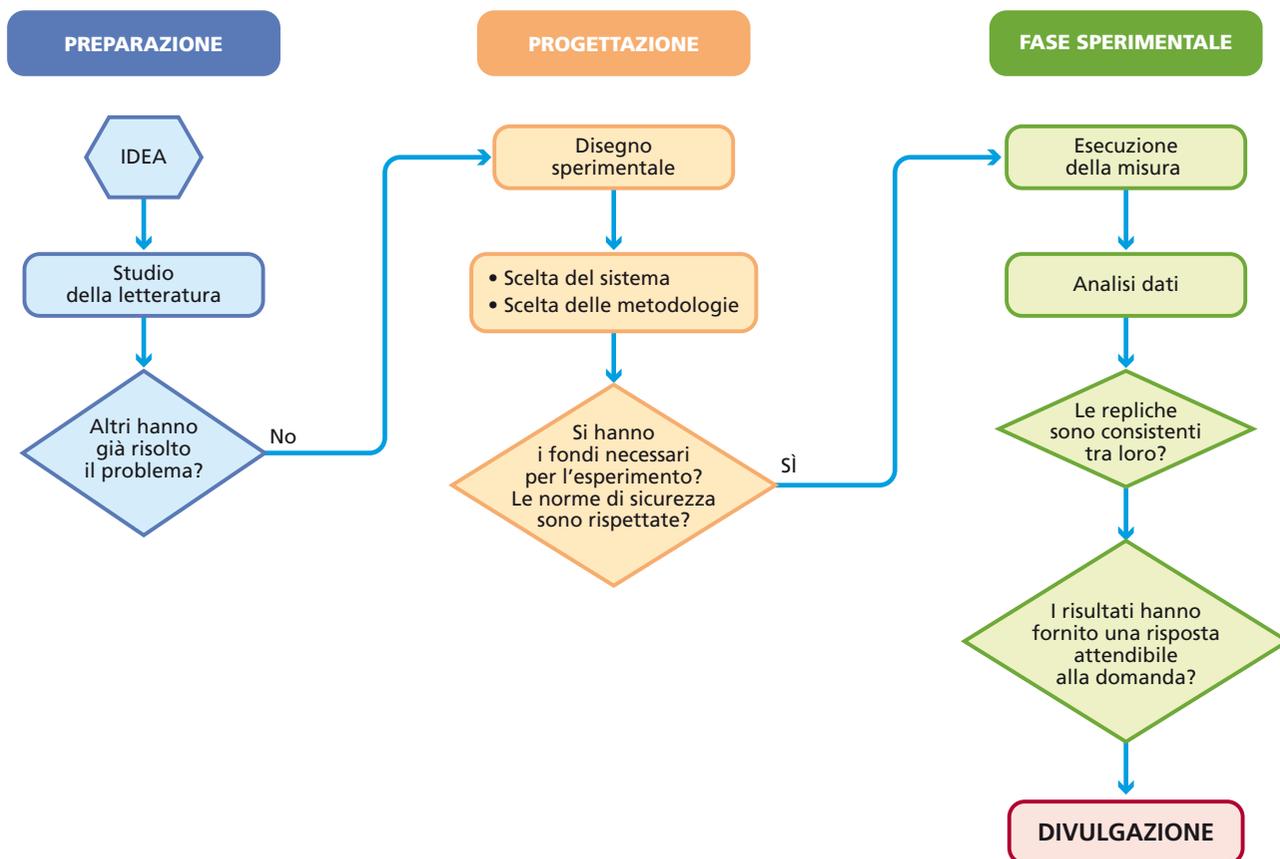
1. Si esegue l'esperimento e, per validare i dati e aumentarne la significatività, si effettuano le ripetizioni necessarie.
2. Si esegue l'analisi dei dati e si valuta la significatività dei risultati ottenuti.

Se i risultati sono significativi, si formulano le conclusioni insieme a eventuali nuove ipotesi per esperimenti futuri.

Divulgazione

I risultati ottenuti si presentano alla comunità scientifica, mediante comunicazioni orali o scritte, durante convegni e incontri per addetti ai lavori, e, infine, si pubblicano su riviste scientifiche accreditate per rendere fruibili le proprie conclusioni a tutta la comunità di esperti (e in seconda battuta anche di non esperti), contribuendo così alla conoscenza collettiva e al progresso scientifico e tecnologico.

Figura 1.1
Diagramma di flusso dell'indagine biochimica e biomolecolare.



1.2.1 Il quaderno di laboratorio

Nonostante i dati ottenuti da una misura debbano essere elaborati mediante software di analisi statistica o matematica, come vedremo, è indispensabile tenere un **quaderno di laboratorio**, per documentare opportunamente nelle pubblicazioni tutte le condizioni sperimentali, i protocolli eseguiti e i risultati ottenuti durante le varie fasi.

1.3 Le misure e la notazione scientifica

L'indagine in laboratorio comporta la **misura** di grandezze fisiche quali peso, volume, intensità di correnti elettriche, energia di onde elettromagnetiche.

Un bravo ricercatore deve essere in grado di utilizzare correttamente il linguaggio scientifico e deve riportare i suoi risultati secondo la **notazione scientifica**: ogni numero viene espresso come il prodotto di un numero decimale (compreso tra 1 e 10) e una potenza di 10 con esponente intero. Per esempio, il numero 0,0000005678 (notazione decimale) diviene $5,678 \cdot 10^{-7}$ nella notazione scientifica. Altri esempi sono disponibili nell'*Eserciziario*.

Si noti che il numero di cifre decimali da utilizzare per riportare il risultato di una misura dipende dall'**errore** associato alla misura stessa, come vedremo più avanti.

1.3.1 Le unità di misura

Dal 1° gennaio 2000 in Italia, come in tutti gli altri Stati membri dell'Unione Europea, è obbligatorio utilizzare le unità di misura del **Sistema Internazionale (SI)**, previste dalla direttiva europea 80/181/CEE del 20 dicembre 1979. Tale norma, tesa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri, si era resa necessaria «... considerando che le unità di misura sono indispensabili per qualsiasi strumento di misura per esprimere una misurazione effettuata e fornire l'indicazione di grandezza; che le unità di misura sono impiegate nella maggior parte dei settori delle attività umane; che nell'utilizzarle è necessario assicurare la maggior chiarezza possibile; che è quindi necessario disciplinare il loro impiego all'interno della Comunità nel circuito economico, nei settori della sanità e della sicurezza pubblica, nonché nelle operazioni di carattere amministrativo...».

Il SI prevede **7 unità di misura fondamentali**, riportate nella **Tabella 1.1**: metro, secondo, kilogrammo, kelvin, ampère, candela, mole.¹

Oltre a queste, sono previste **unità supplementari** per la definizione dell'angolo piano (gradi) e solido (steradiani). Inoltre, si definiscono le **unità di misura derivate**, che vengono indicate mediante espressioni algebriche, sotto forma di prodotti di potenze delle unità SI di base e delle unità SI supplementari, con un fattore numerico pari a 1. Tra le misure derivate ve ne sono alcune che hanno nomi e simboli speciali, come per esempio la **frequenza**, che viene espressa in hertz (Hz), dove $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$.

I **multipli** e i **sottomultipli decimali** più utilizzati prevedono un prefisso davanti all'unità di misura e hanno un proprio simbolo, come riportato nella **Tabella 1.2**.

Per esempio, 1 nanometro (1 nm) è pari a $1 \cdot 10^{-9}$ m ed è l'ordine di grandezza della dimensione di un legame peptidico.

Tabella 1.1 Unità di misura fondamentali del Sistema Internazionale (SI).

Grandezza	Unità di misura	Simbolo
Lunghezza	metro	m
Massa	kilogrammo	kg
Tempo	secondo	s
Intensità di corrente elettrica	ampère	A
Temperatura termodinamica	kelvin	K
Quantità di materia	mole	mol
Intensità luminosa	candela	cd

¹ A seguito della 26ª Conferenza Generale dei Pesi e delle Misure (novembre 2018) si è deliberata una ridefinizione del SI. Nella nuova versione, in vigore a partire dal 20 maggio 2019, le 7 unità fondamentali sono definite in termini di costanti universali.

Tabella 1.2 Multipli e sottomultipli delle unità di misura.

Multiplo	Prefisso	Simbolo	Sottomultiplo	Prefisso	Simbolo
10 ²⁴	yotta	Y	10 ⁻¹	deci	d
10 ²¹	zetta	Z	10 ⁻²	centi	c
10 ¹⁸	exa	E	10 ⁻³	milli	m
10 ¹⁵	peta	P	10 ⁻⁶	micro	μ
10 ¹²	tera	T	10 ⁻⁹	nano	n
10 ⁹	giga	G	10 ⁻¹²	pico	p
10 ⁶	mega	M	10 ⁻¹⁵	femto	f
10 ³	kilo	k	10 ⁻¹⁸	atto	a
10 ²	etto	h	10 ⁻²¹	zepto	z
10 ¹	deca	da	10 ⁻²⁴	yocto	y

Attenzione, però, perché in biochimica è ancora molto amata e utilizzata un'unità di lunghezza spuria, l'**ångström** (Å), pari a $1 \cdot 10^{-10}$ m e cioè 0,1 nm. Tale unità prende il nome dal fisico svedese Anders J. Ångström (1814-1874), uno dei fondatori della spettroscopia, ed è utilizzata soprattutto per indicare le dimensioni delle macromolecole. Per esempio, una proteina globulare di circa 600 amminoacidi ha un diametro medio di circa 80 Å.

1.3.2 La capacità

Siamo soliti misurare la capacità di un liquido mediante multipli e sottomultipli del **litro (L)**, un'unità di misura legata a quella dei volumi. Infatti, **capacità** e **volume** sono due parole che ci servono per indicare la stessa cosa, in quanto 1 litro corrisponde alla capacità di 1 decimetro cubo:

$$1 \text{ L} = 1 \text{ dm}^3$$

Pertanto, la capacità di 1 millilitro corrisponde a un volume di 1 centimetro cubo:

$$1 \text{ mL} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 10^{-3} \text{ dm}^3 = 1 \text{ cm}^3$$

1.4 L'errore

Ogni misura effettuata comporta un **errore**, vale a dire una differenza tra il valore ottenuto e il valore "vero" (assoluto) della grandezza. Tale errore è dovuto all'indeterminazione intrinseca nell'effettuazione di una misura, stabilito dal principio di Heisenberg.

I risultati di misure ripetute vengono, quindi, riportati correttamente come *valore ± errore*, oltre, ovviamente, all'unità di misura.

Graficamente, il valore della misura si riporta con una barra di errore di lunghezza proporzionale all'errore stesso, come mostrato nella **Figura 1.2**.

Esistono due tipologie di errore: errore casuale ed errore sistematico. Gli **errori casuali** variano in modo imprevedibile e di solito sono dovuti a piccole variazioni nelle manipolazioni implicate in ogni misura sperimentale.

Gli **errori sistematici**, invece, possono essere facilmente identificati, eliminati o ridotti. Le **condizioni al contorno** (quali la temperatura dell'ambiente, l'altitudine, il grado di umidità) sono tra i fattori che contribuiscono di più a tale tipo di errore.

Un'altra fonte di errore sistematico è l'operatore stesso. Per esempio, una scorretta posizione dello sperimentatore relativamente alla misura da eseguire determina un **errore di parallasse**, come meglio descritto nel Capitolo 4 a proposito dei volumi.

Inoltre, tra gli errori sistematici vi è l'**errore strumentale**, che ci ricorda che nessuno strumento permette di effettuare una misura priva di errore, perché dovrebbe

essere “infinitamente preciso”. Dunque, ogni strumento ha un’incertezza intrinseca associata alla misura.

1.4.1 La sensibilità e l’incertezza intrinseca

La più piccola divisione dello strumento, ossia il più piccolo valore che lo strumento è in grado di distinguere, definisce la sua **sensibilità**.

Come buona regola, se non specificato altrimenti, l’**incertezza** di uno strumento di misura è data dal 50% della sua sensibilità.

Si noti che le dimensioni dell’incertezza sono quelle che determinano la posizione decimale dell’ultima cifra significativa da riportare nella misura. L’esempio che segue dovrebbe chiarire il concetto.

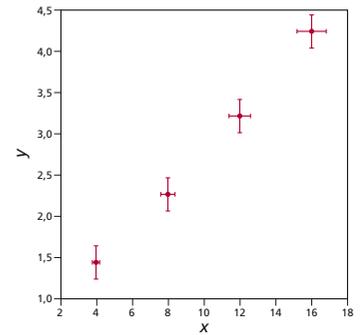


Figura 1.2

Grafico che riporta i valori di misure effettuate. Le incertezze sono riportate come barre di errore, sia nella determinazione della variabile in ascissa (errore percentuale) sia di quella in ordinata.

► ESEMPIO GUIDATO 1.1

■ PROBLEMA

Uno dei primi strumenti di misura che tutti abbiamo utilizzato già dalla scuola primaria è il righello, ma forse non ci siamo mai domandati quale fosse l’errore associato a una misura effettuata con tale strumento. Proviamo a stimarlo.

■ SOLUZIONE

Se lo osserviamo con occhio scientifico, vediamo che la sensibilità (la più piccola divisione del righello) è di 1 mm ($1 \cdot 10^{-3}$ m), dunque l’errore associato allo strumento è della metà, 0,5 mm ($0,5 \cdot 10^{-3}$ m = $5 \cdot 10^{-4}$ m).

Attenzione, se siamo in posizione inclinata rispetto allo strumento, il nostro errore di parallasse sarà sicuramente maggiore di quello strumentale!

1.4.2 La precisione e l’accuratezza

Maggiore è la sensibilità di uno strumento, maggiore è la precisione della misura che esso ci permette di effettuare; ovvero, i valori della misura ripetuta più volte saranno tutti **consistenti** (vicini tra di loro).

Ma uno strumento preciso non è necessariamente accurato, vale a dire che i valori ottenuti potrebbero non essere corretti se non sono centrati intorno al valore atteso (o **valore vero**). Questo succede se lo strumento non è accurato, magari a causa del fatto che non è stato opportunamente calibrato o tarato.

L’esempio classico per illustrare la differenza tra **accuratezza** e **precisione** è quello dei tiri a un bersaglio (**Figura 1.3**). Un arciere preciso ma non accurato lancerà frecce tutte vicine tra loro ma lontane dal centro. Un arciere accurato ma non preciso lancerà frecce lontane tra loro ma intorno al centro. Un arciere accurato e preciso colpirà sempre vicino al centro: il Robin Hood della misura!

Inoltre, va notato che l’incertezza di una misura si può diminuire:

- ripetendo le prove più volte (prove ripetute);
- migliorando il controllo sulle condizioni sperimentali;
- verificando l’accuratezza degli strumenti mediante calibrazione periodica.

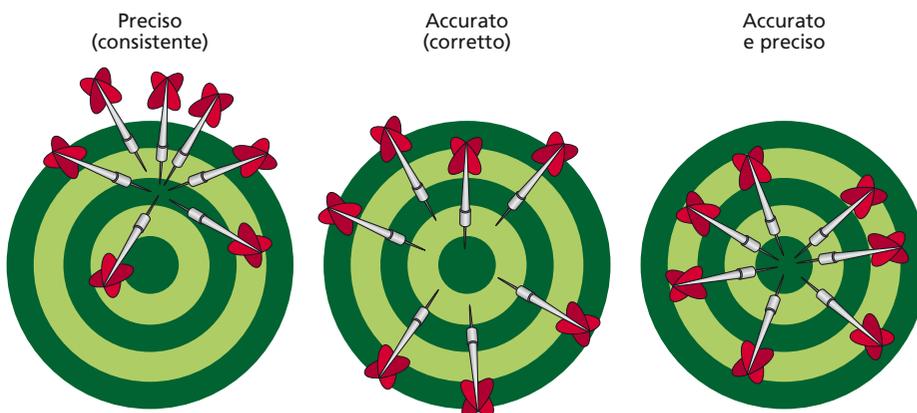


Figura 1.3

Esemplificazione della differenza tra precisione e accuratezza.

Per esempio, uno strumento molto sensibile come la bilancia analitica potrebbe non essere accurato, se il piatto non si trovasse “in bolla” (ossia se non si trovasse perfettamente in orizzontale rispetto alla direzione della forza di gravità).

1.5 L'analisi statistica

Nel caso in cui vengano effettuate prove ripetute, occorre saper fare l'analisi statistica dei dati ottenuti. Tutti i fogli di calcolo elettronici hanno moduli che permettono un'analisi dei dati immediata. Qui di seguito sono richiamati i concetti basilari utilizzati correntemente nel trattamento dei dati di un'analisi biochimica o biomolecolare.

1.5.1 La media e la deviazione standard

Per assicurare la veridicità e la riproducibilità di un risultato e, come già detto, per diminuirne l'incertezza, è buona pratica ripetere almeno 3 volte la misura di qualunque parametro x , per esempio la concentrazione di un enzima in soluzione o il dosaggio di prodotti di una reazione mediante tecniche spettrofluorimetriche. Si deve, cioè, eseguire un **triplicato della misura**, operazione indispensabile per assicurare la validità dei risultati. Il valore che meglio rappresenta quello vero della misura di una grandezza x è dato dal valore medio calcolato (\bar{x}) o **media**:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad [1.1]$$

dove i è il numero di ciascuna prova e n è il numero totale di prove eseguite.

L'**incertezza** di ogni singola misura è data dalla **deviazione standard** (σ) del campione o della popolazione:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad [1.2]$$

dove \bar{x} , i e n sono stati definiti nell'equazione 1.1. Per campioni piccoli ($n < 10$) al denominatore si sostituisce n a $(n - 1)$.

La grandezza σ definisce l'**intervallo di confidenza** entro il quale una misura effettuata si avvicina al valore vero, mentre l'incertezza nella media o **deviazione standard della media** è data da:

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad [1.3]$$

dove σ e n sono già stati definiti.

Dunque, il risultato della misura dovrà essere riportato come:

$$\bar{x} \pm \sigma \quad (\text{unità di misura}) \quad [1.4]$$

Oppure, in alcuni casi come:

$$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}} \quad (\text{unità di misura}) \quad [1.5]$$

Si noti che, se si potesse ripetere la misura un numero infinito di volte ($n \rightarrow \infty$), il valor medio corrisponderebbe al valore vero e l'errore diverrebbe nullo.

1.5.2 L'analisi inferenziale

Molto spesso nell'indagine biochimica e biomolecolare un determinato parametro da misurare è funzione di un altro parametro, secondo una legge matematica ben precisa. In generale, per determinare il tipo di dipendenza tra le due variabili x e y , si effettua la misura della variabile y in funzione di x in diversi punti (almeno 3) e, mediante un pro-

gramma di analisi statistica, si interpolano i punti per ottenere l'equazione della curva che meglio si adatta a essi.

La **dipendenza lineare** è la legge più semplice che possa regolare la dipendenza tra due variabili:

$$y = ax + b \quad [1.6]$$

dove a è la pendenza della retta e b il valore di y per $x = 0$ (**Figura 1.4a**).

Tale tipo di dipendenza regola variabili misurate in molte tecniche biochimiche e biomolecolari, come per esempio il tempo di ritenzione e il logaritmo delle dimensioni molecolari dell'analisa in cromatografia per esclusione molecolare, oppure il logaritmo del peso molecolare di una proteina e la sua mobilità relativa in SDS-PAGE.

Molte variabili misurate in laboratorio possono avere **dipendenze di tipo quadratico**, come mostrato in **Figura 1.4b**. Si pensi per esempio alla legge di decadimento radioattivo, trattata nel Capitolo 9, che è regolata da un andamento di tipo **esponenziale**:

$$y = y_0 e^{-ax} \quad [1.7]$$

dove y_0 è il valore di y per $x = 0$, e è il numero di Eulero, a è la costante di decadimento.

Un altro esempio è la cinetica enzimatica, in cui la formazione di un prodotto segue un andamento di tipo **iperbolico** regolato dalla legge di Michaelis-Menten (**Figura 1.4c**):

$$y = \frac{ax}{b + x} \quad [1.8]$$

dove a è il valore massimo di y (y_{\max}); b è il valore di x nel punto $y = y_{\max}/2$.

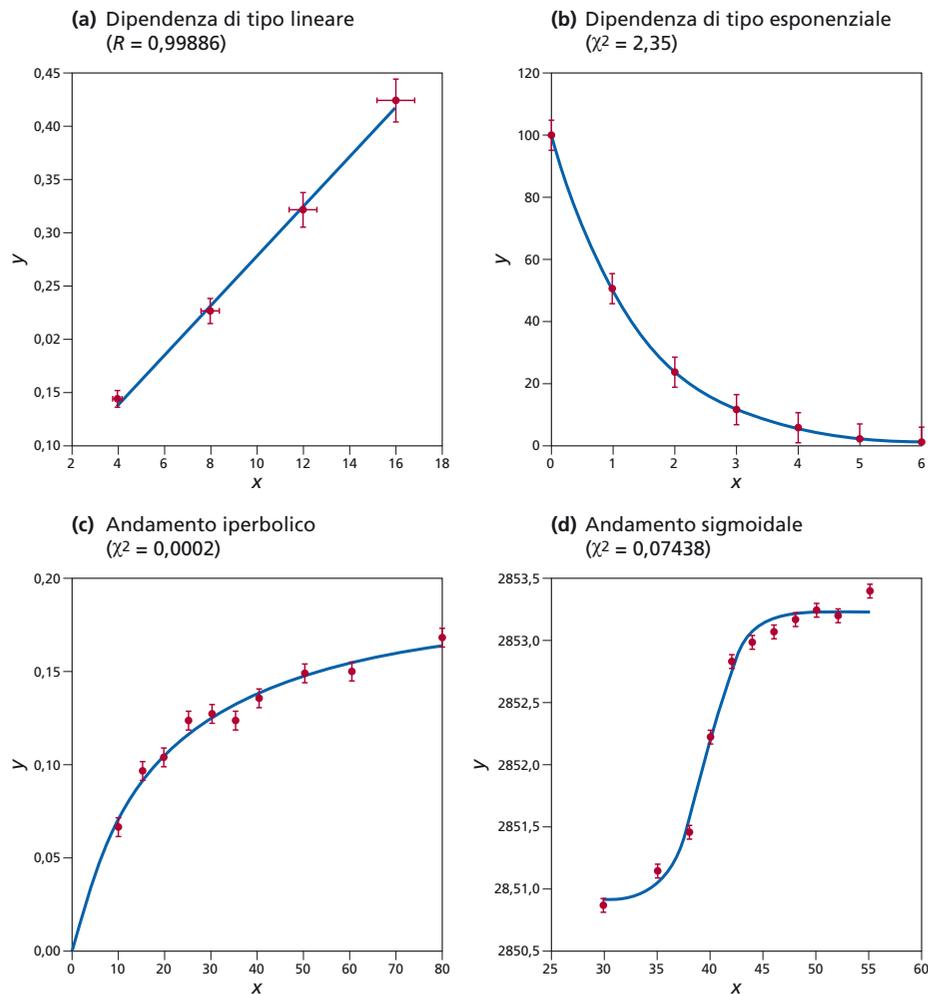


Figura 1.4
Tipi di dipendenza tra le variabili.

È importante anche lo studio di interazioni molecolari di tipo competitivo, caratterizzate da un andamento di tipo **sigmoidale**, che seguono il modello logistico tipico della crescita delle popolazioni, con equazioni del tipo (**Figura 1.4d**):

$$y = a + \frac{b}{1 + 10^{(c-x)d}} \quad [1.9]$$

Dove a è il valore minimo di y , b è la differenza tra il valore massimo e minimo, c il valore di x per cui y si trova a metà della curva e d esprime la pendenza della curva nella regione di crescita lineare.

1.5.3 I test di adattamento

Per verificare se i dati sperimentali siano approssimati correttamente da una data curva teorica, vengono applicati i **test di adattamento**. In particolare, il **coefficiente di correlazione lineare R** , o **indice di Pearson**, consente di verificare l'adattamento dei punti a una retta. Al di là della sua definizione, che richiederebbe una trattazione molto lunga, è importante sapere che se $R = 1$, le variabili x e y sono direttamente correlate; se $R = 0$, non vi è alcuna correlazione tra le variabili; se $R = -1$, le due variabili sono legate da una correlazione inversa.

Per le curve quadratiche si applica il **test chi quadro** (χ^2):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (o_i - a_i)^2}{a_i} \quad [1.10]$$

dove, avendo misurato n punti, per ogni punto i osservato (o_i), a_i è il valore atteso secondo l'equazione applicata.

Minore è il valore di chi quadro, migliore è l'adattamento dei punti sperimentali alla curva applicata.

Bibliografia

Boyer, Rodney F. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*. Prentice Hall, 2012.

Lide, David R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 2001.

Taylor, John R. *Introduzione All'analisi Degli Errori: Lo Studio Delle Incertezze Nelle Misure Fisiche*. Zanichelli, 2012.

Wilson, Keith, and John Walker. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, 2005.

Parte D

Eserciziario

Parte A – Esercizi di metodologie biochimiche 325

Parte B – Esercizi di metodologie biomolecolari 331

Parte C – Esercizi sulla parte speciale 337

Parte A – Esercizi di metodologie biochimiche

Capitolo 1

- Esprimere in notazione scientifica i seguenti numeri:
 - 5325,4
 - 4973251
 - 0,0037
 - 0,000450000
- Misurare le dimensioni di un foglio A5 con il righello e riportare i valori secondo la notazione scientifica. Ripetere la misura con un calibro a corsoio.
- Pesando volumi noti di una soluzione in almeno 3 punti, determinarne la densità.
- Effettuando la lettura di un segnale di luce emessa da un campione biologico in triplicato, lo strumento ha fornito i valori raccolti nella tabella. Inserire i dati in un foglio di calcolo o in un programma di analisi dati e calcolare il valore medio e l'errore della misura.

N.	Risposta (conteggi)
1	13 8215
2	12 9200
3	13 1965

- Verificare se i dati riportati nella tabella si adattano a una retta e determinare il valore del coefficiente di correlazione lineare.

x	0	1	2	3	4
y	0,122	0,34	0,579	0,767	0,787

Capitolo 2

- Che cos'è il CLP?
- Che cos'è il GHS?
- Che cos'è un codice CER?
- Che cos'è la SDS?
- Che cosa sono i DPI?
- Che cos'è la BPL?
- Che cosa sono le frasi H?
- Che cosa sono le frasi P?

Capitolo 3

- A che cosa serve il pHmetro?
- Per quale funzione è indispensabile l'uso di sistemi refrigeranti?
- Dal punto di vista della sicurezza, come possono essere definite le cappe chimiche in un laboratorio?
- Le stufe sono apparecchi termoregolati; qual è il loro impiego in laboratorio?
- Qual è l'intervallo volumetrico delle micropipette di precisione?
- Che tipo di protezione è fornita dalle cappe biologiche di classe I?
- Che cosa si sterilizza con l'autoclave? Cosa utilizza l'autoclave per sterilizzare?

Parte B – Esercizi di metodologie biomolecolari

Capitolo 11

1. Un plasmide tagliato con un enzima di restrizione genera frammenti con la seguente lunghezza in coppie di basi: 42 350, 125, 1360, 3450, 2200, 23 450, 350, 5420. Come si distribuiscono in un'elettroforesi su gel d'agarosio, dal polo negativo a quello positivo?
2. Quali sono i parametri di cui tener conto per modificare la stringenza durante la fase di ibridazione?
3. Quale operazione va effettuata prima del trasferimento del DNA su un supporto in nitrocellulosa o nylon? Elencare le diverse possibilità.
4. Dato il potere di risoluzione di un gel d'agarosio, di concentrazione 0,7-1,2%, come bisogna scegliere l'enzima di restrizione in relazione alla grandezza dei frammenti generati?

Capitolo 12

1. In che cosa differisce la corsa elettroforetica dell'RNA nel Northern blot rispetto a quella del DNA nel Southern blot?
2. Prima della corsa elettroforetica dell'RNA, è necessario effettuare la digestione dell'acido nucleico?
3. Durante il trasferimento dell'RNA su filtro di nylon o nitrocellulosa è necessario effettuare la fase di denaturazione in gel?
4. Nella fase di ibridazione del Northern blot, si utilizza RNA come sonda marcata? Motivare la risposta.

Capitolo 13

1. Quale temperatura di melting approssimativa ha un oligonucleotide con sequenza 5'-ACGAGCTGATGCTAGCTAGCT-3'?
2. Quante molecole di DNA si ottengono, amplificando 100 molecole iniziali, dopo 25 cicli di PCR con efficienza del 100%?
3. Con riferimento al precedente esercizio, quante molecole di DNA di differenza si potrebbero conteggiare, se l'efficienza di amplificazione fosse dell'80% dopo 20 cicli di PCR?

Capitolo 14

1. Data la seguente sequenza nucleotidica del gene d'interesse (è riportata la sequenza del filamento codificante dal 5' al 3' e la traduzione in amminoacidi con il codice a una lettera), scrivere la coppia di oligonucleotidi necessaria per amplificare il gene per poi inserirlo in un vettore, utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *BamHI* (rispettivamente al 5' e al 3' del gene), sapendo che le sequenze riconosciute da tali enzimi sono, rispettivamente:

EcoRI: 5'-GAATTC-3'

BamHI: 5'-GGATCC-3'

Si consideri una lunghezza media fra i 16 e i 22 nucleotidi con una G o una C all'estremità 3' per promuovere l'innesco della polimerizzazione e stabilizzare l'interazione con il filamento complementare.

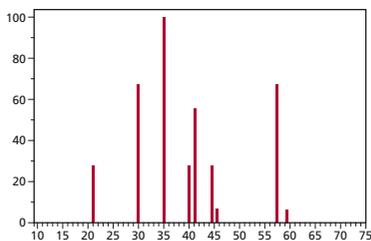
Parte C – Esercizi sulla parte speciale

Capitolo 21

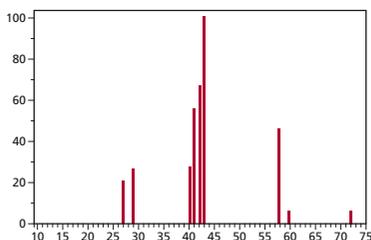
1. Gli anticorpi sono:
 - A lipoproteine.
 - B proteine non coniugate.
 - C glicoproteine.
 - D metalloproteine.
2. Un anticorpo policlonale è in grado di riconoscere:
 - A diversi epitopi di uno stesso antigene.
 - B diversi epitopi di diversi antigeni.
 - C un epitopo di diversi antigeni.
 - D un epitopo di uno stesso antigene.
3. Qual è la specie animale tipicamente impiegata per la produzione di anticorpi monoclonali?
 - A Coniglio.
 - B Ratto.
 - C Topo.
 - D Capra.

Capitolo 22

1. Identificare il picco base nello spettro sotto riportato.



2. Data la molecola avente la formula chimica $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, attribuire il picco dello ione molecolare e il picco base nello spettro sotto riportato.



3. Indicare quale tecnica di ionizzazione fornisce ioni multicarica.
4. Indicare le modalità di acquisizione delle tecniche LC-MS/MS.
5. Definire la spettrometria tandem nello spazio e nel tempo.

Capitolo 23

1. Collegarsi al **Protein Data Bank** attraverso il link: www.rcsb.org. Nella **Home Page** del PDB notare in alto a sinistra (vicino al logo PDB) il numero di strutture 3D disponibili nella banca dati al momento del contatto. Il menu in colore blu, verticale

Mauro Maccarrone

Metodologie biochimiche e biomolecolari

Strumenti e tecniche per il laboratorio del nuovo millennio

Metodologie biochimiche e biomolecolari permette di acquisire la padronanza dei principali metodi usati nei laboratori per l'analisi delle biomolecole. È uno strumento professionalizzante che, pur mantenendo una struttura essenziale, tratta anche le metodologie più innovative per la ricerca e per l'analisi diagnostica.

Il libro è diviso in tre parti, di dieci capitoli ciascuna: le prime due parti, *Metodologie biochimiche* e *Metodologie biomolecolari*, descrivono le metodologie più importanti e comuni nei laboratori di ricerca, quali le tecniche di analisi e manipolazione di proteine e DNA, e approfondiscono anche argomenti più recenti, come le metodiche per l'analisi epigenetica e la tecnologia CRISPR; la terza parte è una sezione speciale, che tratta

tecnologie impiegate in laboratori più specialistici, da quelle della biologia strutturale alla citofluorimetria, con capitoli dedicati ad argomenti come la metodica SAXS, le analisi in *live imaging*, la risonanza plasmonica di superficie, l'analisi trascrittomica.

Uno spazio è dedicato anche alla descrizione di argomenti imprescindibili per una corretta applicazione dei metodi biochimici e biomolecolari, come i principi di sicurezza nella buona pratica di laboratorio, l'analisi bioinformatica dei dati e le applicazioni specifiche in biochimica clinica.

La presentazione di ogni argomento è inoltre completata da esercizi e problemi, intesi come occasione di approfondimento e strumento di autoverifica.

Gli autori di *Metodologie biochimiche e biomolecolari*, curato da Mauro Maccarrone, anche coautore di diversi capitoli, sono: Gennaro Agrimi, Rosario Ammendola, Beatrice C. Angelucci, Giovanni Antonini, Monica Bari, Vincenza Barresi, Tiziana Bisogno, Martino Bolognesi, Paola Bruni, Rita Casadio, Fabio Cattaneo, Francesca Cencetti, Manuela Cervelli, Valerio Chiurchiù, Giacomo Cinnirella, Daniele Filippo Condorelli, Francesca Cutruzzolà, Claudio D'Addario, Enrico Dainese, Vincenzo De Laurenzi, Gabriella Esposito, Filomena Fezza, Roberto Giacomini, Stuffer, Giorgio Giardina, Gianfranco Gilardi, Alessandra Giorgi, Antonio Gnani, Mauro Magnani, Pier Luigi Martelli, Michele Menotta, Giovanna Musco, Sergio Oddi, Luigi Palmieri, Fabiana Piscitelli, Mariangela Pucci, Cinzia Rapino, Serena Rinaldo, Annalaura Sabatucci, Michele Sallese, Anna Maria Sardanelli, Eugenia Schininà, Lucia Scipioni, Paolo Swuec, Alessandro Terrinoni.

Le risorse multimediali



online.universita.zanichelli.it/maccarrone

A questo indirizzo sono disponibili le risorse multimediali di complemento al libro. Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su my.zanichelli.it inserendo la chiave di attivazione personale contenuta nel libro.

MACCARRONE*METOD BIOCHIM BIOMOL LUM

ISBN 978-88-08-52055-5



9 788808 520555

0 1 2 3 4 5 6 7 8 (60F)

Al pubblico € 42,00 •••

In caso di variazione Iva o cambiamento prezzo consultare il sito o il catalogo dell'editore

www.zanichelli.it