




# Laboratorio di Biochimica

Modulo del Corso di “Laboratorio di Chimica e Biochimica”

***Laurea in Scienze e Tecnologie Biologiche***  
***a.a. 2019-2020***



# Docenti del corso Laboratorio di Biochimica

## Dipartimento di Scienze della Vita


Prof. Marco Scocchi: Referente del corso  
Tel. 040 558 8704      [msscocchi@units.it](mailto:msscocchi@units.it)

Dott.ssa Filomena Guida  
Tel. 040 558 8707      [filomena.guida@dia.units.it](mailto:filomena.guida@dia.units.it)  
                                 [milenaguida@gmail.com](mailto:milenaguida@gmail.com)

Prof. Paolo Macor  
Tel: 040 558 8683      [pmacor@units.it](mailto:pmacor@units.it)


Dott.ssa Federica Tramer  
Tel: 040 558 8748      [ftramer@units.it](mailto:ftramer@units.it)

Tutor:  
Ambra Del Neri  
Paola Tricarico



## Programma del corso (I)

1. Introduzione al laboratorio di biochimica: attrezzature e strumentazioni. Sicurezza in laboratorio biochimico. Preparazione di soluzioni. Concentrazione. Diluizioni seriali.
2. Soluzioni tampone e pH.
3. Tecniche spettroscopiche UV/Visibile. Legge di Lambert-Beer. Utilizzo dello spettrofotometro.
4. Metodi di determinazione della concentrazione di proteine.
5. Tecniche spettroscopiche: fluorescenza, bioluminescenza e chemiluminescenza.



## Programma del corso (II)

6. Purificazione di una molecola, principi: frazionamento, estrazione, strategie di purificazione, monitoraggio della purificazione, resa. Centrifugazione.
7. La cromatografia: principi. Cromatografia per esclusione molecolare.
8. Cromatografia per affinità.
9. Principi e pratica dell'elettroforesi di proteine.
10. Principi e pratica del Western blot.
11. Principi e pratica dell'ELISA



# Esperienze di laboratorio (ciascuna esperienza avrà la durata di 3 ore)

## Esperienza 1:

Docente: dott.ssa Filomena Guida

Argomenti trattati: utilizzo di micropipette e diluizioni. Soluzioni tampone e pH

## Esperienza 2:

Docente prof. Marco Scocchi

Argomenti trattati: spettrofotometria

## Esperienza 3:

Docente: dott.ssa Federica Tramer

Argomenti trattati: cromatografia

## Esperienza 4:

Docente: prof. Paolo Macor

Argomenti trattati: ELISA

# Calendario delle Lezioni teoriche:

## LEZIONI FRONTALI a partire da mercoledì 20 maggio

	Maggio						Giugno						
orario	mer 20 14-16	lun 25 14-16	mer 27 14-16	ven 29 11-13	mer 03 14-16	ven 05 11-13	Lun08 ?	ven12	lun15	ven19	Lun22	Ven26	Lun29
<b>Modulo 1</b>	Red		Light Purple		Grey	Light Blue	Red						
<b>Modulo 2</b>		Light Purple	Blue			Light Blue					Blue		
<b>Modulo 3</b>		Light Purple	Light Purple			Yellow		Yellow					
<b>Modulo 4</b>		Light Purple	Light Purple			Light Blue				Green		Green	

# LABORATORIO DI CHIMICA e BIOCHIMICA



Modulo 1: Docente F.Guida

Norme di comportamento in un Laboratorio biochimico. Utilizzo dei DPI. Classificazione delle sostanze pericolose e schede di sicurezza. Strumentazione di base, vetreria e plastiche di laboratorio. Utilizzo delle micropipette. Preparazione di soluzioni. Diluizioni e calcoli relativi. Preparazione di una soluzione tampone e calcolo del pH, utilizzo del pHmetro.

# SICUREZZA IN LABORATORIO





# SICUREZZA IN LABORATORIO

- Non si deve **mangiare, bere o fumare** in laboratorio
- Indossare **camice e dispositivi di protezione individuale (DPI)**



- Lavorare sempre almeno in **presenza di un'altra persona**

# SICUREZZA IN LABORATORIO

- Mantenere in **ordine** la propria postazione di lavoro



# SICUREZZA IN LABORATORIO

- **Eliminare in modo corretto i rifiuti** chimici, biologici e radioattivi, solidi e liquidi prodotti nei laboratori



- Scrivere sul contenitore la descrizione del contenuto, il nome e la data

# SICUREZZA IN LABORATORIO

- **Leggere**, sempre le **etichette** del prodotto chimico che si utilizza ed eventualmente le schede di sicurezza.

## ACIDO CLORIDRICO

**FRASI DI RISCHIO:**  
R23 - Tossico per inalazione.  
R35 - Provoca gravi ustioni.

**INDICAZIONI DI PERICOLO:**  
H331 - Tossico se inalato.  
H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.  
\* - HCl gassoso puro.

**CONSIGLI DI PRUDENZA:**  
P102 - Conservare fuori dalla portata dei bambini.  
P280 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.  
P280 - Utilizzare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.  
P303 + P361 + P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.  
P305+P351+P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.  
P310 - Consultare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.  
P403 - Conservare in luogo ben ventilato.  
P405 - Conservare sotto chiave.  
P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le disposizioni locali/regionali/nazionali/internazionali.

NUMERO CAS: 7647-01-0 NUMERO CEE: 231-595-7

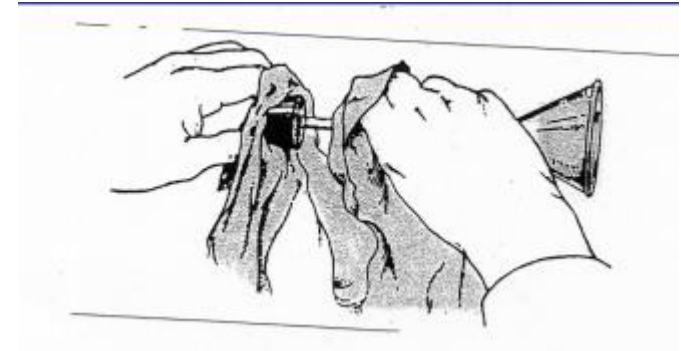


- **MAI DAR DA BERE ALL'ACIDO!!!**....sempre acido in acqua, a piccole porzioni, cautamente e mescolando dopo ogni aggiunta)

# SICUREZZA IN LABORATORIO

## UNA VOLTA FINITO :

- **Pulire** la propria **vetreria** accuratamente
- Lasciare **pulita e in ordine** la postazione di lavoro e spegnere gli apparecchi (eccetto quelli necessari)
- Prima di uscire dal laboratorio **togliersi i DPI** e lavarsi le mani



# STRUMENTAZIONE di BASE

- **BANCONI da LABORATORIO:**
- Resistenti ad ACIDI, BASI e alte Temperature
- Facilmente pulibili



- **VETRERIA e materiale monouso**

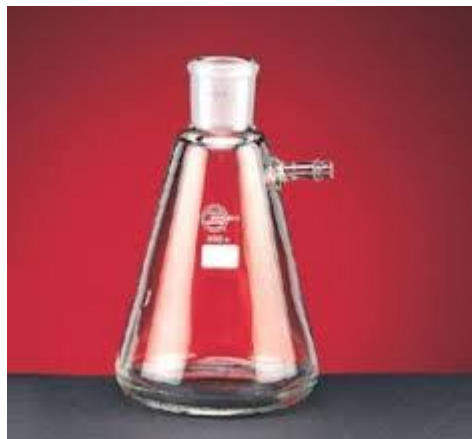
# VETRERIA di LABORATORIO



- **Provette**



- **Becher o Beaker**



- **Beuta e beuta da vuoto**



- **Palloni di reazione a uno o più colli**

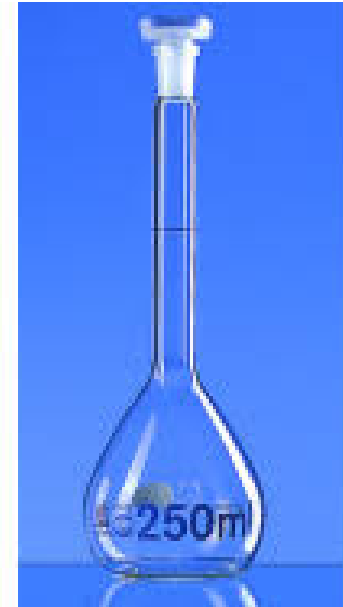
# VETRERIA di LABORATORIO



- **Cilindri**



- **Bottiglie**



- **Matraci**



# PLASTICHERIA di LABORATORIO



- spruzzette



- Provette "Falcon" da 50 o 15 ml



- Provette "Eppendorf"



- Portaprovette

# STRUMENTAZIONE di BASE

## BILANCE:

**Portata:** peso massimo che può sopportare effettuando ancora una misura corretta

**Sensibilità:** peso minimo che riesce a pesare in maniera corretta



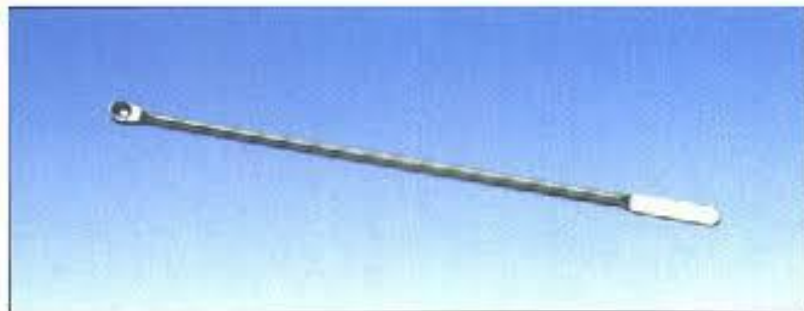
**Bilancia tecnica:** sensibilità di 0,01g, pesa cioè il centesimo di grammo.

**Bilancia analitica:** hanno una sensibilità di 0,1 mg.



# STRUMENTAZIONE di BASE

- Piccoli strumenti utili per la pesata: **Navicelle** e **spatoline**

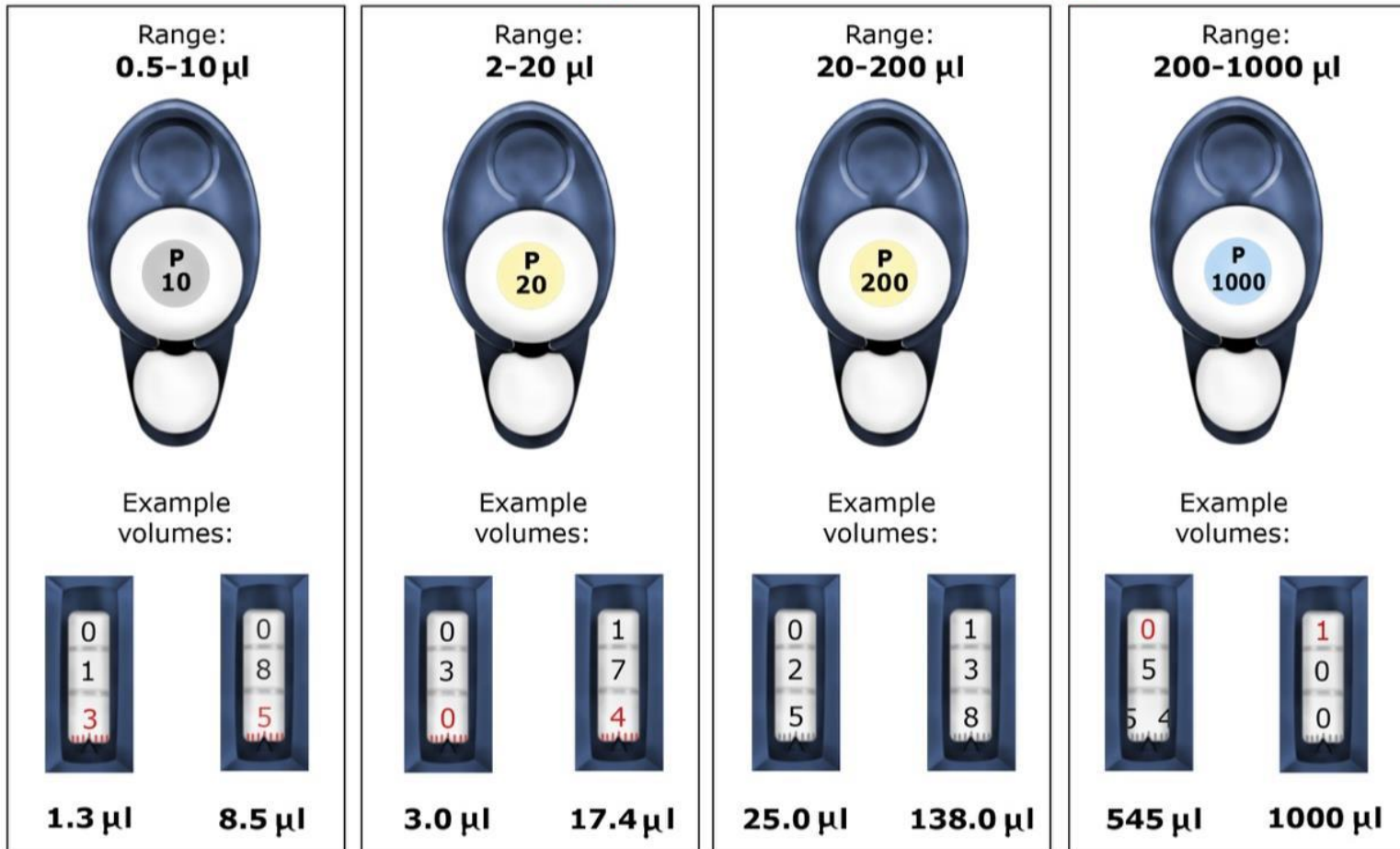


# Micropipette e propipettatori



# Micropipette

**NEVER** crank the micropipets above or below their ranges!!



The red number indicates decimal on P10 and P20. The P1000 should show a red **1** ONLY when the other numbers are 0 (in other words, set at 1000  $\mu\text{l}$ ).

Always hold the micropipet in a **vertical position** when there is fluid in the tip.

# Micropipette



- Si setta il display
- Si appoggia sull'apposito puntale
- Si preme il pistone fino alla prima resistenza



- Si preleva il liquido rilasciando piano il pistone, per non creare bolle



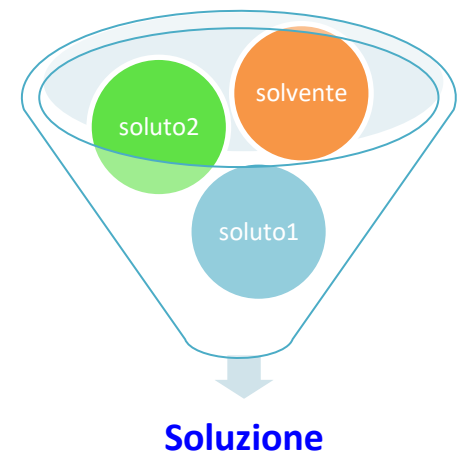
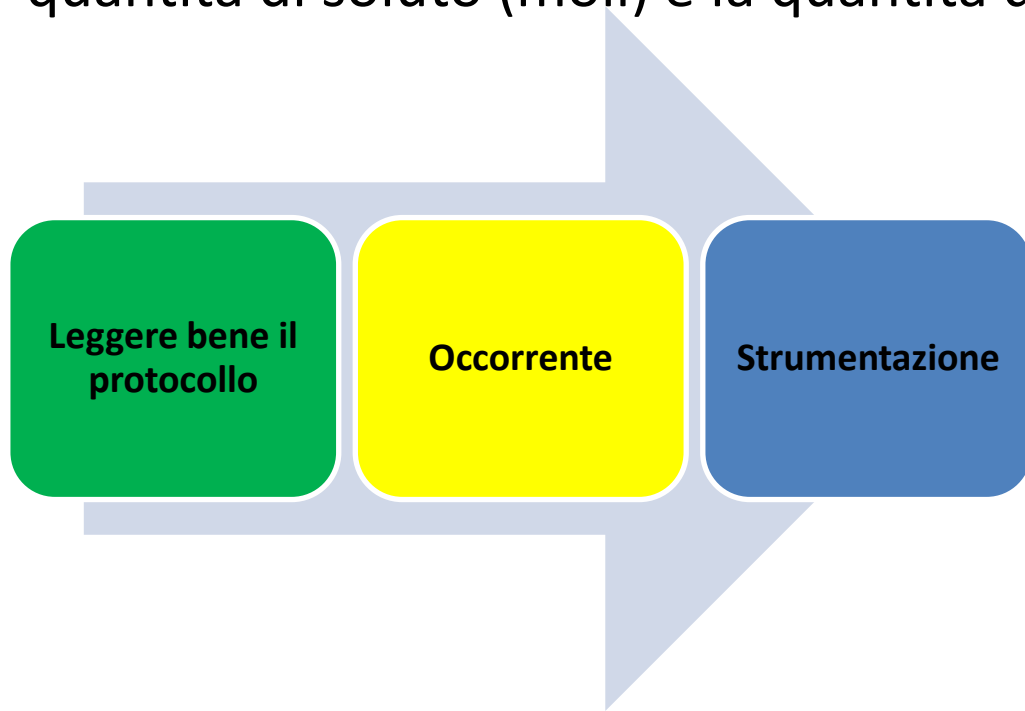
- Si preme fino alla prima resistenza per rilasciare il liquido nella eppendorf
- Se nel puntale rimane qualche piccola gocciolina si può premere ancora fino alla seconda resistenza

# Esperienza di Laboratorio

- **Preparazione di una soluzione a concentrazione nota**

Una soluzione è una miscela omogenea di uno o più soluti sciolti in un solvente. La proporzione tra i diversi componenti può variare per cui è importante conoscere la concentrazione.

**La concentrazione** è una grandezza che esprime il rapporto tra la quantità di soluto (moli) e la quantità di solvente.



Leggere bene il  
protocollo

- Bisogna fare alcuni **calcoli**
- Fare molta attenzione all'**unità di misura** utilizzata per la concentrazione:
  1. **percentuale in massa** (massa soluto in grammi/100 g soluzione)
  2. **percentuale in volume** (volume soluto in mL/100 mL soluzione)
  3. **percentuale massa/volume** (massa soluto in g/100 mL soluzione)
  4. **molarità** (moli soluto/litro soluzione)
  5. **molalità** (moli soluto/kg solvente)



## Occorrente

- Controllare le sostanze che sono state date in dotazione sul bancone
- Controllare se ci sono soluzioni già pronte e a che concentrazione sono
- Considerare l'eventualità di fare diluizioni
- Fare i calcoli necessari

## Strumentazione

- Spatoline
- Bilancia
- Becher
- falcon
- Micropipette o propipettatori
- Navicella
- Spruzzetta
- Acqua distillata

Per poter scegliere la strumentazione adatta considerare bene le quantità da utilizzare sia di soluto che di solvente!!!!

# Esperienza di Laboratorio

- **Preparazione di 50 mL di una soluzione 0,1 M di NaCl.**

- **Ragioniamo:**

una soluzione 0,1 M contiene 0,1 moli di NaCl in 1 litro di soluzione.

Per preparare questa soluzione dobbiamo

prima capire quante moli di NaCl abbiamo in 50 mL di una soluzione 0,1 M, con la seguente proporzione:

0,1 moli di NaCl : 1 litro (soluzione) = X moli di NaCl : 50 mL (soluzione)

da cui:

$X \text{ moli NaCl} = 0,1 \times 50/1000 = 0,05 \text{ mol}$

per tradurre in grammi queste 0,05 moli dobbiamo applicare la seguente formula:

massa (g) = numero moli x peso molecolare

Na: massa atomica: 22,99 u

Cl: massa atomica: 35,45 u

NaCl massa molecolare: 58,44 u; massa molare: 58,44 g/mol

massa in g di NaCl da utilizzare:  $58,44 \times 0,05 = 2,92 \text{ g}$

- **OCCORRENTE:**
- Scegliere l'occorrente in base alle quantità

Nel nostro caso: 2,92 g

- Che tipo di bilancia userò? (tecnica o analitica)
- Che tipo di navicella e che tipo di spatolina userò?

Volume: 50 ml

- In che contenitore preparerò la mia soluzione?
- Ho tutti i reagenti ? (NaCl e acqua distillata)

# DILUIZIONI

Spesso quando si preparano soluzioni in laboratorio è conveniente preparare una **soluzione madre o stock** più concentrata che verrà diluita al momento dell'uso. In questo modo non sarà necessario pesare ogni volta la polvere, ma basterà diluire opportunamente lo stock per ottenere la concentrazione voluta.

**Soluzione madre**



La concentrazione dello **stock** può essere indicata nel suo **valore assoluto (es. 1,2 M)** oppure in modo **relativo** alla concentrazione d'uso, indicando quante volte lo stock è più concentrato della concentrazione d'uso.

Ad es. **5X** (leggi: "5 per") vuol dire che lo stock è 5 volte più concentrato del necessario. Per arrivare alla concentrazione corretta (1X) si dovrà diluire 5 volte, o 1:5

# DILUIZIONI

Esempio: preparare 1L di NaCl alla conc. 2M partendo da una soluzione 10M

Calcoli da fare:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

10M

X

2

$$n = 2 = 10M \times V_1$$

$$V_1 = \frac{2}{10} = 0,2L \text{ (200 ml da prelevare)}$$

Soluzione madre



$$M = n / V$$

$$n = M \times V$$

lo voglio 1 L a conc 2 M

$$n = 2 \times 1 = 2 \text{ moli}$$

In che volume della soluzione madre sono contenute 2 moli?

Si può anche ragionare diversamente:

Io ho una soluzione madre 10M

E ne voglio ottenere una finale 2M. **Quante volte devo diluire?**

10

---- = 5X devo diluire 5 volte      **C iniziale/ C finale= fattore di diluizione**

2

che volume finale voglio ottenere? 1L

**Vfinale/ fattore di diluizione= Volume da prelevare**      1L/ 5= 0,2L

Quindi devo prelevare 0,2 L ( 200 ml)

# Esperienza di Laboratorio

Preparare 10 ml di una soluzione contenente il 3% (w/vol) di saccarosio, ampicillina 1 mg/ml e EDTA 2 mM.

- **Controlliamo cosa abbiamo in dotazione e poi ragioniamo**

Sul bancone c'è:

Saccarosio 9% → peso o diluisco?

Ampicillina 100 mg/ml ed ampicillina 2 mg/ml → quale scelgo?

EDTA 10 mM → peso o diluisco?

# Esperienza di Laboratorio

Preparare 10 ml di una soluzione contenente il 3% (w/vol) di saccarosio, ampicillina 1 mg/ml e EDTA 2 mM.

- **Controlliamo cosa abbiamo in dotazione e poi ragioniamo**

Sul bancone c'è:

Saccarosio 9% → basta diluire

$C_i/C_f =$  fattore diluizione  $9/3=3X$

$V_f / \text{Fatt Dil} = 10 \text{ ml}/3 = 3,33 \text{ ml}$

Ampicillina 100 mg/ml ed ampicillina 2 mg/ml → quale scelgo?

$100 \text{ (mg/ml)} / 1 \text{ (mg/ml)} = 100X$   $10\text{ml}/100 = 0,1 \text{ ml}$

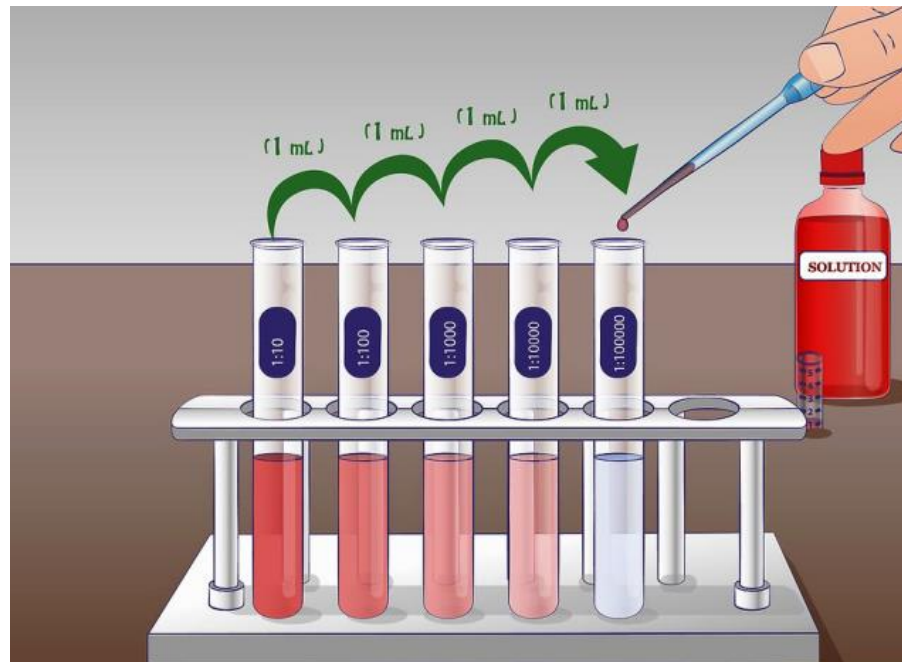
$2 \text{ (mg/ml)} / 1 \text{ (mg/ml)} = 2X$   $10/2 = 5 \text{ ml}$

EDTA 10 mM → peso o diluisco?



# DILUIZIONI SERIALI

A volte può capitare di dover preparare soluzioni a concentrazioni talmente basse che diventa impossibile pesare la quantità di soluto necessaria persino con la bilancia analitica (ad es 0,000000015g di sale in 100 ml di acqua distillata). Per ovviare a questo problema si possono preparare delle soluzioni a concentrazione intermedia, partendo da una più concentrata.



# DILUIZIONI SERIALI

Esempio: preparare 1 ml diluendo 1:10000 la soluzione in dotazione.

## Ragioniamo:

Se facessi un'unica diluizione dovrei fare:

$1000/10000 = 0,1 \mu\text{l}$  dovrei prelevare  $0,1 \mu\text{l}$

Oppure posso fare diluizioni seriali

## Occorrente:

- eppendorf da 1,5 ml
- Acqua distillata
- Micropipetta Gilson P1000 con relativi puntali
- Micropipetta gilson P200 con relativi puntali

## Procedimento:

- Si preparano le provette eppendorf sul portaprovette numerandole
- Si aggiungono 900  $\mu\text{l}$  di acqua distillata in ciascuna provetta
- Si trasferiscono 100  $\mu\text{l}$  dalla soluzione più concentrata con una micropipetta P200 nella provetta provetta1 mescolando bene cioè aspirando e facendo defluire il liquido almeno 3 volte. Otteniamo così una diluizione 1:10
- Ripetiamo l'operazione prelevando 100  $\mu\text{l}$  dalla provetta 1 e trasferendoli nella provetta2 e così via.....fino a raggiungere la diluizione desiderata.