



*Corso di Laboratorio di chimica e biochimica*

*STB*

*a.a. 2019/2020*

*Modulo 1: Docente F.Guida*

*milenaguida@gmail.com*

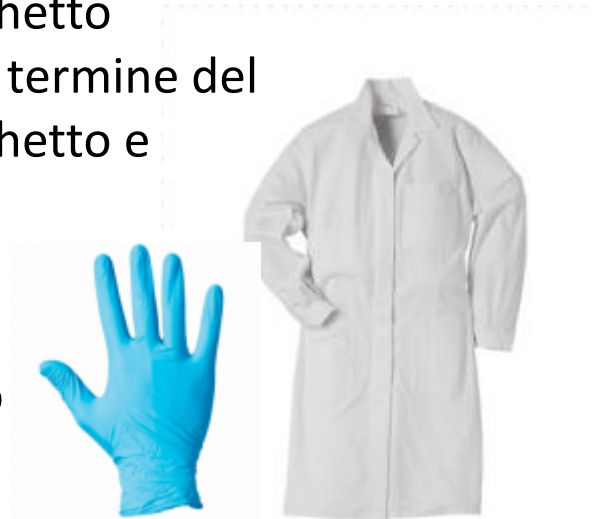
# Orari di laboratorio esperienza 1:

GUIDA

Turno 5	16 giugno	15.00 – 19.00
Turno 6	17 giugno	9.30 - 13.30

# SICUREZZA IN LABORATORIO per emergenza Covid-19

- Utilizzare il **gel lavamani** posto appena fuori la porta del laboratorio.
- Ingresso regolato: **2 persone alla volta rispettando la distanza di sicurezza.**
- Dirigersi **nell'aula didattica.**
- Riporre i propri effetti personali in un sacchetto e lasciarlo in aula.
- Indossare il **camice usa e getta**, non buttare il sacchetto protettivo ma aggiungere etichetta con il nome. Al termine del proprio turno ciascun camice verrà messo nel sacchetto e riposto sugli appositi scaffali.
- Indossare **guanti e mascherina**
- Recarsi **in laboratorio** alla postazione indicata dal docente **solo con il foglio del protocollo, telefono e una penna.**
- **Non scambiare materiale con i colleghi**



# Sul bancone:



- **Becher di vetro per preparare la soluzione tampone**



- **Becher di plastica da usare come "WASTE" per puntali.**



- **Portaprovette**



- **spruzzette**

# Sul bancone:



- **Provette "Eppendorf" per es.1.1 e 1.2**



- **Utilizzare "falcon" da 15 ml per es.1.3**



- **Utilizzare "Falcon" da 50 ml per TAMPONE GLICINA**



- **Bottiglia piccola per TAMPONE FOSFATO**

# Propipettatori e pipette sierologiche



- 2 pipette sierologiche (una da 5 ml e l'altra da 10 ml). Utilizzare per es. 1.3.

# Sul bancone:



- 2 Navicelle di plastica per pesare le due polveri per le sol. Tampone, segnare con il pennarello cosa si è pesato



- Ancorette magnetiche



- Agitatore magnetico

# 1) Soluzioni e diluizioni

1.1.

Avendo a disposizione: liozima (20 mg/ml) , EDTA (10 mM), glucosio al 2%(w/v) e ampicillina (5mg/ml), preparare 1 ml di una soluzione di liozima 1 mg/ml contenente 0,01% glucosio, 50  $\mu$ M EDTA e ampicillina 50  $\mu$ g/ml. Indicare la strumentazione da utilizzare per il prelievo dei volumi ed i calcoli necessari.

- Liozima: 50  $\mu$ l
- EDTA: 5  $\mu$ l
- Amp: 10  $\mu$ l
- Glucosio: 5  $\mu$ l
- 930  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O

$$C_{iniz} / C_{fin} = \text{fattore di diluizione}$$

$$V \text{ (da prelevare)} = V_{fin} / \text{fattore di diluizione}$$



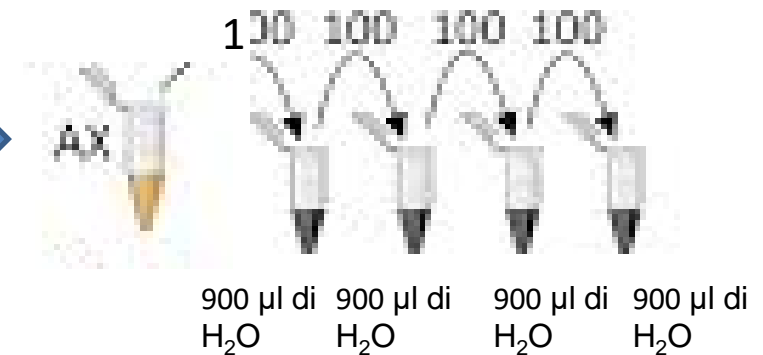
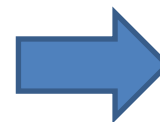
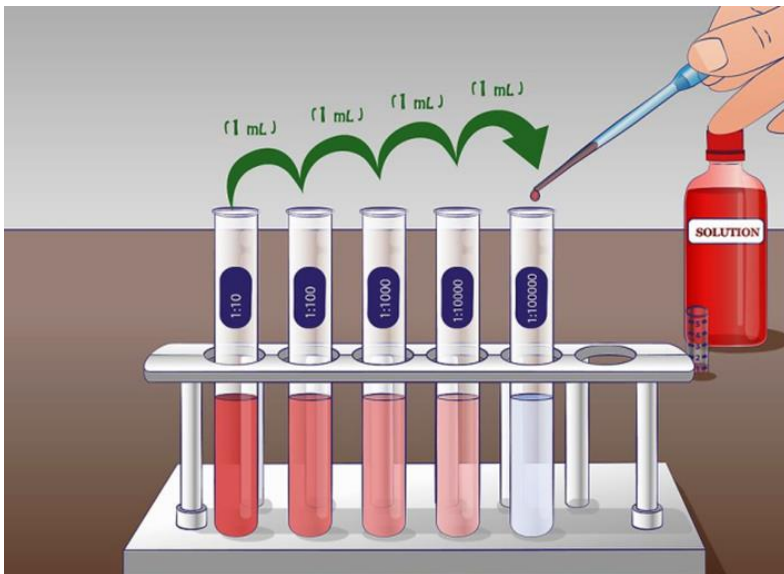
# 1) Soluzioni e diluizioni.

1.2.

Diluire in maniera seriale la soluzione blu assegnata in modo da ottenere alla fine 1 ml della stessa ad una diluizione 1:10000. Descrivere brevemente il procedimento.

$C_{iniz} / C_{fin} = \text{fatt. di dil. in questo caso SEMPRE 10}$

$V \text{ (da prelevare)} = V_{fin} / \text{fatt. di dil.} \rightarrow 1000 / 10 = 100 \mu\text{l}$



# 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

# 1) Soluzioni e diluizioni

1.3

Avendo a disposizione PBS 5X, saccarosio al 10%(w/vol) ed NaCl 100 mM, preparare 15 ml di PBS 1X contenente 1% di saccarosio e 10 mM NaCl. Riportare i calcoli necessari per la preparazione della soluzione e indicare il tipo di attrezzature da utilizzare per il prelievo dei volumi.

- PBS: 3 ml
- Saccarosio: 1,5 ml
- NaCl: 1,5 ml
- H<sub>2</sub>O: 9 ml

$C_{iniz} / C_{fin} =$  **fattore di diluizione**

**V** (da prelevare) = **V fin** / **fattore di diluizione**

## 2) Preparazione di due soluzioni tampone.

**Obiettivi:** acquisire esperienza nella preparazione di soluzioni tampone a diversi pH

**Strumentazione:** imparare l'utilizzo del pHmetro

- TAMPONE GLICINA a pH 2.5
- TAMPONE FOSFATO a pH 8



# pHmetro tipo1

## Istruzioni per la calibrazione:

- Accendere
  - Autotest
  - Lavare l'elettrodo
  - Inserire l'elettrodo nella sol. Di calibrazione a pH 7,01
  - **Premere icona bottiglia e ASPETTARE**
  - Tampone2: lavare l'elettrodo e inserirlo nella sol. Di calibrazione a pH 4. ASPETTARE
  - Calibrazione ok oppure errore ricalibrare, lettura instabile....
  - Il segreto è AVERE PAZIENZA !
- 
- Dopo la calibrazione, lavare l'elettrodo con H<sub>2</sub>O e inserirlo nella soluzione da testare. Premere "pH"



pHmetro

## pHmetro tipo2:



### Istruzioni per la calibrazione:

- Per calibrare non c'è il simbolo della bottiglia ma c'è la scritta "CAL"
  - Utilizza 3 tamponi per la calibrazione  
Tamponi: pH 9,2
  - Tamponi: pH 7,01
  - Tamponi: pH 4,0
- 
- Dopo la calibrazione, lavare l'elettrodo con H<sub>2</sub>O e inserirlo nella soluzione da testare.  
Premere "pH"

# PREPARAZIONE DI UNA SOLUZIONE TAMPONE

2.1

## PREPARAZIONE DI 200 ml di TAMPONE GLICINA a pH 2.5.

Glicina PM=75

pKa1=2.3 ; pKa2=9.8

Sciogliere 3g di glicina in acqua distillata rimanendo al di sotto di 200 ml. Verificare il pH misurando con il pHmetro. Regolare il pH aggiungendo HCl 2 M lentamente 1 ml alla volta. Portare la soluzione al volume finale di 200 ml con acqua distillata. Trasferire 40 ml della soluzione preparata in un tubo falcon da 50 ml.

- pH iniziale?
- Quanti ml di HCl è stato necessario aggiungere?

# PREPARAZIONE DI UNA SOLUZIONE TAMPONE

2.2

**PREPARAZIONE di 125 ml di TAMPONE FOSFATO 0,2M a pH=8.**

(PM di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4=120$ ;  $\text{pK}_{a_2}=7,2$ )

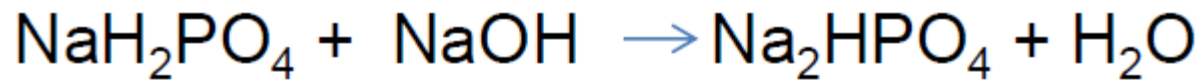
Pesare nel becher  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e scioglierlo in un volume inferiore a 125 ml di acqua distillata. Misurare il pH di partenza. Portare a pH=8 utilizzando NaOH 5M. Verificare il volume di NaOH utilizzato e confrontarlo con quello teorico. Portare a volume con acqua distillata. Trasferire la soluzione tampone nell'apposita bottiglia.

- 3g di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 4,1 ml

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]_{\text{iniziale}}}{[\text{HA}]_{\text{iniziale}}}$$

**Equazione di Henderson Hasselbalch**





0.025 moli      X moli

0.025 – X moli              X moli

$$\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{base}] / [\text{acido}]$$

$$8 = 7,2 + \log (x \text{ moli}) / (0,025 - X \text{ moli})$$

$$0,8 = \log (x \text{ moli}) / (0,025 - X \text{ moli})$$

$$10^{0,8} = 10 (x \text{ moli}) / (0,025 - X \text{ moli})$$

RISOLVERE PER X

Trasformare le moli di NaOH in volume

5:1000=.....: ml di NaOH

# SICUREZZA IN LABORATORIO

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



Svuotare il contenuto di tutte le eppendorf utilizzate nel lavandino, si tratta di soluzioni acquose non tossiche. Le eppendorf andranno buttate nei fusti blu. Leggere l'etichetta.

# SICUREZZA IN LABORATORIO per emergenza Covid-19



**UNA VOLTA FINITO** ciascuno studente deve:

- Buttare tutte le eppendorf utilizzate negli appositi contenitori
- **Pulire** esternamente con **soluzione disinfettante** e riporre sull'apposito scaffale la **bottiglia** contenente il tampone fosfato con il proprio nome
- **pulire** la propria **vetreria**
- **Pulire con soluzione disinfettante** tutte le strumentazioni ad uso promiscuo (es. **micropipette, propipettatori, pHmetro**)
- **igienizzare il proprio bancone** utilizzando soluzione idroalcolica e carta, che va poi smaltita nei contenitori dei rifiuti indifferenziati.
- Riporre il camice nella busta con il proprio nome e poi sullo scaffale
- smaltire i guanti monouso negli appositi bidoni per i rifiuti indifferenziati
- recuperare i propri effetti personali ed uscire nell'atrio mantenendo le **distanze di sicurezza**.