

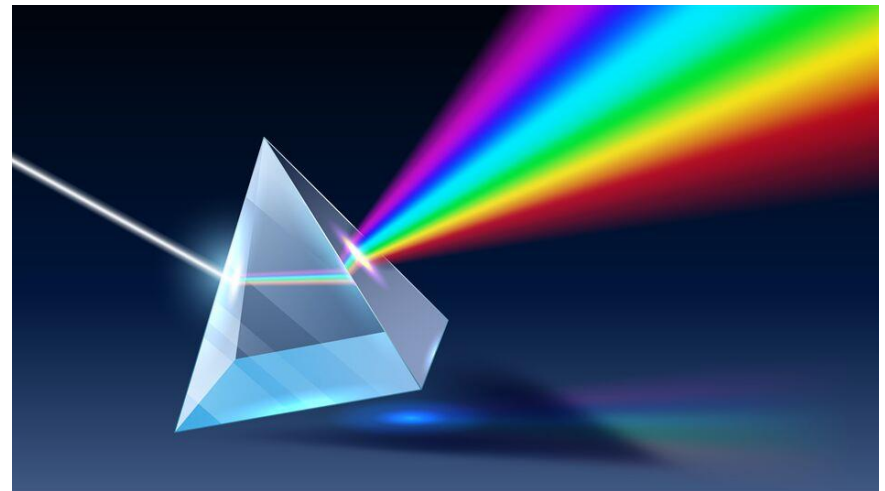
Spettrofotometria di assorbimento

Corso di Biochimica 2 con laboratorio
AA 2026-26 Mario Mardirossian

Spettrometria di assorbimento

La spettrometria di assorbimento (spettrofotometria) UV-visibile si basa sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche nel campo della luce visibile e dell'UV (ultravioletto) da parte di molecole.

Determinazione qualitativa e quantitativa di numerose sostanze organiche (biomolecole) ed inorganiche

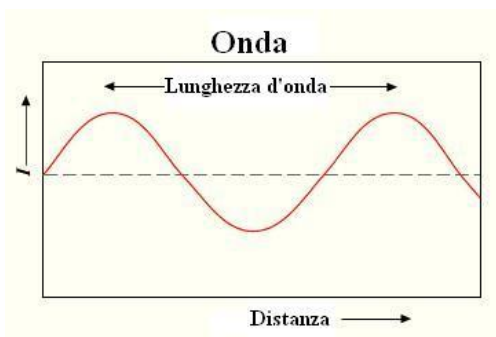


- ▶ **Tecniche spettroscopiche anche complesse:** utilizzate per studiare la struttura, il microambiente e la dinamica molecolare attraverso l'analisi dell'interazione con le radiazioni elettromagnetiche.
- ▶ **Tecniche non distruttive** nei riguardi del campione in esame. Spesso possono essere impiegate anche su biomolecole non purificate.

Le proprietà della radiazione elettromagnetica

- ▶ La radiazione elettromagnetica ha una doppia natura. Essa possiede sia proprietà di un'onda e di una particella priva di massa (corpuscolo)

Natura ondulatoria



λ (lunghezza d'onda) e ν (frequenza) sono correlate dalla relazione:

$$\lambda = c/\nu$$

$$c \approx 3 \times 10^8 \text{ m/s}$$

c = v di propagazione.

λ e ν sono inversamente proporzionali

Natura corpuscolare

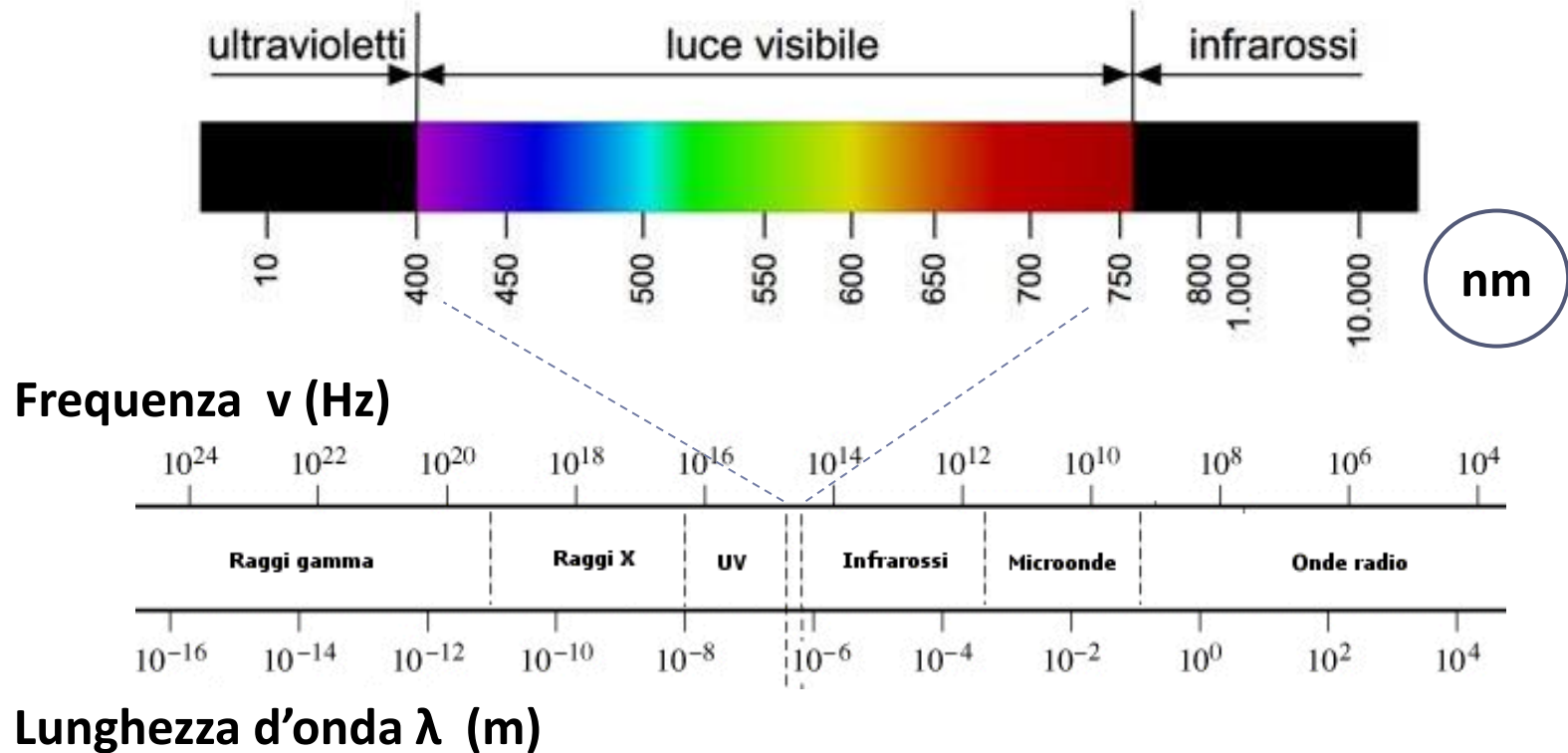
$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

Consiste in “pacchetti” discreti di energia “fotoni”, la cui energia E dipende dalla frequenza ν

E e ν sono direttamente proporzionali

h (costante di Planck) = $6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$

La spettro elettromagnetico



Luce visibile: $\lambda = 380 \text{ nm}$ e 750 nm

Che accade quando una radiazione luminosa colpisce una molecola ?

γ	< 0,1 nm	emissione nucleare
raggi X	0,1-10 nm	transizioni elettroniche (elettroni interni)
UV	10-380 nm	transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
Vis	380-750 nm	transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
IR	780 nm-100 μ m	transizioni vibrazionali
Microonde	100 μ m- 1 cm	transizioni rotazionali
onde radio	1 cm- metri	assorbimento nucleare



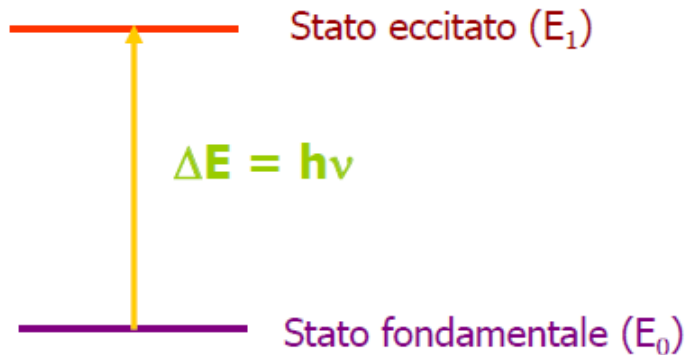
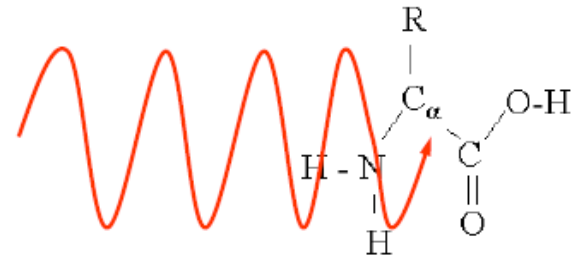
Le molecole interagiscono con la radiazione elettromagnetica assorbendo o cedendo energia passando da stati di energia minore a stati di energia maggiore (assorbimento) o viceversa (emissione)

Spettrofotometria di assorbimento UV-Vis

Usa radiazioni tra 190-780 nm, con energia sufficiente per **attivare transizioni elettroniche nei campioni (atomi, molecole)**, che causano il passaggio di elettroni degli strati esterni dallo stato fondamentale a stati eccitati (stato energetico maggiore)

Visibile : 380 - 780 nm

UV (vicino Ultravioletto) : 190 - 380 nm



Per avere **assorbimento** della radiazione, l'energia del fotone eccitante deve essere esattamente **uguale alla differenza di energia fra lo stato fondamentale ed uno degli stati eccitati** della specie assorbente : $h\nu = \Delta E$

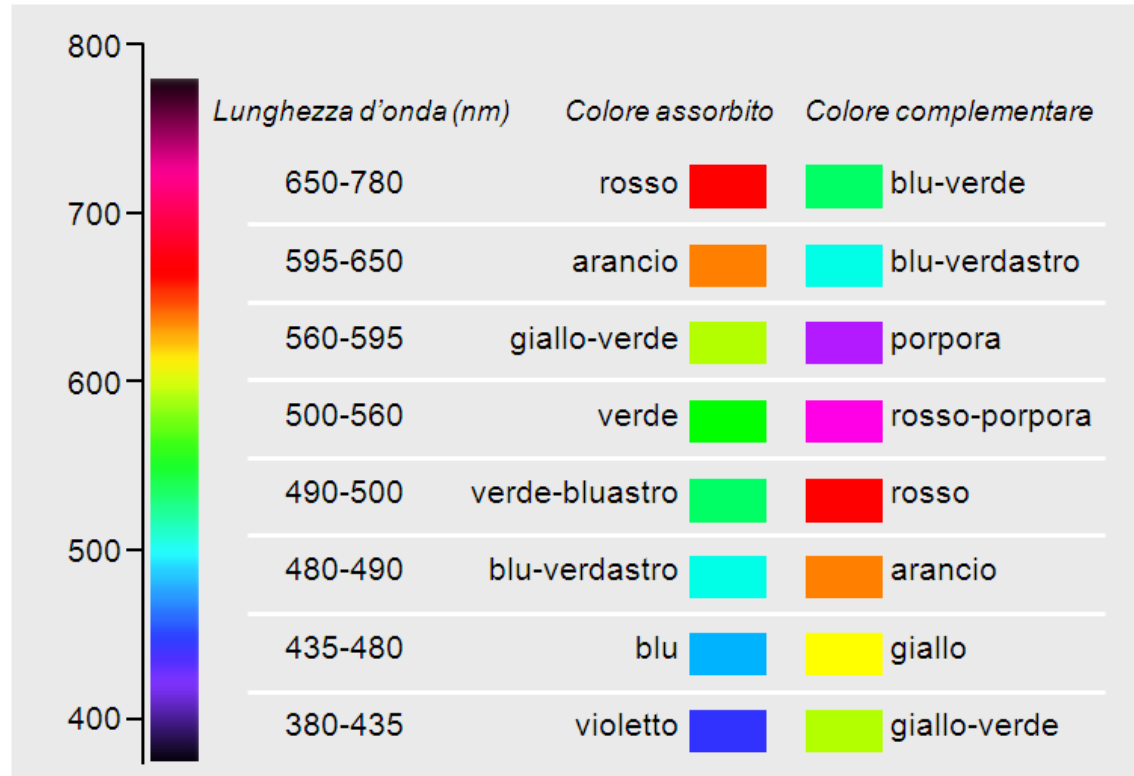
NB! Con l'assorbimento rimuovo frequenze dallo spettro!

Utilizzi:

- ✓ Identificare molecole
- ✓ Quantificare le molecole
- ✓ Analizzare cambiamenti nelle molecole (cinetiche di reazione)

Assorbimento della luce e colore complementare

Quando la luce colpisce un campione, le lunghezze d'onda con energia idonea a promuovere il salto degli elettroni allo stato eccitato sono **rimosse dallo spettro trasmesso**



Gli oggetti appaiono colorati perché essi assorbono la luce di particolari lunghezze d'onda riflettendo le altre quindi agli occhi giungono solo le λ riflesse. Le differenti lunghezze d'onda vengono interpretate dal cervello come colori.





Misura dell'assorbimento: la trasmittanza

Un campione attraversato da una radiazione elettromagnetica di assorbe la luce quando la **radiazione incidente** di intensità I_0 , ad una determinata λ ($190 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$) attraversando il campione diminuisce ad una intensità I inferiore.

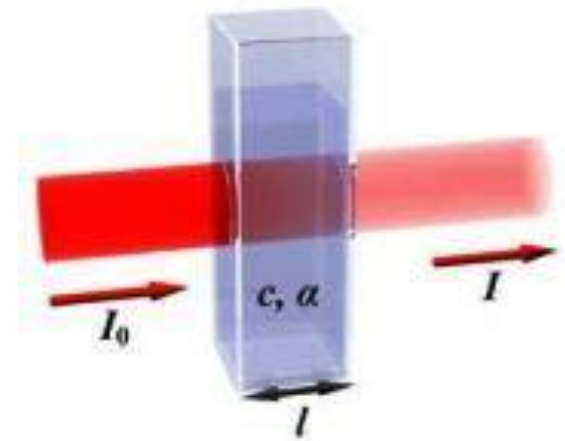
Il rapporto tra luce trasmessa e luce incidente:

$$\text{Trasmittanza } T = \frac{I}{I_0} \quad 0 \leq T \leq 1$$

La **trasmittanza** esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita.

Può essere espressa come %

$$\text{Trasmittanza \%} = T \% = 100 * T$$



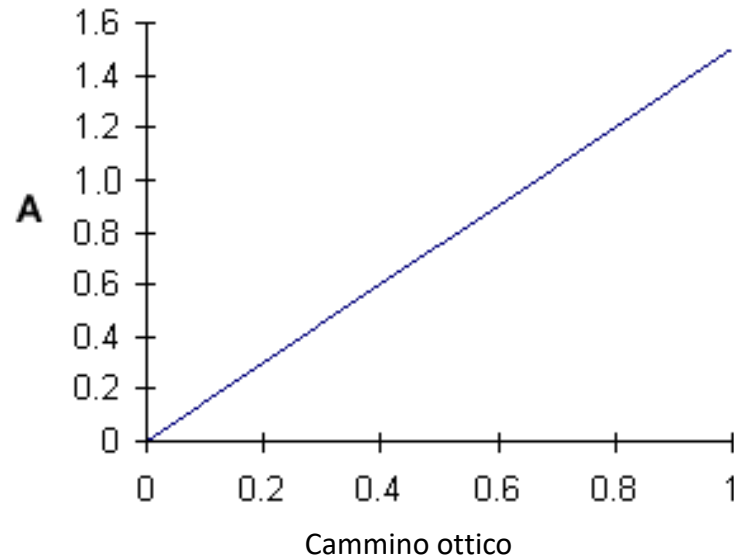
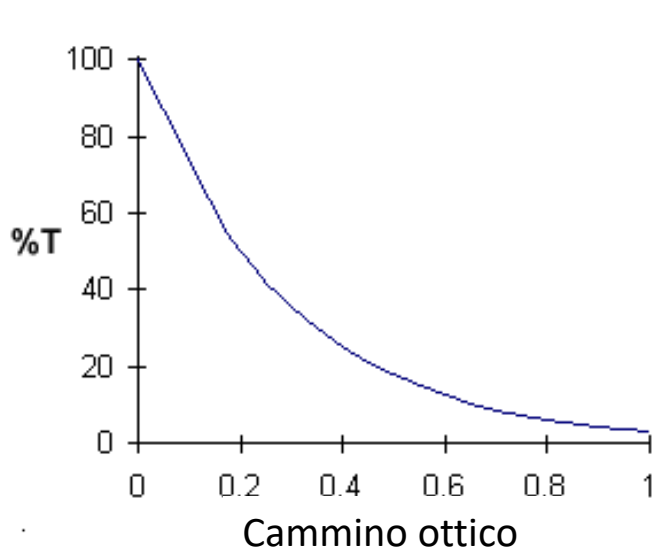
I_0 = intensità di luce incidente

I = intensità di luce trasmessa

l = cammino ottico = spessore della soluzione attraversato dalla luce

Relazione tra trasmittanza e assorbanza

l = cammino ottico = spessore della soluzione attraversato dalla luce



Trasmittanza: non linearmente correlata alla lunghezza del cammino ottico, il decadimento è esponenziale

Utile convertirla in una grandezza linearmente proporzionale ad l :
l'assorbanza (A)

$$\text{Assorbanza } A = \log_{10}(1/T) \quad \rightarrow \quad A = -\log_{10} T$$

Relazione tra trasmittanza e assorbanza

I	I₀	T	T%	A
100	100	1	100%	0,00
90	100	0,9	90%	0,05
80	100	0,8	80%	0,10
50	100	0,5	50%	0,30
30	100	0,3	30%	0,52
20	100	0,2	20%	0,70
10	100	0,1	10%	1,00
1	100	0,01	1%	2,00

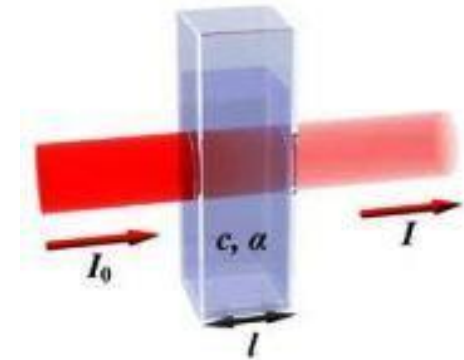
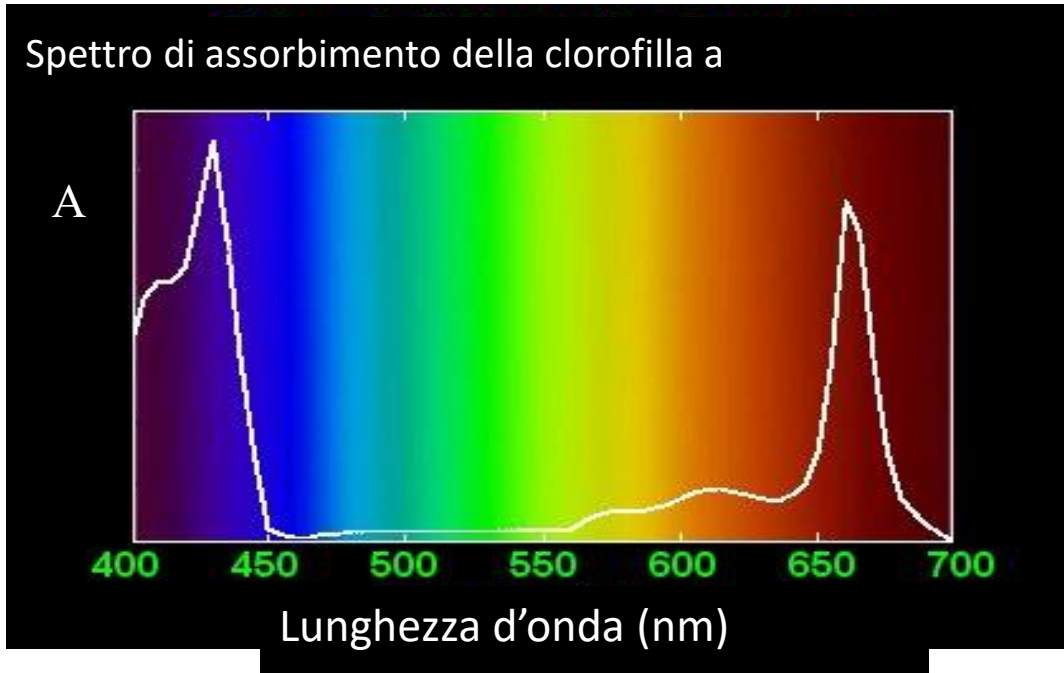
I = intensità di luce trasmessa

I₀ = intensità di luce incidente

Lo spettro di assorbimento

Uno **spettro di assorbimento** è un grafico in cui si riporta l'intensità della radiazione assorbita dal campione (A) in funzione della lunghezza d'onda o frequenza della radiazione stessa. Permette di identificare molecole pure.

Spettro di assorbimento della clorofilla a



Nel caso di un atomo, lo spettro di assorbimento è costituito da righe, mentre per una molecola (sistema più complesso), è costituito da bande

La legge di Lambert-Beer

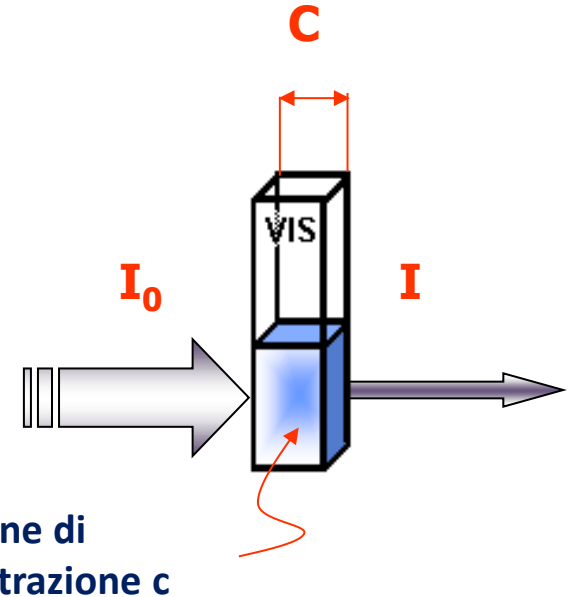
L'assorbanza **A** è proporzionale alla concentrazione della sostanza assorbente, e allo spessore della soluzione attraversata (cammino ottico).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

C = concentrazione
molare della
molecola [M]

coefficiente di assorbimento
molare [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

l = cammino ottico
della cella [cm]



Legge di **Lambert-Beer**: lega l'assorbanza alla concentrazione della molecola che assorbe.

Soluzione di
concentrazione c

Coefficiente di assorbimento molare ϵ : valore di assorbanza del composto quando [$l = 1 \text{ cm}$] e [$C = 1 \text{ M}$], Unità di misura: [M^{-1}, cm^{-1}]

dipende dalla:

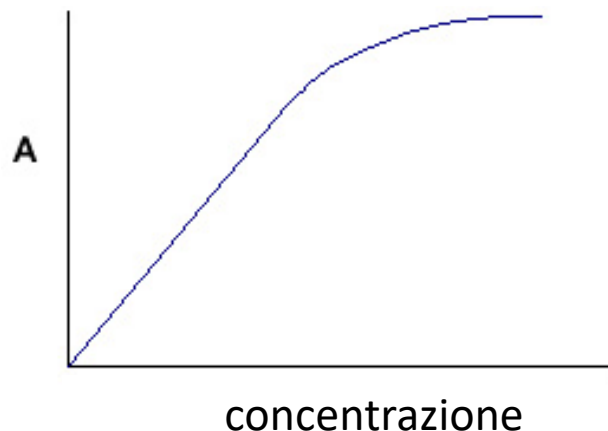
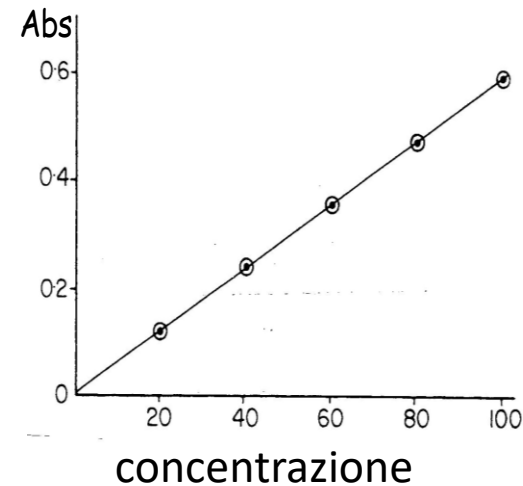
- Specie chimica analizzata
- λ della radiazione assorbita
- Natura del solvente



La legge di Lambert-Beer (II)

Dal valore di ϵ si può ricavare c del campione da misure sperimentali di assorbanza (A o Abs)

$$C = \frac{A}{\epsilon l}$$



Assorbanza e concentrazione sono proporzionali solo per soluzioni **diluite** (circa <10 mM)

Si osservano deviazioni dalla linearità (sottostime) dovute a interferenze per vicinanza.

Deviazioni strumentali

Lo spettrofotometro

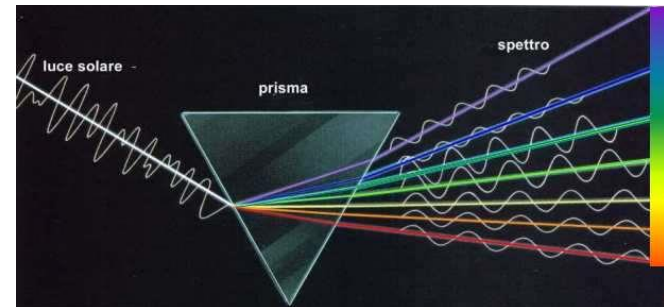


Schema a blocchi di uno spettrofotometro UV/vis

Sorgente della radiazione policromatica. Luce visibile: lampade a incandescenza (es. a filamento di tungsteno). Regione UV: lampada a scarica di gas (es. al deuterio).

Monocromatore: sistema ottico disperde la luce policromatica in bande monocromatiche, 2 tipi:

- **filtri interferenziali:** bloccano una parte della luce



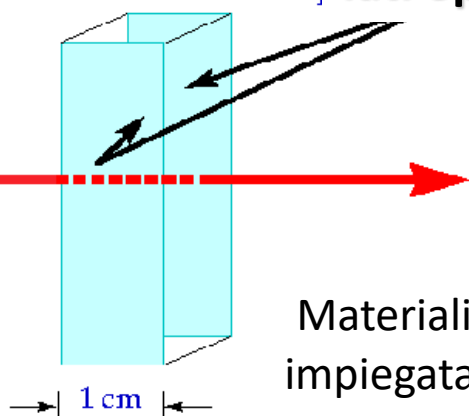
- **elementi disperdenti (prisma o reticolo),** separano le componenti della radiazione selezionano la banda desiderata

La cella (cuvette) del campione

Sorgente Selezionatore di λ Campione Rivelatore



] lati opachi



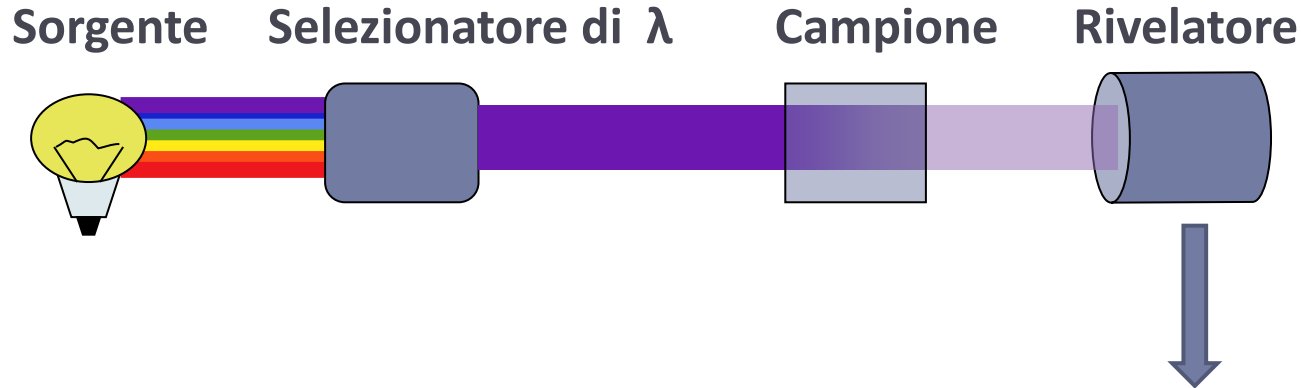
Cella o **cuvette**: contiene il campione da esaminare generalmente in soluzione: Volumi 0,2-3 ml

Materiali trasparenti alla radiazione impiegata, con uno spessore definito e con una capienza fissa (cammino ottico).

- UV: celle in quarzo (SiO_2) 150-3000 nm.
- In plastica (Vis o UV/vis) (250-800 nm)



Il rivelatore/amplificatore



Trasforma l'intensità della radiazione elettromagnetica giunta ad esso (trasmessa) in un segnale elettrico (misura).

Il segnale amplificato è convertito in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale compreso tra 0 a 100.

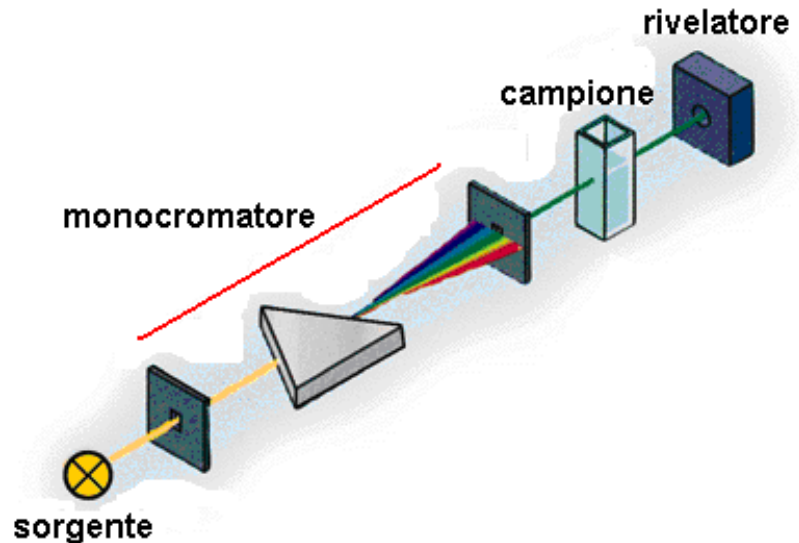
Dal rivelatore dipende sia la sensibilità sia l'accuratezza dello strumento.

la sensibilità di uno strumento è il più piccolo valore della grandezza che lo strumento può rilevare.

Spettrofotometri monoraggio

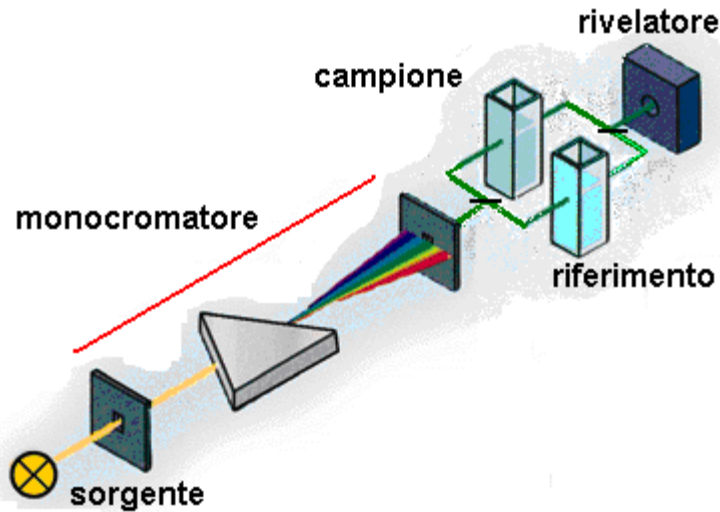
Spettrofotometri **monoraggio**: prevalentemente per analisi quantitativa (misure di concentrazione) con misure a singole λ .

Per ogni λ , si sottrae il contributo del solvente a quello del campione: la lettura contro il bianco (solvente).



Spettrofotometri a doppio raggio

Hanno un sistema che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il solvente (bianco), permette di ottenere un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del solvente.



E' possibile registrare continuamente lo spettro di assorbimento. Il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative.

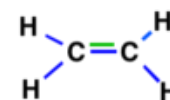
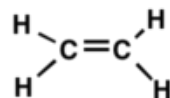
Molecole che assorbono nel visibile-UV

- Dipende dalla disposizione degli elettroni:

Legami π hanno densità elettronica fuori dall'asse di unione tra i nuclei = minor energia per passare allo stato eccitato π^*

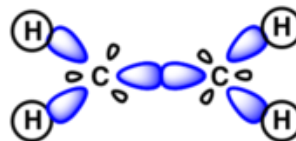
Se aumenta il numero di doppi legami (**coniugati**) aumenta il n di elettroni che possono interagire tra loro nei legami π (e- delocalizzati)

Breaking down the bonding in ethene

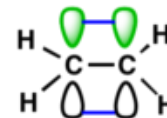


5 **sigma bonds**
1 **pi bond**

Sigma (σ) bond framework:
("end-on" overlap)



Pi (π) bond framework:
("side-on" overlap)



There are 5 sigma bonds in ethene

- 1 C-C sigma bond (sp^2-sp^2)
- 4 C-H sigma bonds (sp^2-H)

One pi bond in ethene

- 1 C-C pi bond

Rappresentazione dell'etilene

Biomolecole che assorbono nel visibile-UV

Contengono gruppi chimici che assorbono: **cromofori** contengono gruppi aromatici, doppi legami, doppi legami coniugati.

Cromoforo	Esempio	λ_{max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Alchene	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}$	177	13000
Alchene coniugato	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	217	21000
Carbonile	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH_3COOH	204	41
Ammide	CH_3CONH_2	214	60
Nitro	CH_3NO_2	280	22
Aromatico	Benzene (C_6H_6)	204, 256	7900, 200

Biomolecole che assorbono nel visibile-UV

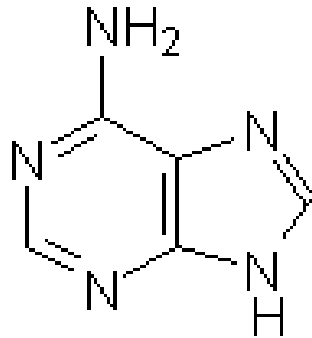
Contengono gruppi chimici che assorbono: **cromofori** contengono gruppi aromatici, doppi legami, doppi legami coniugati.

Cromoforo	Esempio	λ_{max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Alchene	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}$	177	13000
Alchene coniugato	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	217	21000
Carbonile	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH_3COOH	204	41
Ammide	CH_3CONH_2	214	60
Nitro	CH_3NO_2	280	22
Aromatico	Benzene (C_6H_6)	204, 256	7900, 200

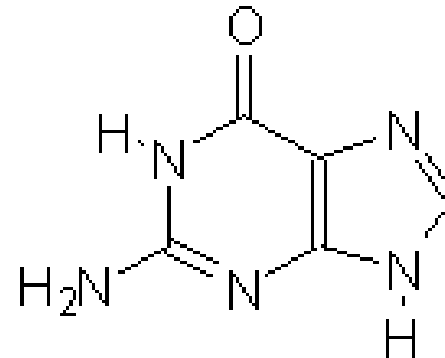
Aumentando il n di doppi legami coniugati aumenta la λ della luce assorbita

The Purines

Adenine

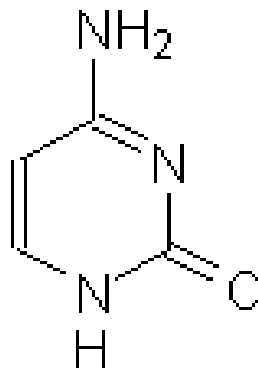


Guanine

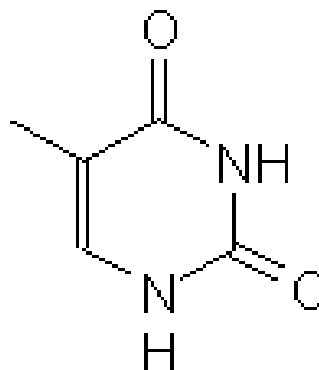


The Pyrimidines

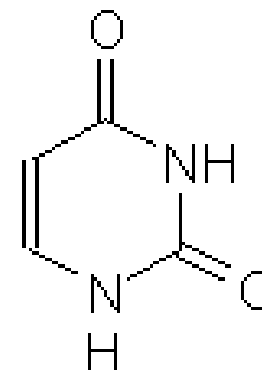
Cytosine



Thymine



Uracil



Biomolecole che assorbono nel visibile-UV

Contengono gruppi chimici che assorbono: **cromofori** contengono gruppi aromatici, doppi legami, doppi legami coniugati.

Cromoforo	Esempio	$\lambda_{\max}$, nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Alchene	C ₆ H ₁₃ CH=CH	177	13000
Alchene coniugato	CH ₂ =CHCH=CH ₂	217	21000
Carbonile	(CH ₃) ₂ C=O	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH ₃ COOH	204	41
Ammide	CH ₃ CONH ₂	214	60
Nitro	CH ₃ NO ₂	280	22
Aromatico	Benzene (C ₆ H ₆)	204, 256	7900, 200

Aumentando il n di doppi legami coniugati aumenta la λ della luce assorbita

	$\lambda_{\max}$, nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Adenina	260	15200
Citosina	260	7050
Guanina	260	12010
Timina	260	8400

Spettro di assorbimento del DNA

Assorbimento nel vicino UV degli acidi nucleici è determinato quasi esclusivamente dalle basi pirimidiniche e puriniche

Lettura spettrofotometrica a $\lambda = 260$ nm

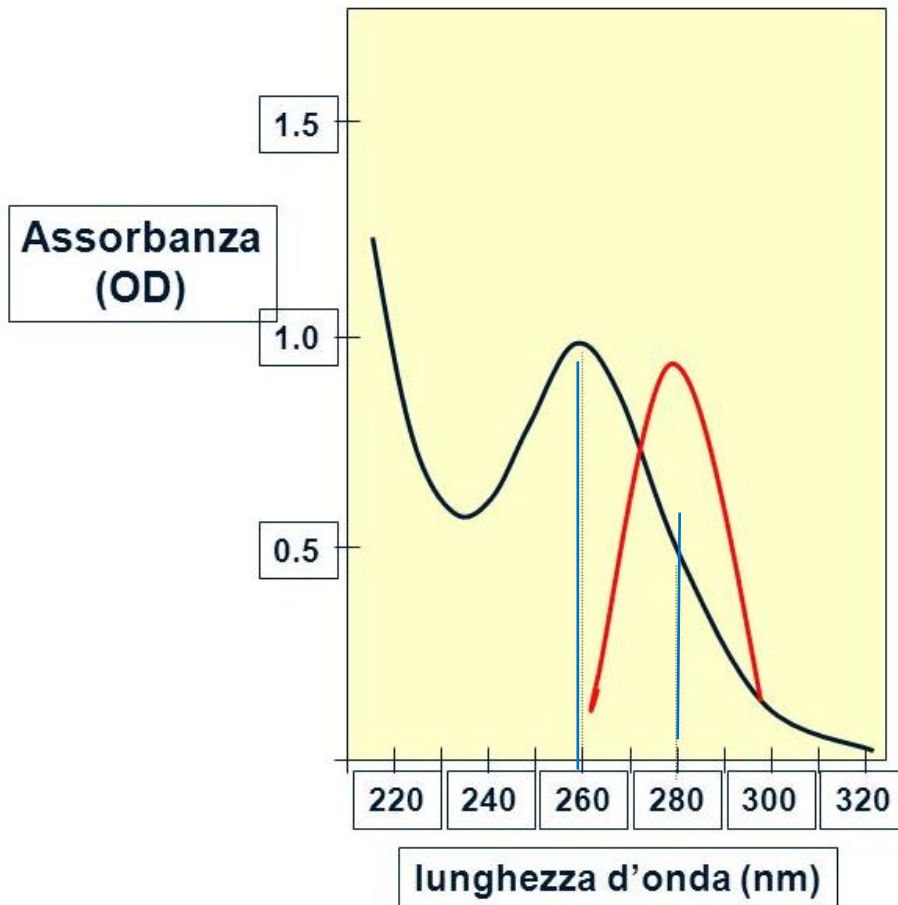
$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 50 \mu\text{g/ml DNA} \quad (l=1 \text{ cm})$$

Il rapporto di A_{260}/A_{280} fornisce un'indicazione del *grado di purezza* dell'acido nucleico rispetto a contaminazioni proteiche presenti

$$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} \text{ tra } 1,8 - 2,0$$

Indica una soluzione pura di DNA

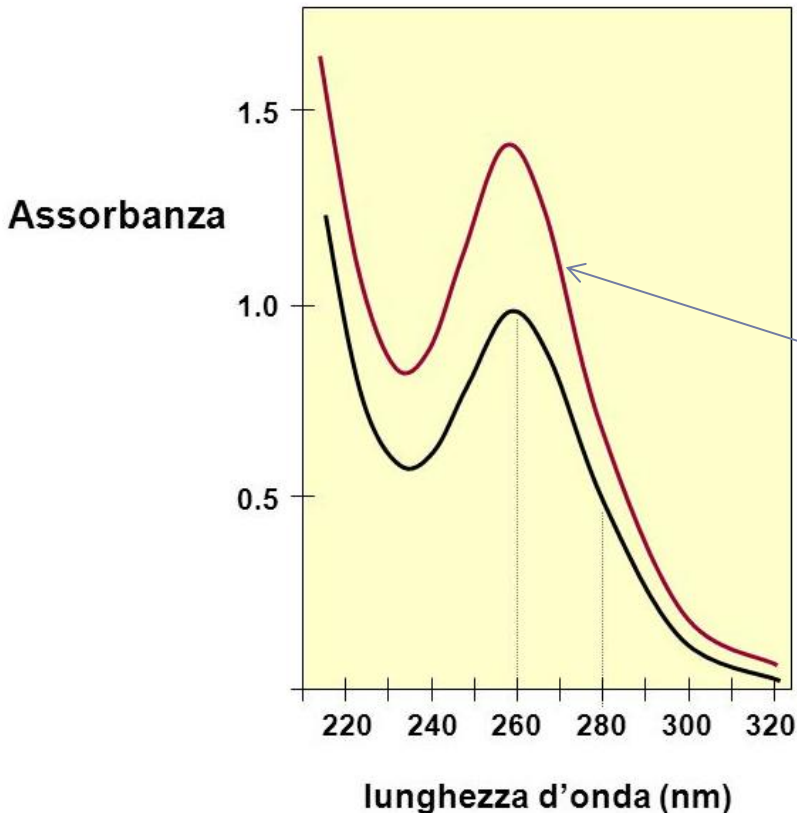
In rosso: picco a 280 dello spettro di assorbimento delle proteine



Effetto ipercromico degli acidi nucleici

Le singole basi assorbono di più quando non sono impilate, e i singoli filamenti assorbono di più dei filamenti doppi.

Spettro di assorbimento del DNA



$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

**effetto
ipercromico**

Singolo filamento

L'assorbanza a 260 nm di una soluzione di DNA aumenta quando la doppia elica è separata nei singoli filamenti

Le misure spettrofotometriche non distinguono tra DNA e RNA

Metodi spettrofotometrici (e non) per la determinazione quantitativa delle proteine

La spettrofotometria permette di quantificare anche le proteine con diverse metodiche.

Perché determinare la concentrazione delle proteine ?

Attività biologica, livelli di espressione, interazione tra due proteine

Quali metodi ?

La scelta dipende dalla natura della proteina, dai componenti presenti nel campione, dalla velocità, dall'accuratezza e la sensibilità del metodo richiesti.

L'accuratezza indica quanto un valore medio si scosta dal valore atteso

La precisione indica quanto le misure di uno stesso valore siano ripetibili

La sensibilità analitica è data dalla minima quantità di un analita rilevabile in un campione biologico.



Metodi spettrofotometrici (e non) per la determinazione quantitativa delle proteine

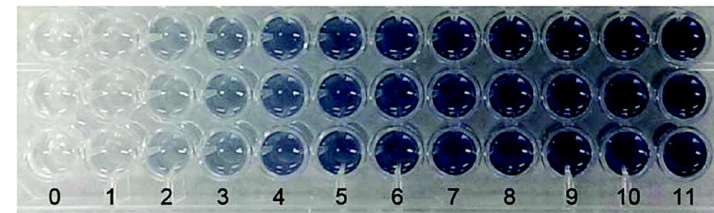
Metodo gravimetrico

Pesata del campione solido. Poco sensibile, necessario disporre di un campione allo stato solido e elevato grado di purezza.



Metodi diretti

Misura dell'assorbanza dei cromofori presenti nelle proteine.
Sensibilità variabile, Influenzati dalla composizione amminoacidica.



Metodi indiretti (reazioni cromogene)

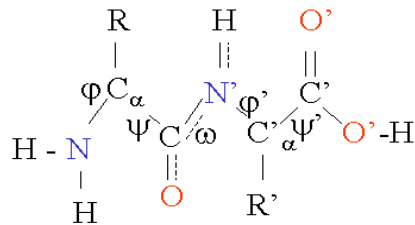
Legame delle proteine ad opportune sostanze cromogene rilevabili mediante spettrofotometria.

Misure relative a proteine di riferimento. Metodi sensibili, accuratezza variabile.

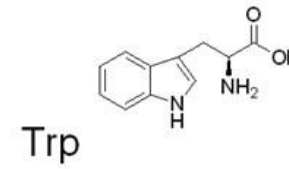
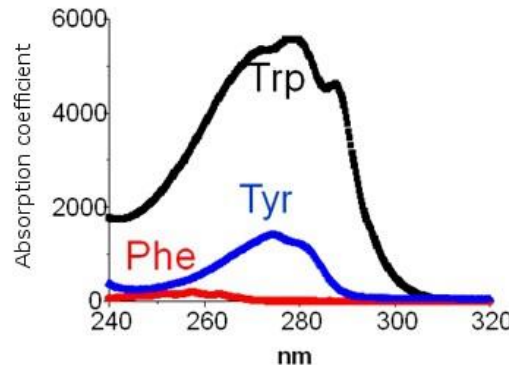


Metodo diretto: misura dell'assorbanza

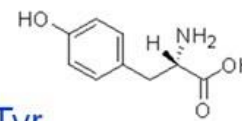
Sfrutta le proprietà dei gruppi chimici che assorbono la luce nella regione dell'UV



Il legame peptidico (214 nm)

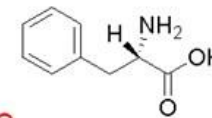


$\lambda = 280 \text{ nm}$



$\lambda = 276 \text{ nm}$

Tyr

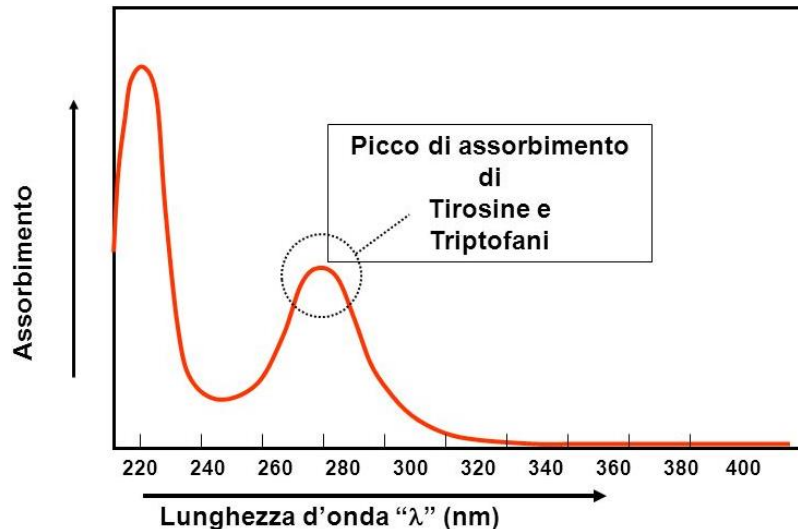


$\lambda = 256 \text{ nm}$
(debole)

Phe

Cys ($\lambda = 235 \text{ nm}$) (debole)

Spettro di assorbimento UV-Vis di una proteina



- ✓ Applicabile a proteine purificate: risente della presenza di contaminanti e tamponi che assorbono attorno a 200 nm, interferendo con l'assorbimento del legame peptidico.
- ✓ Metodo non distruttivo
- ✓ **Dipende dalla composizione aa e dalla struttura della proteina**

Coefficiente di estinzione calcolato

Il coefficiente di estinzione molare può essere calcolato per ogni proteina tenendo conto della sua composizione (nel numero e tipo di aa aromatici):

$$\epsilon_{280} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 5500 \text{ (n. di Trp)} + 1490 \text{ (n. di Tyr)} + 125 \text{ (n. di Cys)}$$

Non è applicabile a miscele di proteine ed a proteine ad identità non nota.

Esempio:



AHPLENAWTFWFDNPQGKSRQVAWGSTIHPIHTFSTVEDFWGLYNNIHNPSKLNVGADFHCFKNKIEPK
WEDPISANGGKWITSCGRGKSDTFWLHTLLAMIGEQQDFGDEICGAVVSVRQKQERVAIWTKNAANEAA
QISIGKQWKEFLDYKDSIGFIVHEDAKRSDKGPKNRYTV

Calcolo : Numero di a.a. = 177
Massa molare= 20197.6 g/mole

n. W= 9, Y= 3, C=3

$$\epsilon_{280} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (5500 \times 9) + (1490 \times 3) + (125 \times \text{Cys})$$

$$\epsilon_{280} = 54345 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Influenza della composizione sullo spettro ultravioletto delle proteine

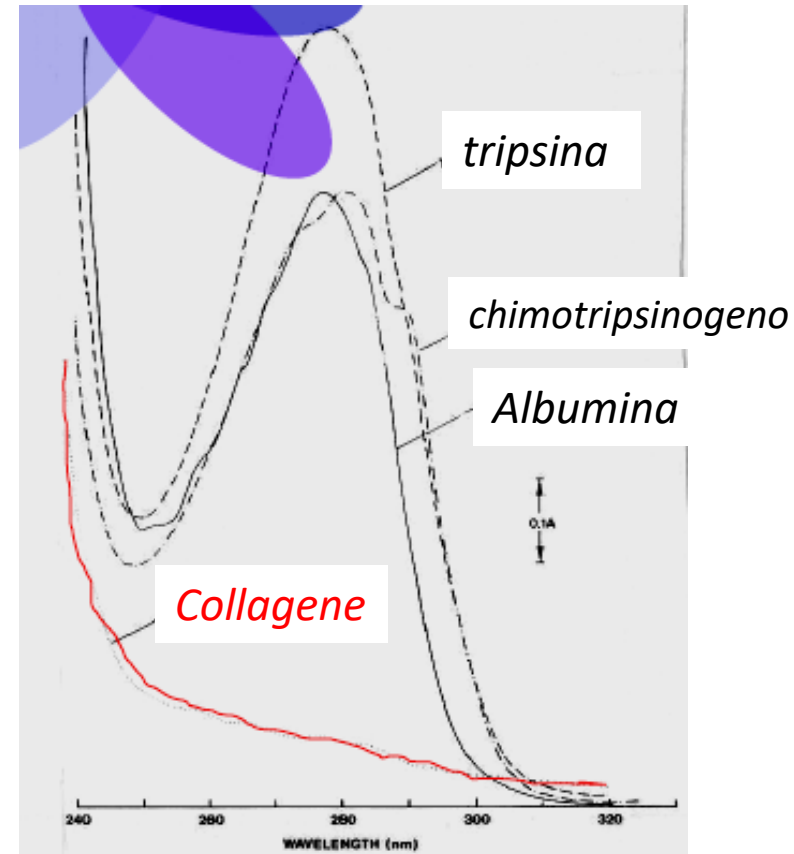
Spettro di assorbimento di quattro proteine diverse:

- **tripsina** (molte tirosine)
- **albumina** (molte fenilalanine)
- **chimotripsinogeno** (contiene triptofano)
- **collagene** (in rosso) ha un basso contenuto di tutti e tre questi aminoacidi.

A parità di concentrazione (1 mg/ml) lo spettro e il valore A_{280} cambiano a seconda della composizione aa

Utilizzando il medesimo valore di ϵ_{280nm} da misure di A_{280} si ottengono i seguenti valori di concentrazione $c = A / \epsilon l$

Albumina	0.7 mg/ml (-30%)
tripsina	1.6 mg/ml (+ 60%)
chimotripsinogeno	1.0 mg/ml
Collagene	0.1 mg/ml (-90%)

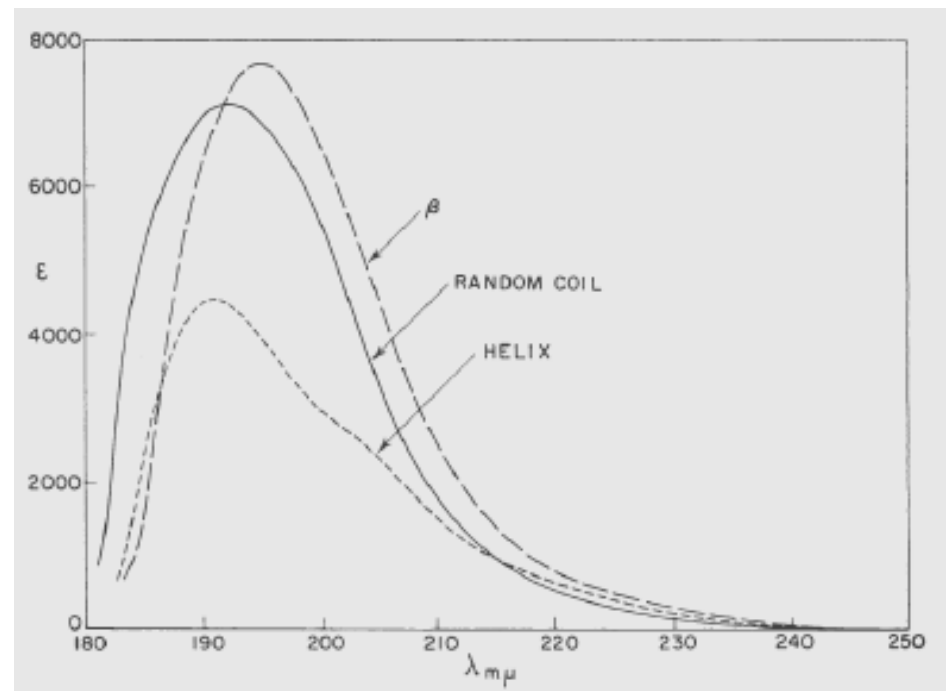


Influenza della struttura sullo spettro ultravioletto delle proteine

L'assorbimento del gruppo peptidico (190-210 nm) è influenzato dalla struttura secondaria delle proteine

Lo spettro della poli-L-lisina può modificarsi per:

- **effetto di un aumento di pH** che induce la formazione dell' α -elica da una struttura disordinata (random coil)
- **effetto di un aumento di temperatura** che converte il polipeptide in β -foglietto.



Metodi indiretti di determinazione della concentrazione

Sfruttano peculiari **cromofori** che si legano in rapporto stechiometrico alle proteine modificando le proprie proprietà spettroscopiche



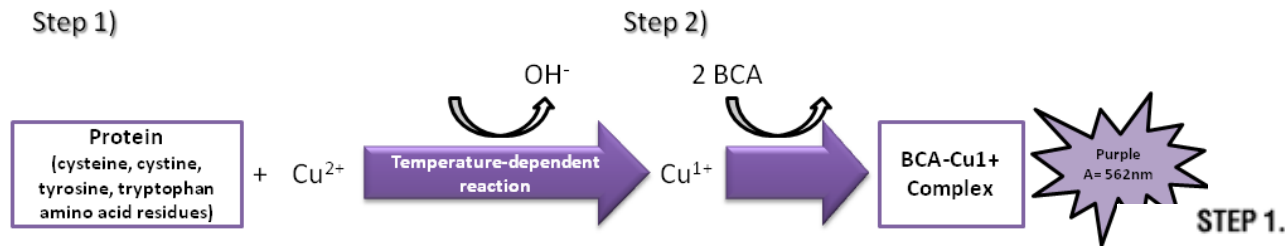
Caratteristiche:

- 1) Hanno proprietà spettroscopiche diverse quando si legano alle proteine (Proteina-**C**)
- 2) **C** deve essere in largo eccesso rispetto alla proteina per poterla complessare completamente.
- 3) Il cromoforo non deve essere selettivo per il tipo di proteina. La conformazione della proteina non dovrebbe influire sul risultato .
- 4) Richiede una **retta di calibrazione** (misura relativa).

Metodo dell'acido bicineoninico (BCA)

Basato sulla reazione conversione di Cu^{2+} in Cu^{1+} in condizioni **alcaline** in proporzione alla Q di proteine (step 1);

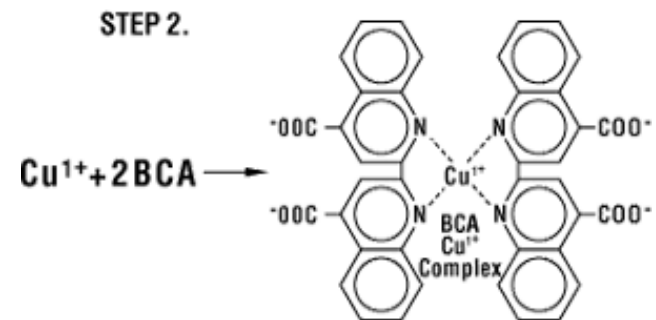
Cu^{1+} prodotto viene rilevato mediante reazione con **acido bicineoninico (BCA)** per ottenere un composto di color porpora (**max 562 nm**) (step 2).



Responsabili della formazione del colore sono i legami peptidici. Cys, Trp, Tyr, His, Asn contribuiscono alla riduzione del Cu^{2+} incrementando la produzione di colore.

Poco influenzato alla presenza di detergenti, tamponi ed altre sostanze.

Ampio range di rilevamento, lineare, relativamente influenzato dalla composizione aa.



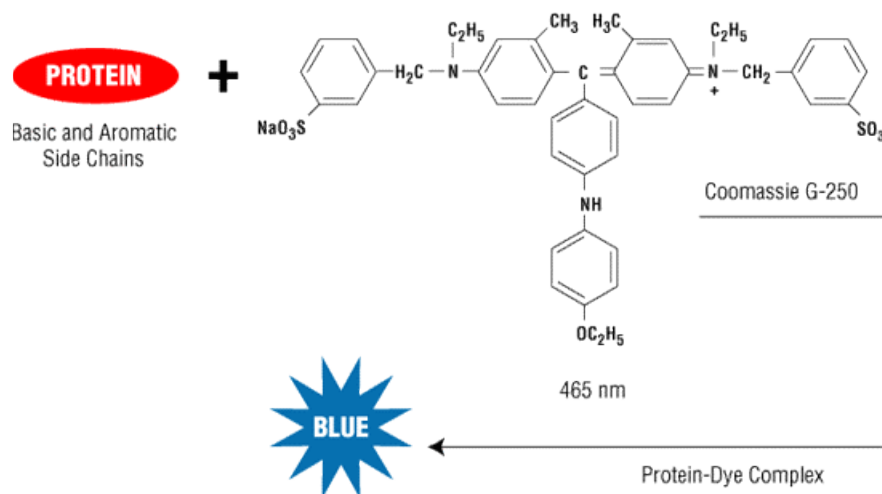
Intervallo di utilizzo: 0,5-2000 $\mu\text{g/ml}$

Metodo di Bradford

Il metodo di Bradford si basa sul legame alle proteine del colorante **Coomassie Brilliant Blue G-250**.

In condizioni acide il BB G-250 è protonato, ha un aspetto rossastro ($A_{\max} = 465 \text{ nm}$) ma quando si lega alle proteine è convertito in una forma deprotonata blu ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$).

Si lega a residui basici (soprattutto Arg) e aromatici.



Protein
(Basic and aromatic side chains) + Coomassie brilliant blue G-250 dye



Protein-dye
Complex



Metodo molto rapido (10 min). Dipendente dalla composizione aa

Intervallo di utilizzo: 1-2000 $\mu\text{g/ml}$

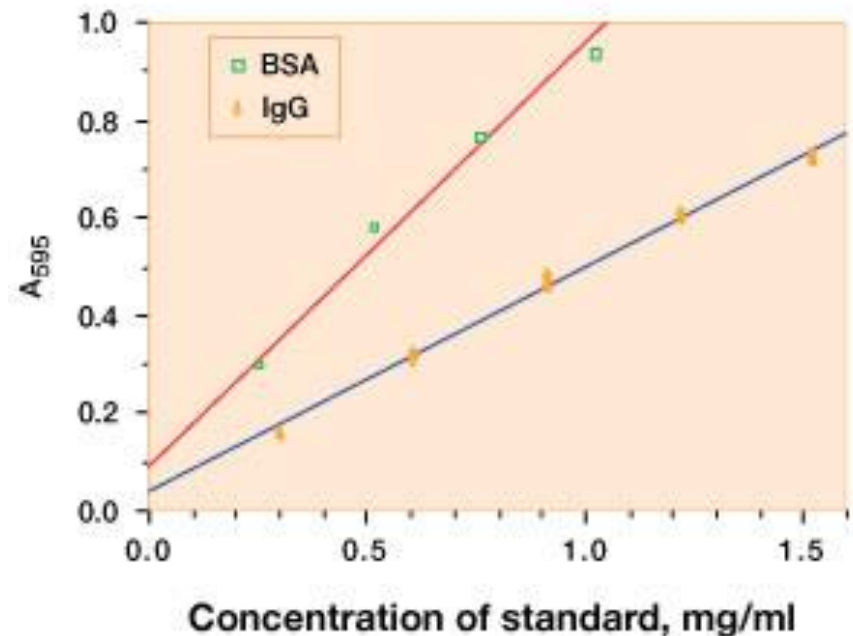
Le proteine di riferimento

I metodi indiretti utilizzano delle **proteine di riferimento** a concentrazione nota per poter convertire una certa A ad una concentrazione proteica.

Questa si ottiene dall'interpolazione della retta di calibrazione.

La proteina ideale da usare come proteina di riferimento è la forma assolutamente pura della proteina da dosare.

Ma comunemente si usano proteine di riferimento standard. Le proteine più usate per questa funzione sono la **BSA (siero albumina bovina)** e le **gamma-globuline (IgG)**. Non danno rette sovrapponibili.



Typical standard curve for the Bio-Rad protein assay standard assay procedure bovine serum albumin and bovine γ -globulin standards

Conclusioni

- ✓ Metodi diretti o indiretti sono tutti basati sulle proprietà spettroscopiche.
- ✓ Strategie diverse a seconda se campioni puri o miscele
- ✓ Nessun metodo soddisfa pienamente la necessità di determinare con precisione la concentrazione proteica
- ✓ Utile utilizzare più metodiche

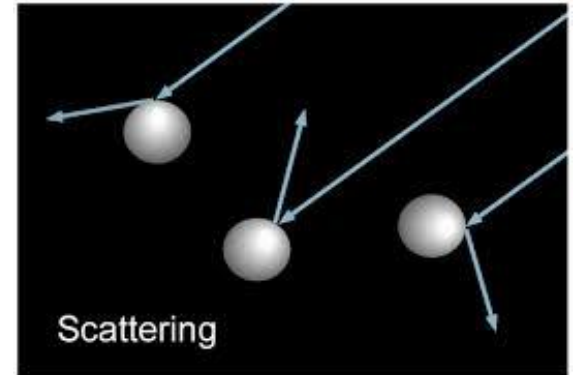


Misura dello scattering

Quando una radiazione elettromagnetica attraversa una particella in sospensione parte della luce non viene assorbita ma viene deflessa, cioè cambia traiettoria, in maniera disorganizzata: fenomeno dello **scattering**.

Dipende da:

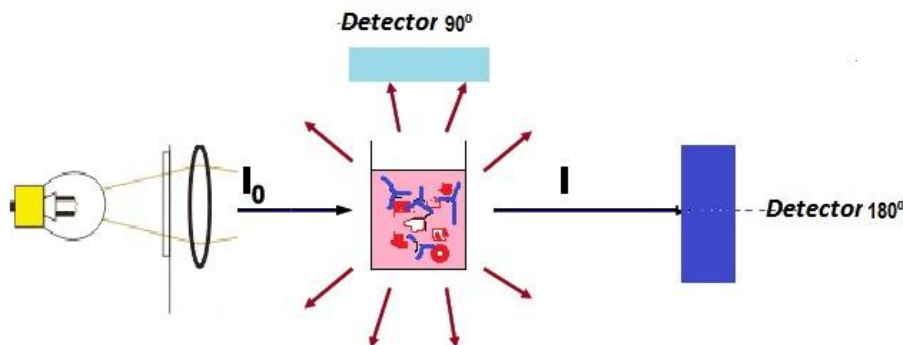
- Dalla concentrazione delle particelle
- La grandezza delle particelle e dalla loro forma
- Dalla lunghezza d'onda utilizzata: la diffusione aumenta al diminuire della λ



Lo scattering contribuisce a ridurre la quantità di luce trasmessa

L'intensità della luce trasmessa è misurata attraverso il mezzo (detector 180°) (Turbidimetria).

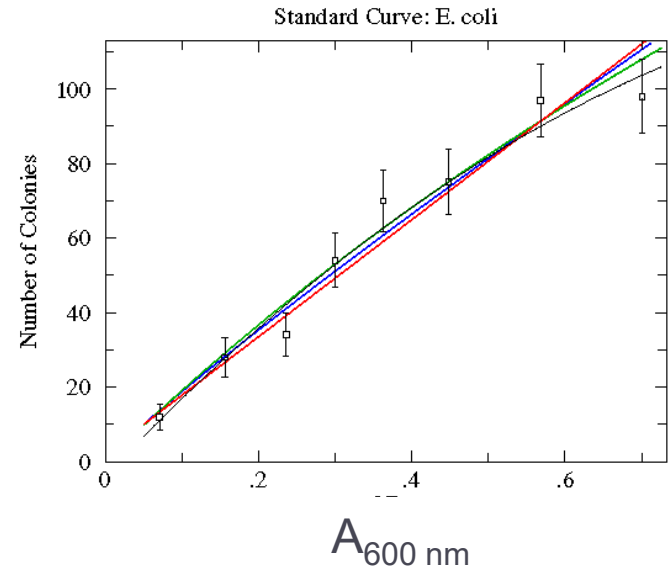
Oppure: l'intensità della luce diffusa è misurata da rilevatori posti ad angoli di 90° rispetto alla direzione della luce incidente



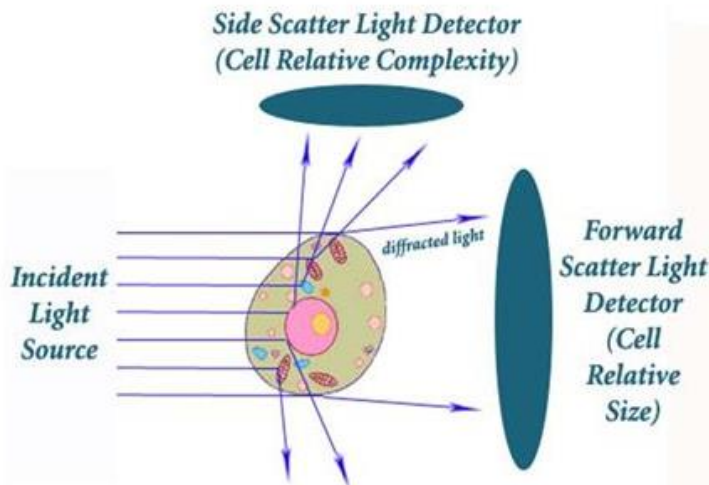
Light scattering: considerazioni pratiche e applicazioni

Applicazioni: 1) misura della concentrazione di particelle, ad esempio conta di microorganismi (numero/ml) o di cellule

Selezione della λ : per misurare solo lo scattering, meglio evitare radiazioni di lunghezza d'onda in cui c'è anche assorbimento



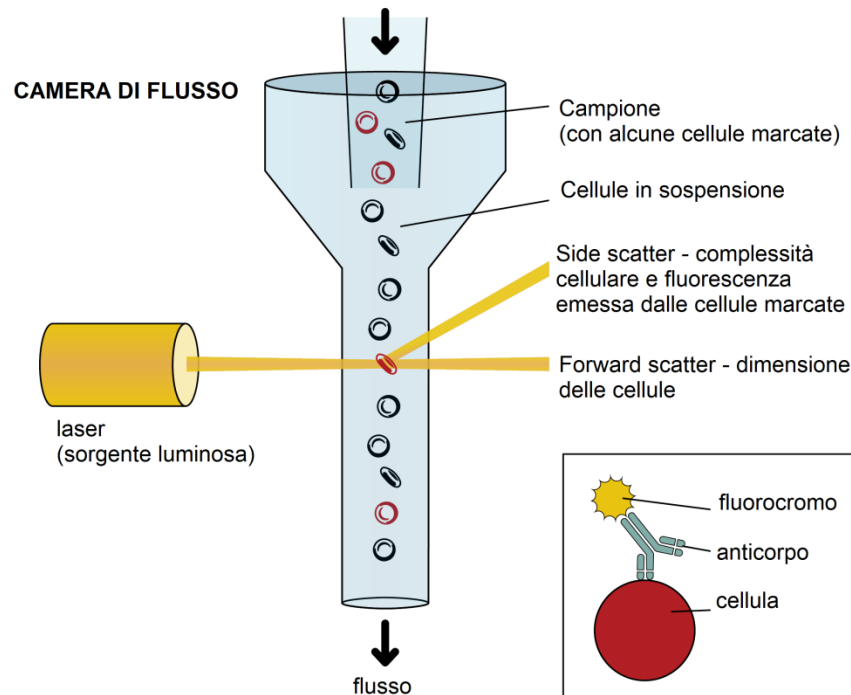
Determinazione della densità batterica



2) Determinazione delle dimensioni e della complessità cellulare (granulosità)

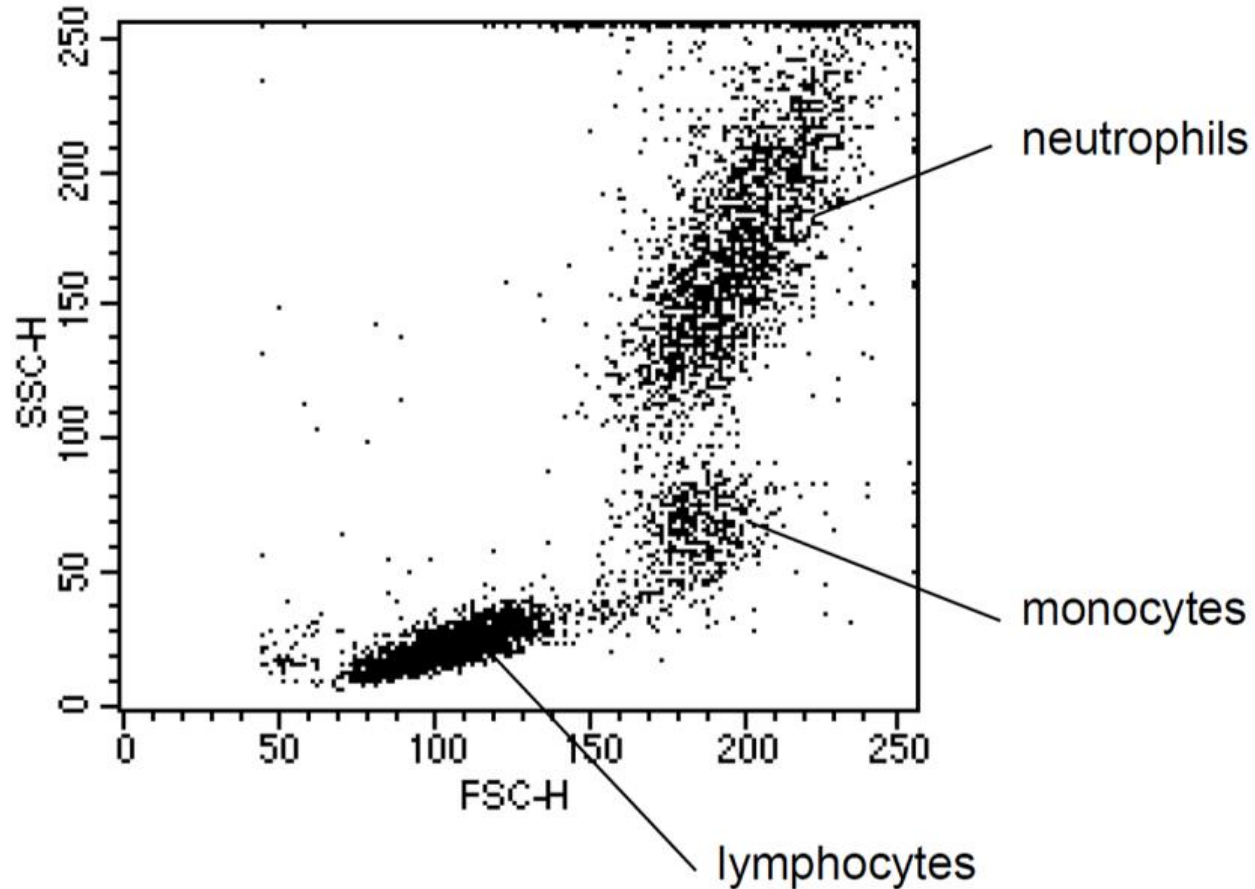
La citometria a flusso

COMPONENTI DI BASE DEL CITOFUORIMETRO



Citofluorimetria: cellule colpite da un raggio laser di luce. Detectors misurano il volume (forward scattering) e la complessità (side scattering) delle cellule.

Riconoscimento di popolazioni cellulari tramite light scattering in citofluorimetria

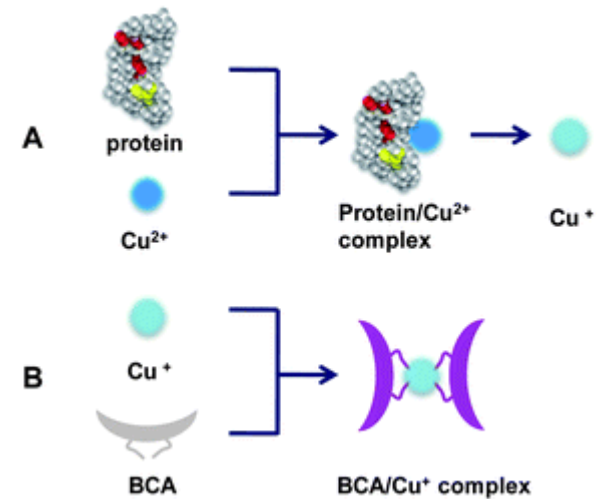


FSC = forward scattering, SSC = side scattering

Cosa faremo in laboratorio:

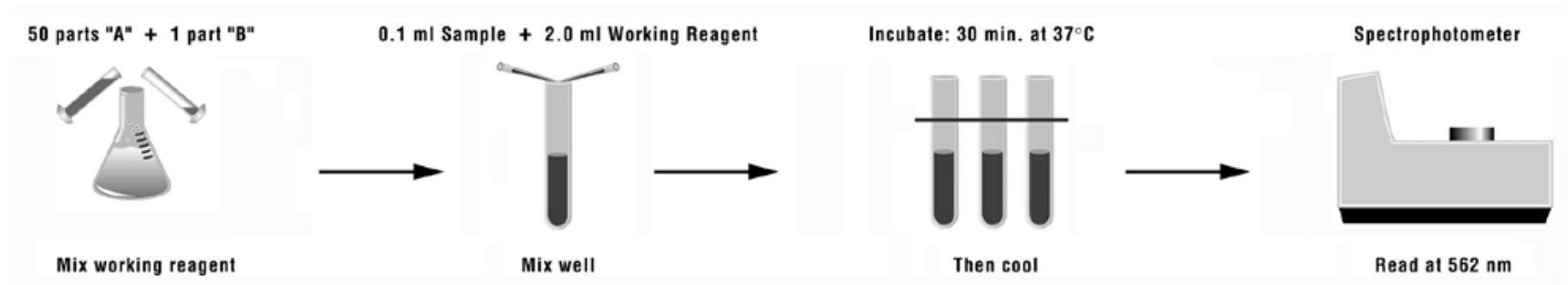
- 1) Quantificazione di una proteina con metodo diretto. Misura A, calcolo di ϵ , calcolo di c.
- 2) Quantificazione di un estratto proteico con metodo indiretto (saggio BCA). Preparazione reagenti, reazione, preparazione retta di taratura, misura di A, calcolo di c.

BCA protein Assay kit



Reagente A = Soluzione BCA

Reagente B = soluzione contenente Cu^{2+}

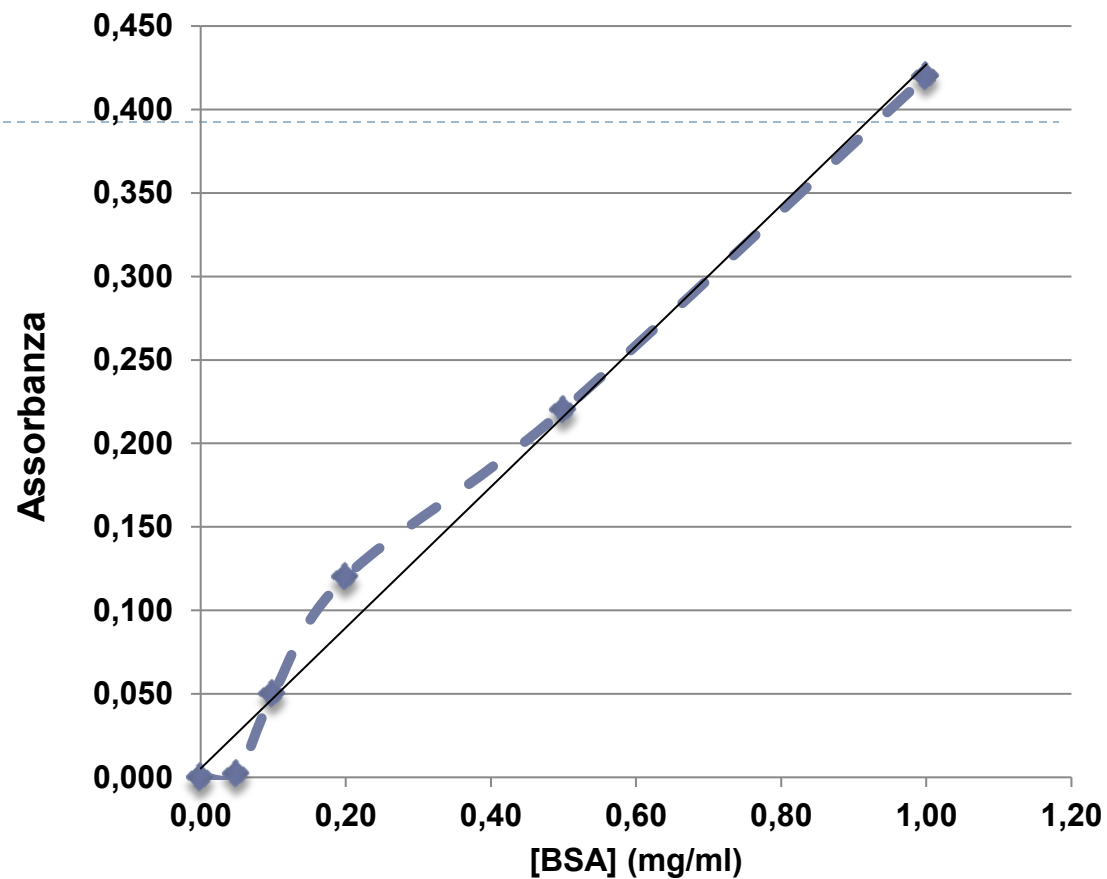


La retta di taratura:



Retta di calibrazione

conc. BSA (mg/ml)	Assorbanza
0,00	0,000
0,05	0,002
0,10	0,050
0,20	0,120
0,50	0,220
1,00	0,420

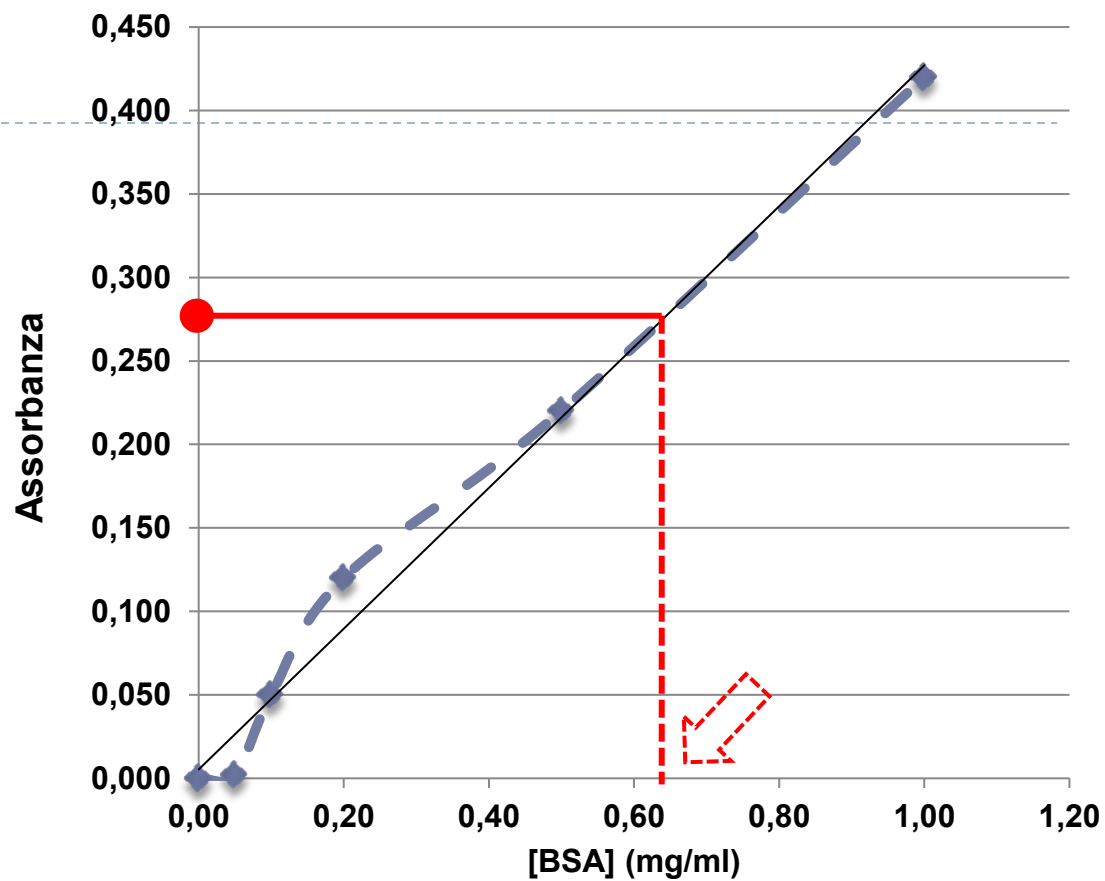


$$y = 0,5351x - 0,0097$$

—> Serie1

Retta di calibrazione

conc. BSA (mg/ml)	Assorbanza
0,00	0,000
0,05	0,002
0,10	0,050
0,20	0,120
0,50	0,220
1,00	0,420



$$y = 0,5351x - 0,0097$$

—◆— Serie1

Relazioni

Contenuti:

- Nome cognome, altri membri del gruppo
- Un paio di frasi ad inquadrare l'argomento dell'esperienza
- Per ogni procedura, spiegare il razionale: es. «diluisco il campione per evitare che la concentrazione troppo alta impedisca la misura».
- Per ogni serie di conti (diluizioni, calcoli di concentrazione), riportare il razionale del calcolo (la formula impiegata ed un esempio applicativo), poi bastano i risultati.
- Se richiesto, grafico, con etichette degli assi ben indicate.
- Breve commento critico del risultato sperimentale finale ottenuto. Es. «la concentrazione misurata del lisato è X, quindi....sembra abbastanza concentrato, molto meno concentrato di tutti i colleghi, etc.».
- Max 2 facciate grafici inclusi. Possibile sforare con penalità.

A dopo, ore 17:00

