

Laboratorio di Biochimica

Modulo del Corso di “Laboratorio di Chimica e Biochimica”

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



Esperienze di laboratorio

(ciascuna esperienza avrà la durata di 3 ore)

Esperienza 1:

Docente: prof. **Alessandro Tossi**

1. Introduzione al laboratorio di biochimica:

- Attrezzature e strumentazioni. Sicurezza nel lab. biochimico.
- Preparazione di soluzioni. Concentrazione. Diluizioni seriali.

2. Soluzioni tampone e pH.

LABORATORIO DI CHIMICA e BIOCHIMICA



Modulo 1:

- Conoscenza dei pericoli e della classificazione sostanze pericolose e schede di sicurezza
- Corretto utilizzo dei DPI.
- Seguire le norme di comportamento in un Laboratorio biochimico.

- Strumentazione di base • Vetreria e plasticeria di laboratorio. • Utilizzo delle micropipette
- Preparazione di soluzioni. • Diluizioni e calcoli relativi.

SICUREZZA IN LABORATORIO

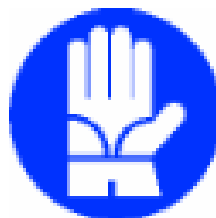
LABORATORIO BIOCHIMICO



DIVIETO DI ACCESSO
ALLE PERSONE
NON AUTORIZZATE



VIETATO FUMARE



GUANTI DI
PROTEZIONE
OBBLIGATORI



LAVARE SEMPRE LE
MANI AL TERMINE
DELLE OPERAZIONI



PROTEZIONE
OBBLIGATORIA
DELLE VIE
RESPIRATORIE



MATERIALE
INFIAMMABILE



SOSTANZE VELENOSE



RISCHIO BIOLOGICO



SOSTANZE NOCIVE
O IRRITANTI



SOSTANZE
CORROSIVE

- CLASSIFICAZIONE SOSTANZE PERICOLOSE E SCHEDE DI SICUREZZA
- **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**

SICUREZZA IN LABORATORIO

- **CORRETTO UTILIZZO DEI DPI.**
 - **Usare SEMPRE** i DPI prescritti: Camice chiuso, occhiali e guanti
 - **Evitare:** capelli lunghi sciolti, gioielleria ingombrante o penzolante, sciarpe, calzature aperte.



SICUREZZA IN LABORATORIO

- **SEGUIRE LE NORME DI COMPORTAMENTO:**
 - Non si deve **mangiare, bere o fumare** in laboratorio
 - Indossare **camice e dispositivi di protezione individuale (DPI)**
 - Mantenere in **ordine** la propria postazione di lavoro
 - Lavorare **sempre** in **presenza** di almeno un'altra persona
 - **Corretto smaltimento dei rifiuti**



SICUREZZA IN LABORATORIO

- **Eliminare in modo corretto i rifiuti** chimici e biologici (solidi o liquidi) prodotti nel laboratorio.
- Per **ogni tipo di rifiuto c'è il corretto contenitore**
- Sul contenitore c'è la descrizione del contenuto, nome dell'operatore, data
- Avvisare chi di dovere quando il contenitore è pieno per raccolta e corretto smaltimento



 Solventi alogenati

SICUREZZA IN LABORATORIO

- **Leggere**, sempre le **etichette** del prodotto chimico che si utilizza
 - Simboli e informazioni essenziali sono presenti sull'etichetta
 - Informazioni più estese sono presenti nella schede di sicurezza.
- **MAI DAR DA BERE ALL'ACIDO!!!**
 - Aggiungere sempre sempre l'acido all'acqua, mai vice-versa
 - Aggiungere a piccole porzioni, cautamente e mescolando dopo ogni aggiunta

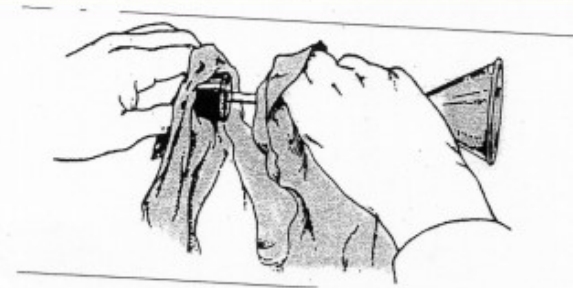


ACIDO CLORIDRICO	
	FRASI DI RISCHIO: R23 - Tossico per inalazione. R35 - Provoca gravi ustioni.
	
	INDICAZIONI DI PERICOLO: H331 - Tossico se inalato. H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. * - HCl gassoso puro.
	CONSIGLI DI PRUDENZA: P102 - Conservare fuori dalla portata dei bambini. 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 - Contattare 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	

SICUREZZA IN LABORATORIO

UNA VOLTA FINITO L'ESPERIMENTO:

- **Pulire** la propria **vetreria** accuratamente
- Lasciare **pulita e in ordine** la postazione di lavoro e spegnere tutti gli apparecchi (eccetto quelli ch devono rimanere accesi)
- Prima di uscire dal laboratorio **togliersi i DPI**, se monouso smaltirli correttamente, e **lavarsi le mani**



STRUMENTAZIONE di BASE

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



- **VETRERIA – per diluizioni/reazioni (OK riscaldare)**



Provette
(test tube)



Becher
(beaker)



Beuta e Beuta a vuoto
(Erlenmeier or conical flask)



Palloni di
(Roundbottom flask)

- **STRUMENTAZIONE – per diluizioni/reazioni**



**Piasta riscaldante con
agitatore magnetico**
(hotplate with magnetic stirrer)



**Sbarrette
magnetiche**
(magnetic stirrer bar)



**Bacchetta di
vetro**
(glass rod)



Termometro
(thermometer)

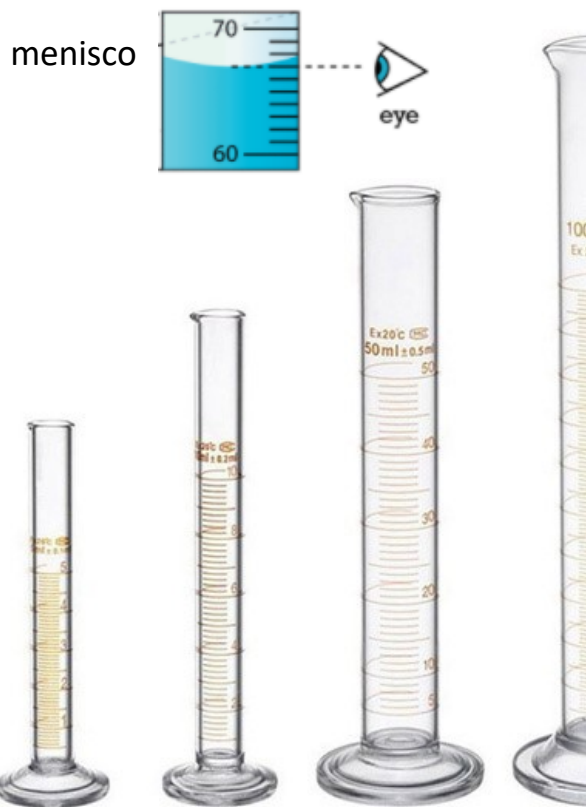
- VETRERIA – per diluizioni**

Media precisione

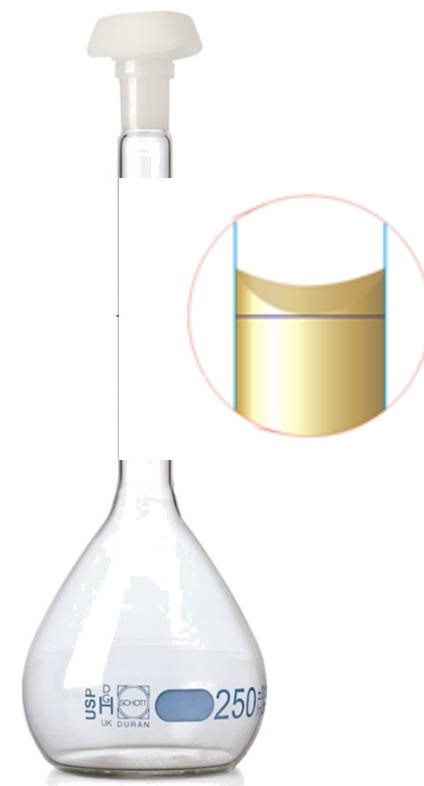


Bottiglie Schott graduate
(*graduated Schott bottle*)

Alta precisione (MAI SCALDARE!)



Cilindri graduati
(**in vetro o plastica**)
(*graduated cylinder*)



Matracchi
(*volumetric flask*)

PLASTICHERIA di LABORATORIO



Spruzzette
(squeeze bottle)



0.5 2 1.5 ml

Provette "Eppendorf"
(Eppendorf tube)



Provette "Falcon" da 15 o 50 ml
(Falcon tube)



Portaprovette
(test tube rack)

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:

- **Portata:** elevata (es. 1 kg)
- **Sensibilità:** moderata (0,01g)
(cioè pesa il centesimo di grammo)



Bilancia analitica

- **Portata:** moderata (es. 100 – 200 g)
- **Sensibilità:** elevata (0,1 mg)
(cioè pesa il decimo di milligrammo)



- Deve essere perfettamente **in piano** (spesso dotata di bolla)
- Mai pesare direttamente sul piano – **usare una navicella** (oppure carta cerata, alluminio, parafilm, ecc.)
- Attenzione a **correnti d'aria** e **vibrazioni**
- **Lasciare sempre pulita!**

STRUMENTAZIONE di BASE

- Piccoli strumenti e materiale utili per la pesata:



Navicella (NB necessario azzerare il peso)
(*weighing tray*)



Spatola e pinzetta
(*spatula & tweezer*)



Carta da pesatura
(*weighing paper*)



Parafilm

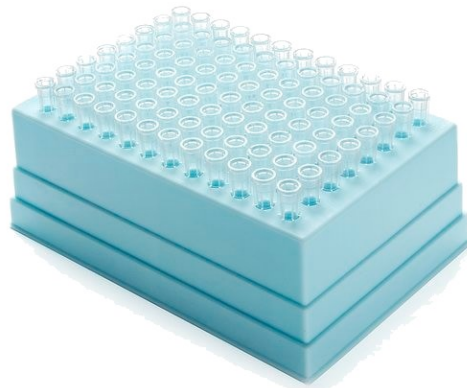
Pipette, micropipette e propipettatori



Micropipette a volume variabile (molto precise)



Puntali per micropipette (in confezione)
(*pipette point rack*)



Pipetta Pasteur (poco precise)



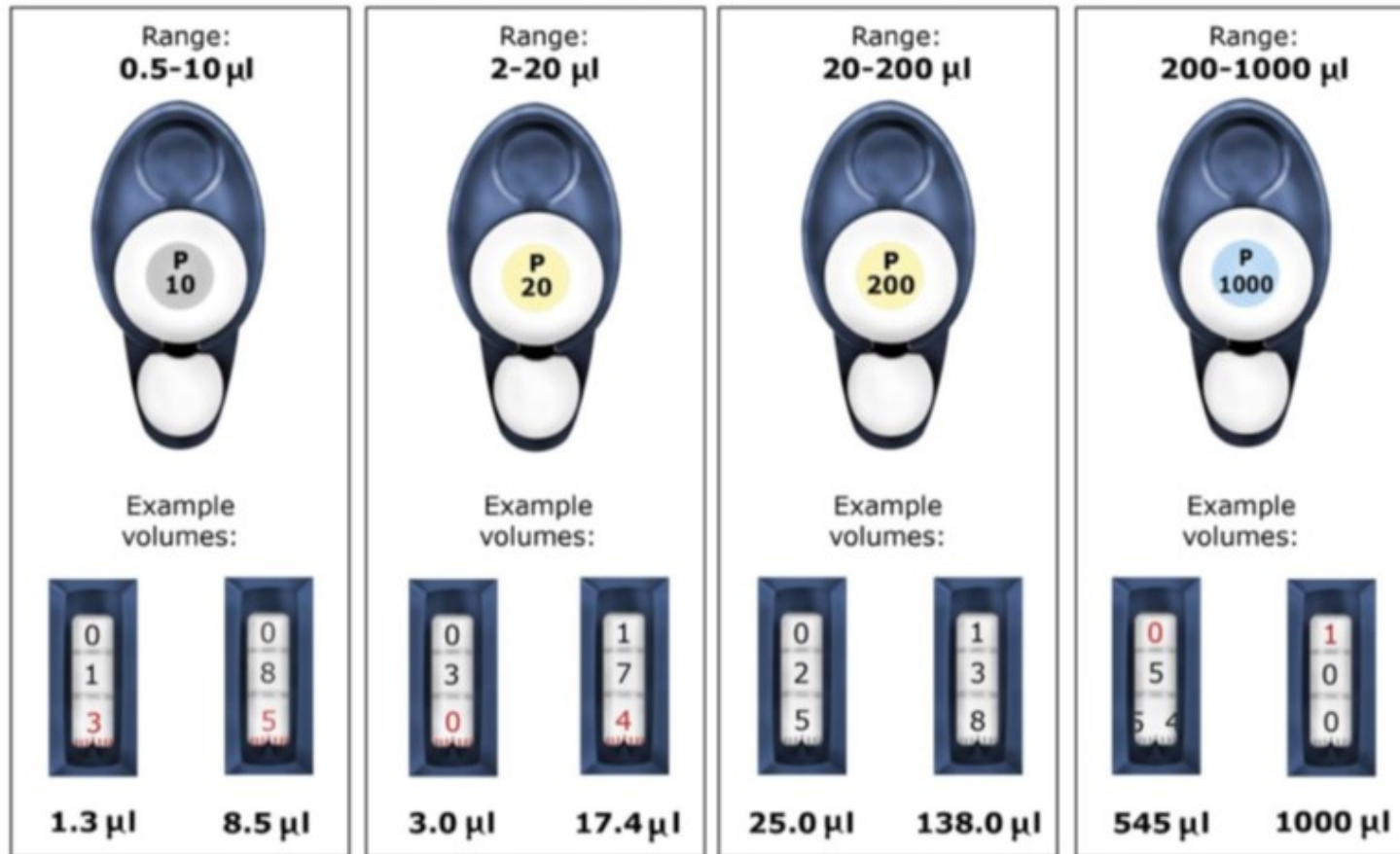
Pipetta graduata in vetro o plastica (precise)



Propipettatori



Micropipette (a volume variabile)



- Diverse gamme di volumi – Pn indica il volume massimo, (es. P10 = 10 μl , P200 = 200 μl)
- Per ogni Pn corrisponde un volume minimo dispensabile con precisione
- Si seleziona il volume desiderato con l'indicatore (P10 e 20, se rosso indica decimali)
- MAI andare sopra il massimo o sotto il minimo
- Tenere sempre la pipetta **in posizione verticale** quando si dispensano liquidi
- Controllare periodicamente la corretta funzione (es. con bilancia analitica)

Utilizzo delle micropipette – richiede manualità e attenzione



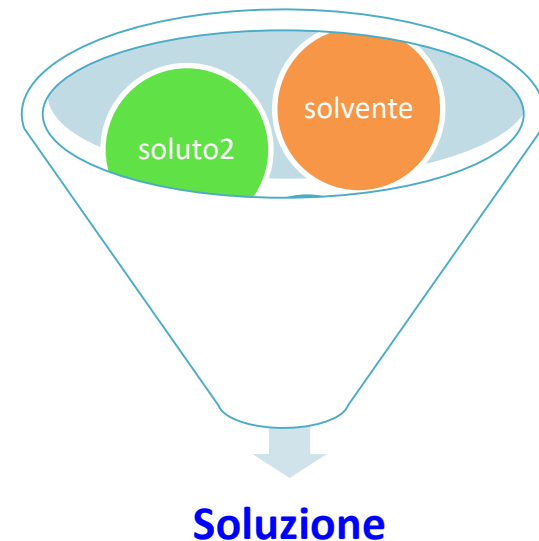
- 1) Inserire puntale;
- 2) Settare il display usando la rotella (andare leggermente oltre il volume desiderato poi tornare a quello preciso);
- 3) Premere il pistone fino alla **prima** resistenza (non oltre !);
- 4) Prelevare il liquido **rilasciando piano** il pistone, per non creare bolle;
- 5) Per rilasciare il liquido, premere fino alla prima resistenza e poi aumentare la pressione e premere fino alla seconda resistenza (Questo assicura che non rimanga liquido nel puntale).

Esperienza di Laboratorio

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

Una soluzione è una miscela omogenea di uno o più soluti disciolti 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 (in moli)** e la **quantità di solvente (in mL)**.



Leggere bene il
protocollo

- Esegui alcuni **calcoli** necessari per ottenere la corretta diluizione
- Fai molta attenzione all'**unità di misura** utilizzata per la concentrazione:
 1. **percentuale in massa** (massa soluto in grammi/100 g soluzione) **(w/w)**
 2. **percentuale in volume** (volume soluto in mL/100 mL soluzione) **(v/v)**
 3. **percentuale massa/volume** (massa soluto in g/100 mL soluzione) **(w/v)**
 4. **molarità** (moli soluto/litro soluzione) **(M)**
 5. **molalità** (moli soluto/kg solvente) **(b)**

**Prepara il
materiale
occorrente**

- Controllare le sostanze in dotazione sul bancone
- Controllare se ci sono soluzioni già pronte e qual è la loro concentrazione
- Costatare le diluizioni da eseguire
- Eseguire i calcoli necessari
- Ricontrollare i calcoli

**Avere pronta
tutta la
strumentazione**

- Spatoline
- Bilancia
- Navicella
- Micropipette o pipette + propipettatori
- Becher
- Falcon
- Spruzzetta con acqua distillata



Scegli la strumentazione adatta in base alle quantità di materiale da utilizzare, sia di soluto che di solvente.

Esperienza di Laboratorio

- Preparare 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 la soluzione dobbiamo prima capire quante moli di NaCl ci sono in 50 mL di una soluzione 0,1 M, con la seguente proporzione:

$$0,1 \text{ moli di NaCl} : 1 \text{ litro di soluzione} = X \text{ moli di NaCl} : 50 \text{ mL di soluzione}$$

da cui:

$$X \text{ moli NaCl} = 0,1 \times 50/1000 \text{ (mL)} = 0,005 \text{ moli}$$

per tradurre in grammi usiamo la seguente formula: massa (g) = numero moli \times peso molecolare
 $m = n \times MW$

Na: massa atomica: 22,99 u Cl: massa atomica: 35,45 u (*unified atomic mass unit, u o Da*)

NaCl massa molecolare: 58,44 u MW = 58,44 g/mol

massa in g di NaCl da utilizzare: $58,44 \times 0,005 = 0,292 \text{ g}$

Alternativa: usare la formula $n = MV/1000$ ($n = n^\circ$ moli, M = molarità, V = volume in ml)

$$n = (0,1 \times 50)/1000 = 0,005$$

$$m = n \times MW = 0,005 \times 58,44 = 0.292 \text{ g} = 292 \text{ mg}$$

- **OCCORRENTE** - Scegliere in base alle quantità

Nel nostro caso: 292 mg

- 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)

LE 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, ma basterà diluire opportunamente lo stock per ottenere la concentrazione voluta.

Soluzione madre



diluizioni

- La concentrazione dello **stock** può essere indicata nel suo **valore assoluto** (es. **0,5 M**) oppure in modo **relativo** alla concentrazione d'uso, indicando quante volte lo stock è più concentrato della concentrazione d'uso (es. **10 ×**).

•

10× (leggi: "10 per") indica che lo stock è 10 volte più concentrato del necessario. Per arrivare alla concentrazione corretta (**1×**) si dovrà diluire 10 volte, cioè 1:10

DILUIZIONI

Esempio: preparare 1L di soluzione NaCl 0.5M partendo da stock di 2M

Calcoli da fare: $C^1 \times V^1 = C^2 \times V^2$

$$2M \times x = 0.5M \times 1L$$

$$x = \frac{0,5 \times 1}{2}$$

$$= 0,25L = 250 \text{ mL}$$

Ragionando diversamente: Ho una soluzione madre 10M e voglio ottenere una finale 2M.
Quante volte devo diluire?

$$\frac{2}{0,5} = 4 \times \text{quindi devo diluire 4 volte} \quad C^{\text{iniziale}}/C^{\text{finale}} = \text{fattore di diluizione (fD)}$$

che volume finale voglio ottenere? 1L

$$\frac{V^{\text{finale}}}{fD} = \text{Volume da prelevare} \quad 1 / 4 = 0,25L \quad \text{Quindi devo prelevare 250 ml.}$$

Esperienza di Laboratorio

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

- **Prima controlliamo cosa è fornito in dotazione, poi ragioniamo**

Sul bancone c'è:

- Soluzione di saccarosio 9% (w/v) (quindi devo pesare o diluire?)
- Soluzione di ampicillina a 100 mg/ml
- Soluzione di ampicillina a 2 mg/ml } (quale scelgo?)
- Soluzione di EDTA 10 mM

$$V_{\text{prelevare}} = V_{\text{fin}} / f^D$$

Saccarosio 9% → basta diluire. $C^{\text{iniz}}/C^{\text{fin}} = f^D$ $9/3 = 3\times$ $V^{\text{fin}}/f^D = 10/3 = 3,33\text{ml}$

EDTA 2 mM → basta diluire. $10/2 = 5\times$ $V^{\text{fin}}/f^D = 10/5 = 2\text{ml}$

Ampicillina

Soluz.1: $f^D = 100^{\text{(mg/ml)}} / 1^{\text{(mg/ml)}} = 100\times$ $10^{\text{ml}}/100 = 0,1 \text{ ml}$ da prelevare

Soluz.2: $f^D = 2^{\text{(mg/ml)}} / 1^{\text{(mg/ml)}} = 2\times$ $10^{\text{ml}}/2 = 5 \text{ ml}$

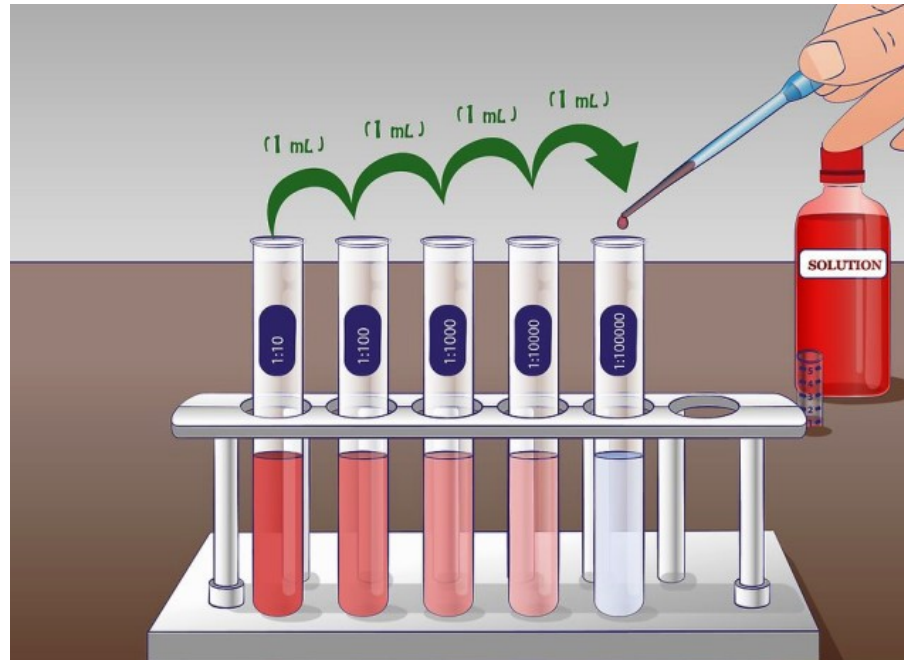
Sceglierò la soluzione 1 poiché ho già 5.33 ml fra saccarosio ed EDTA

DILUIZIONI SERIALI

- Se si devono preparare soluzioni a concentrazioni molto basse, diventa impossibile pesare accuratamente le quantità di soluto necessaria persino con bilancia analitica, oppure diluire lo stock anche con micropipetta di precisione .

Ad es potrebbe essere necessario pesare 0,00000015g di sale in 100 ml di acqua

- In questo caso è necessario preparare soluzioni a concentrazione intermedia, partendo da uno stock più concentrato, eseguendo diluizioni seriali.



DILUIZIONI SERIALI

Esempio: diluisci 1:10000 la soluzione in dotazione per ottenere 1 ml di soluzione finale

Ragioniamo: Se facessi un'unica diluizione dovrei usare $V^{\text{fin}}/f^{\text{D}} = 1/10000 = 0,0001\text{mL} = 0,1 \mu\text{l}$
Non è possibile prelevare 0,1 μl con una micropipetta di precisione

Oppure posso usare diluizioni seriali

Occorrente:

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

Procedimento:

- 1) Preparare le provette Eppendorf sul portaprovette, numerandole
- 2) Aggiungere 900 μl d'acqua distillata in ciascuna provetta
- 3) Trasferire 100 μl dalla soluzione più concentrata con una micropipetta P200 in provetta 1
- 4) Mescolare bene, aspirando e facendo defluire il liquido almeno 3 volte
Otteniamo così una diluizione 1:10
- 5) Ripetere l'operazione prelevando 100 μl dalla provetta 1 e trasferendo in provetta 2 ecc.
Otteniamo così una diluizione 1:100
- 6) Ripetere l'operazione fino ad arrivare alla diluizione desiderata (provetta 4 1:10000)