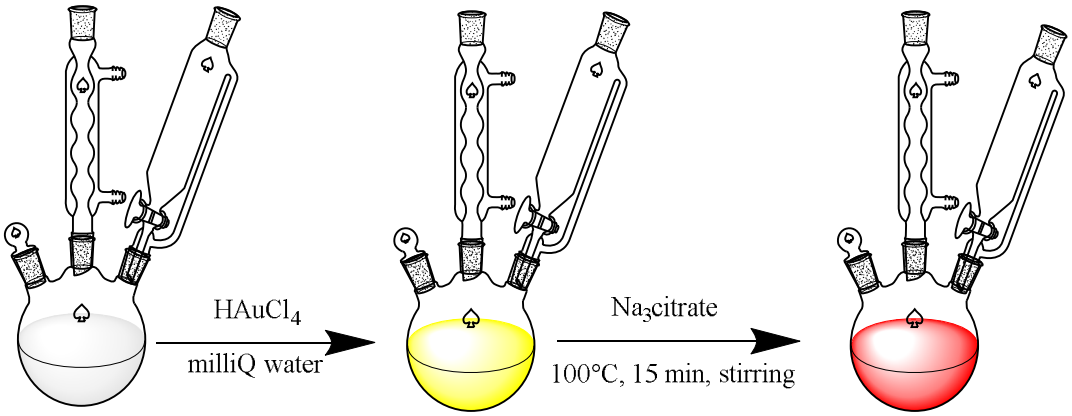
LABORATORIO DI NANOBIOTECNOLOGIE

Anno accademico 2021-2022

Sintesi di colloidi d'oro di 12-13 nm di diametro

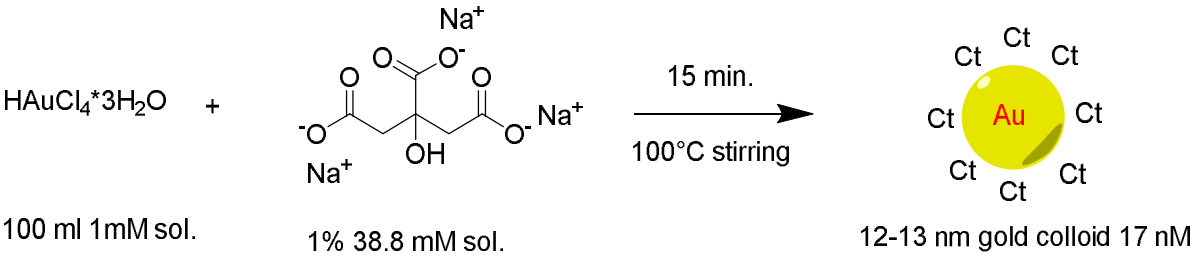
Esperienza adattata da *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 949–955.



Reagenti e soluzioni che verranno utilizzate

Nome	***Quantità***
Soluzione 1 mM $HAuCl_4$	100 mL (0,39 mg $HAuCL_4$ in 100 mL)
Soluzione 38.8 mM Na_3citrate	10 mL (0,87 g NaCl in 10 mL H_2O milliQ)
PVP polyvinylpirrolidone 15K	0,1 mg/mL
BSA (Bovine Serum Albumine)	1 mg/mL
NaCl 1 M	0,100 mL

Schema di reazione



Procedura sintetica

1) In un pallone a tre colli si pone una barretta magnetica e si versano 100 mL di una soluzione 1 mM di $HAuCl_4$ triidrato. Dopodiché, la soluzione viene portata ad ebollizione sotto agitazione costante e vigorosa usando una calotta riscaldante.

Note: il colore della soluzione è giallo brillante.

2) Si inseriscono in un imbuto gocciolatore 10 mL di una soluzione 38.8 mM di sodio citrato (Na_3citrate). L'imbuto viene poi inserito in uno dei colli del pallone. Quando la soluzione è all'ebollizione, si apre il rubinetto in modo che tutta la soluzione precipiti in unico momento nel pallone, sempre sotto vigorosa agitazione.

3) In pochi minuti Il colore della soluzione vira da giallo brillante a trasparente e poi a blu scuro sino a diventare rosso porpora.

4) Dopo aver aspettato 15 minuti da quando il colore della soluzione è diventato rosso porpora, si spegne il riscaldamento mantenendo l'agitazione per altri 15 minuti circa, dando modo alla soluzione di raffreddarsi.

5) Una volta che la soluzione si è raffreddata, viene trasferita in diversi porta campioni da 20 mL, direttamente con un imbuto e aiutandosi con una pipetta pasteur.

NOTA: chiudere i portacampioni con i tappi e per evitare confusione segnare le proprie iniziali sul tappo.

Gruppo A) Stabilizzazione sterica dei colloidi con BSA (bovine serum albumine)

Si lavora con la soluzione di uno dei portacampioni da 20 mL

1) Si trasferiscono con una micropipetta 0,5 mL di una soluzione acquosa di colloidi d'oro in 7 portacampioni diversi.
2) In 6 di questi portacampioni si aggiungono aliquote a volume crescente di BSA (concentrazione della soluzione di partenza 1 mg/mL) in modo da ottenere una diversa concentrazione di proteina in ciascuna cuvetta. Il range di concentrazioni è di 5-160 μg/mL (5 μg, 10 μg, 20 μg, 40 μg, 80 μg e 160 μg). Nell'ultimo portacampioni non si aggiunge proteina, ma servirà come controllo.
   NOTA: segnare sul portacampioni la concentrazione di proteina inserita per evitare di confondersi nei passaggi successivi, la cuvetta usata come controllo verrà denominata controllo.
3) Tappare i portacampioni e aspettare 10 minuti circa.

Gruppo B) Stabilizzazione di colloidi di oro con un polimero, polivinilpirrolidone (PVP)

Si lavora con la soluzione di un portacampione da 20 mL.

1) Si trasferiscono 0,5 mL di colloidi d'oro in 7 portacampioni da 4 mL.
2) In 6 di questi si aggiungono diverse aliquote di PVP (concentrazione 0,1 mg/mL) in modo da ottenere una diversa concentrazione di polimero in ciascun portacampioni. Il range di concentrazioni è di 1-6 μg/mL (1 μg, 2 μg, 3 μg, 4 μg, 5 μg e 6 μg), nell'ultimo portacampioni non si aggiunge PVP, ma servirà come controllo.
   NOTA: segnare sui portacampioni la concentrazione di polimero per evitare di confondersi nei passaggi successivi.
3) Tappare i portacampioni e aspettare 10 minuti.

Studio della stabilità dei colloidi protetti con la spettroscopia UV-Vis

4 gruppi svolgeranno questa esperienza l'11 novembre, i restanti gruppi svolgeranno l'esperienza il 18 novembre.

Lo scopo di questa esperienza è di indagare la stabilità delle diverse soluzioni di oro colloidale passivate dal PVP o dalla BSA e determinare quale è la concentrazione minima necessaria per stabilizzare il sistema.

1) Si lavora con le soluzioni dei portacampioni da 4 mL preparate precedentemente con i colloidi d'oro e le diverse concentrazioni di proteina o polimero.

2) Nei 6 portacampioni (escludendo quella di controllo) si aggiungono 0.1 ml di una soluzione di NaCl 1.5 M.

NOTA: prestare attenzione ai cambiamenti di colore rispetto al controllo, sono una utile indicazione sulla stabilità delle soluzioni colloidali.

3) Prelevare una cuvetta UV-Vis dalla scatola prestando attenzione a non toccare il lato su cui inciderà il raggio ottico all'interno dello strumento (indicato da un triangolino trasparente sulla cuvetta)
4) Prelevare dai portacampioni 200 μL di soluzione e versarla nella cuvetta UV-Vis. Aggiungere poi 0,6 mL di H_2O milliQ in modo da ottenere un fattore di diluizione di 1/3.
5) Tappare le cuvette.

Verranno acquisiti dal responsabile 7 spettri (1 per ciascuna soluzione nelle cuvette).

Confrontando i diversi spettri ottenuti rispetto al "controllo" sarà possibile determinare la concentrazione minima necessaria per mantenere la soluzione colloidale stabile.

Preparazione della soluzione per Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), DLS e TEM

Per preparare le soluzioni che verranno utilizzate per preparare il campione per NTA, DLS e TEM si utilizza la soluzione colloidale contenuta in un portacampioni da 20 mL.

1) Prelevare 2x (0,5) mL di soluzione e trasferirla in un due diverse portacampioni da 4 mL.
2) Una verrà usata come controllo nell'esperienza al DLS, nell'altra si aggiunge la concentrazione di polimero o proteina sufficiente per garantirne la stabilità (vedi esperienza UV-Vis). Si aspettano 10 minuti.
3) Si trasferisce la soluzione con il polimero o proteina in una eppendorf da 1,5 mL e la si consegna al responsabile.
4) La soluzione viene centrifugata (14000 rpm, 15 min.) in modo da far precipitare le nanoparticelle stabilizzate, mentre in soluzione rimarrà il polimero o la proteina in eccesso.
5) Rimuovere il surnatante con una pipetta avendo cura di non risospendere il precipitato.
6) Aggiungere 0,5 mL di acqua milliQ al precipitato. Tappare la eppendorf e agitare sino a riottenere una soluzione omogenea.

Esperienza al Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Lo scopo di questa esperienza è quello di determinare, per mezzo di NTA, il raggio idrodinamico medio dei colloidi d'oro protetti dalla proteina o da PVP. Questo strumento permette di visualizzare, determinare la dimensione ed il numero medio di nanoparticelle del proprio campione.

L'NTA si basa sul moto browniano delle nanoparticelle in un mezzo acquoso e ricava informazioni circa la dimensione (raggio idrodinamico) e la distribuzione media delle nanoparticelle.

Preparazione:

1) Dalla soluzione precedentemente preparata per NTA, DLS e TEM si prelevano 80 μL di soluzione e si trasferiscono in una seconda eppendorf. Si aggiungono 720 μL di H_2O milliQ.

2) Si prelevano da questa soluzione 300 µL, si versano in una nuova provetta e si aggiungono altri 300 µL di H_2O milliQ.

Questa soluzione finale verrà analizzata al Nanosight e verrà determinato il raggio idrodinamico finale.

Esperienza al DLS (Dynamic Light Scattering)

Lo scopo di questa esperienza è quello di determinare, utilizzando lo strumento di analisi DLS, il raggio idrodinamico medio dei colloidi d'oro sintetizzati.

Il DLS non permette di visualizzare direttamente le nanoparticelle, ma ricava informazioni circa la dimensione e distribuzione media delle nanoparticelle sulla base all'intensità di dispersione della luce (scattering) del campione in un arco di tempo stabilito.

1) Dalla soluzione precedentemente preparata per NTA, DLS e TEM si prelevano 0,2 mL e si trasferiscono in una cuvetta UV-ViS.
2) In una seconda cuvetta si trasferiscono 0,2 mL della soluzione preparata come controllo.

Confrontando i risultati sarà possibile sia ottenere un'importante informazione circa la dimensione delle nanoparticelle, sia osservare eventuali cambiamenti di dimensione dati dall'ingombro sterico della proteina o del polimero rispetto alle misure ottenute con il TEM.

Preparazione del campione per analisi TEM

1) Prelevare con una pinzetta (è una pinzetta speciale, chiedere al responsabile) un retino per TEM ed adagiare la pinzetta sul bancone avendo cura di non piegare o toccare il retino TEM a mani nude.
   NOTA: evitare di toccare con la pinzetta il centro del retino, ma rimanere sul bordo.
2) Prelevare con una micropipetta 5 µL della soluzione dal portacampioni da 4 mL e farla cadere al centro del retino TEM. Dopodiché coprire il retino TEM con un imbuto di vetro o un vetrino da orologio in modo che durante la notte l'acqua evapori.
3) Il giorno successivo inserire il retino TEM con la pinzetta in una provetta eppendorf, chiuderla e inserire il nome del gruppo sulla provetta, in modo da evitare confusione.