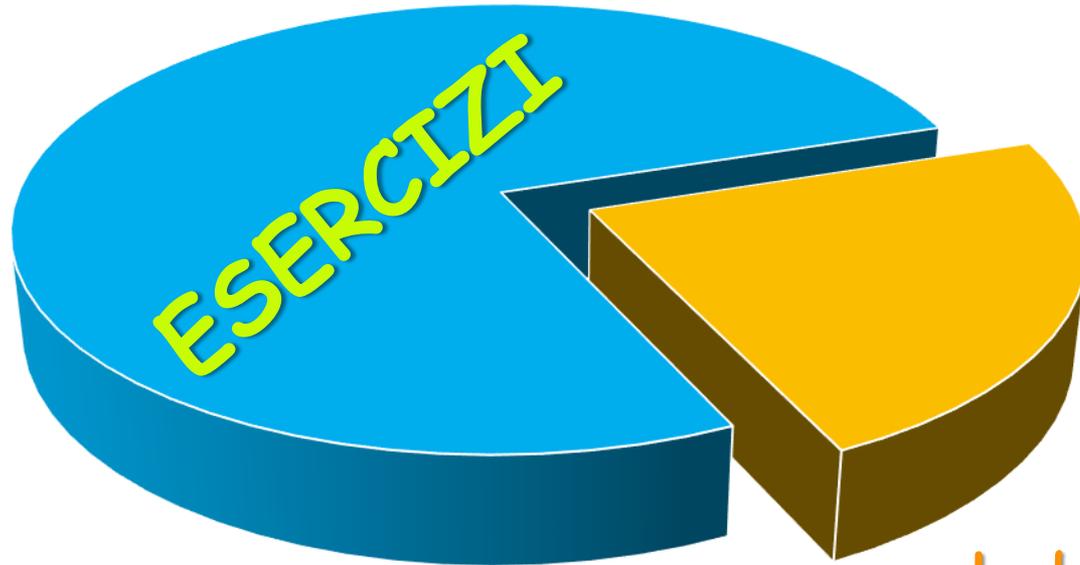


# Testi consigliati

- **Biochimica Applicata - Monica Stoppini e Vittorio Bellotti - Edises. 19 €.**
- Metodologie Biochimiche - M.C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M.G. Di Salvo - Ambrosiana. 39 €.
- Principi di metodologia Biochimica - Carlo De Marco e Chiara Cini - Piccin.
- Biochimica e Biologia Molecolare. Principi e tecniche - Wilson K, Walker J - Zanichelli.
- The Protein protocols Handbook - Walker, John M.
- Biochimica - J. M. Berg, J. L. Tymoczko e **L. Stryer.** - Zanichelli.
- Membrane Protein Protocols - Selinsky BS.
- Metodologie di base per le scienze biomolecolari - Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. - Zanichelli.

# Struttura del corso

Teoria



**OBBLIGATORIO...**

Laboratorio



...ma non la frequenza

# DISPENSE di BIOCHIMICA APPLICATA

L'**ordine** delle dispense **può variare**,  
perciò è meglio

**tenerle separate per argomento.**

# BIOCHIMICA APPLICATA



# UNITA' DI MISURA

## Prefissi del Sistema Internazionale

$10^n$	Prefisso	Simbolo	Nome	Equivalente <u>decimale</u>
$10^{24}$	<u>yotta</u>	Y	<u>Quadrilione</u>	1 000 000 000 000 000 000 000 000
$10^{21}$	<u>zetta</u>	Z	<u>Triliardo</u>	1 000 000 000 000 000 000 000
$10^{18}$	<u>exa</u>	E	<u>Trilione</u>	1 000 000 000 000 000 000
$10^{15}$	<u>petta</u>	P	<u>Biliardo</u>	1 000 000 000 000 000
$10^{12}$	<u>tera</u>	T	<u>Bilione</u>	1 000 000 000 000
$10^9$	<u>giga</u>	G	<u>Miliardo</u>	1 000 000 000
$10^6$	<u>mega</u>	M	<u>Milione</u>	1 000 000
$10^3$	<u>kilo</u> o <u>chilo</u>	k	<u>Mille</u>	1 000
$10^2$	<u>etto</u>	h	<u>Cento</u>	100
$10^1$	<u>deca</u>	da	<u>Dieci</u>	10
$10^{-1}$	<u>deci</u>	d	Decimo	0,1
$10^{-2}$	<u>centi</u>	c	Centesimo	0,01
$10^{-3}$	<u>milli</u>	m	Millesimo	0,001
$10^{-6}$	<u>micro</u>	$\mu$	Milionesimo	0,000 001
$10^{-9}$	<u>nano</u>	n	Miliardesimo	0,000 000 001
$10^{-12}$	<u>pico</u>	p	Bilionesimo	0,000 000 000 001
$10^{-15}$	<u>femto</u>	f	Biliardesimo	0,000 000 000 000 001
$10^{-18}$	<u>atto</u>	a	Trilionesimo	0,000 000 000 000 000 001
$10^{-21}$	<u>zepto</u>	z	Triliardesimo	0,000 000 000 000 000 000 001
$10^{-24}$	<u>yocto</u>	y	Quadrilionesimo	0,000 000 000 000 000 000 000 001

# INDAGINE BIOCHIMICA MODERNA

Esperimenti

Kit  
commerciali



Automatizzazione



# PRINCIPALI METODOLOGIE BIOCHIMICHE

1. TECNICHE CENTRIFUGATIVE
2. TECNICHE ENZIMATICHE
3. TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
4. TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE
5. TECNICHE CROMATOGRAFICHE
6. TECNICHE ELETTROFORETICHE
7. TECNICHE SPETTROSCOPICHE
8. TECNICHE RADIOISOTOPICHE
9. TECNICHE DI SPETTROSCOPIA DI MASSA
10. TECNICHE ELETTROCHIMICHE

# MICROPIPETETTE



# LE PIPETTE

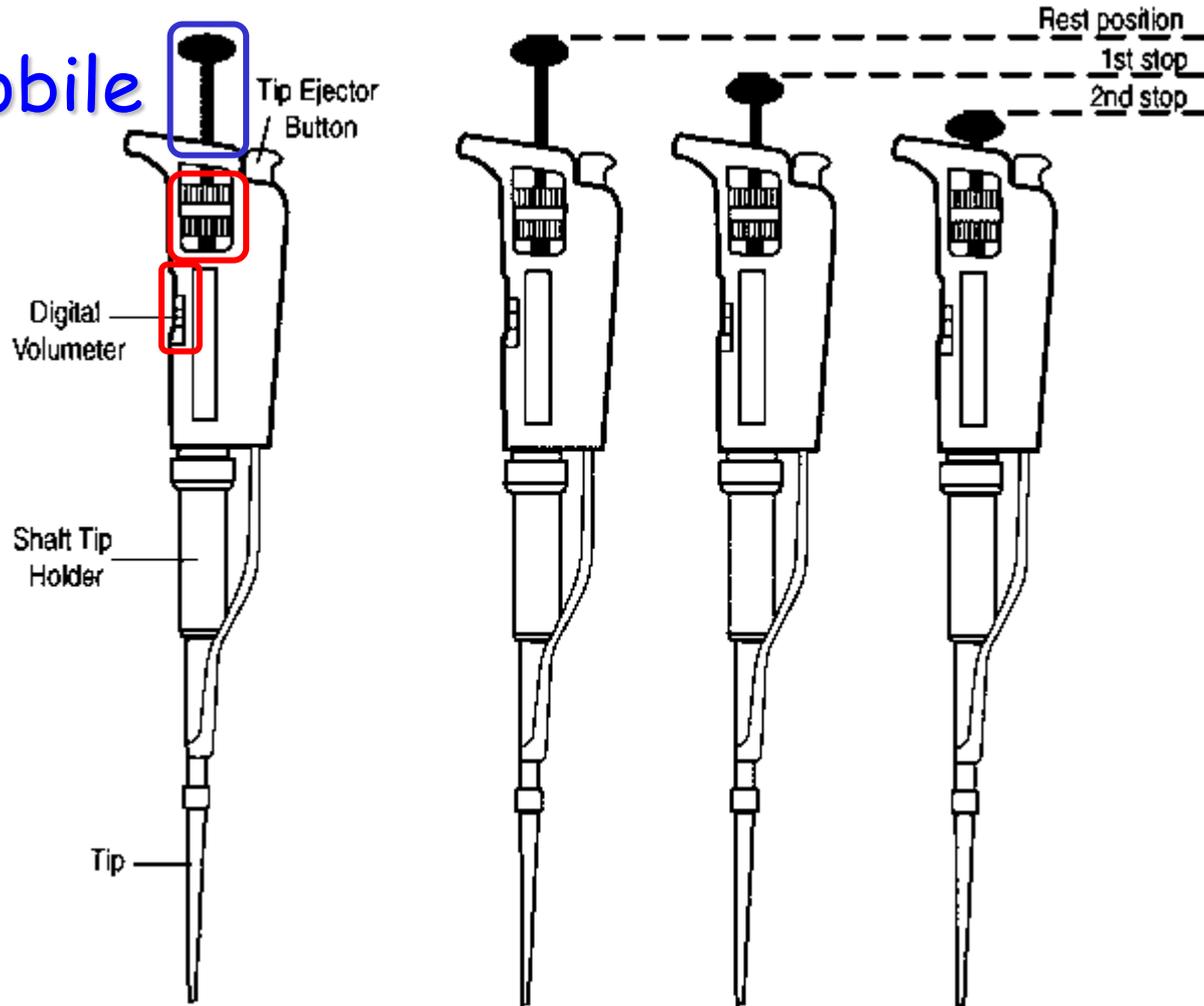
Strumento per dispensare volumi di soluzioni in assenza di una connessione diretta fra i recipienti in uso.



# « PIPETTARE »

Metodo accurato e preciso per trasferire volumi, decisi dall'operatore, di liquidi.

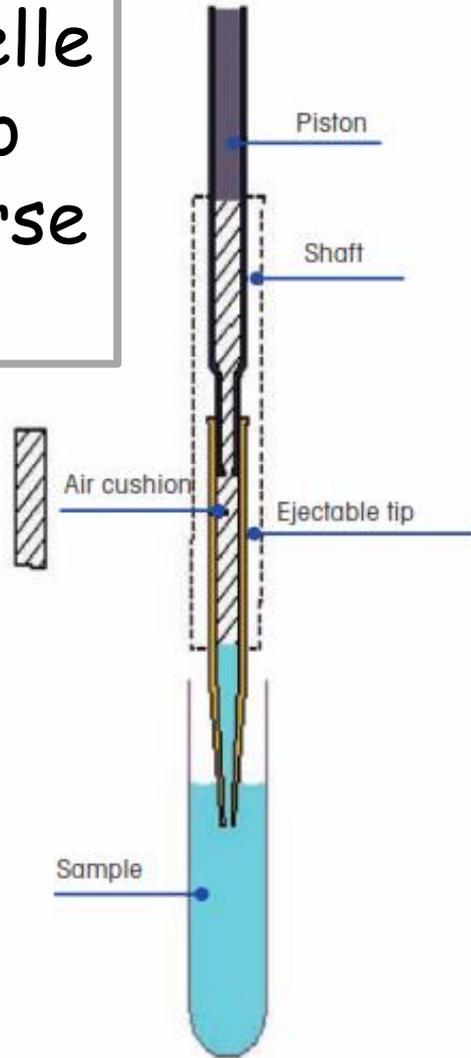
Pistone mobile



# PRINCIPIO

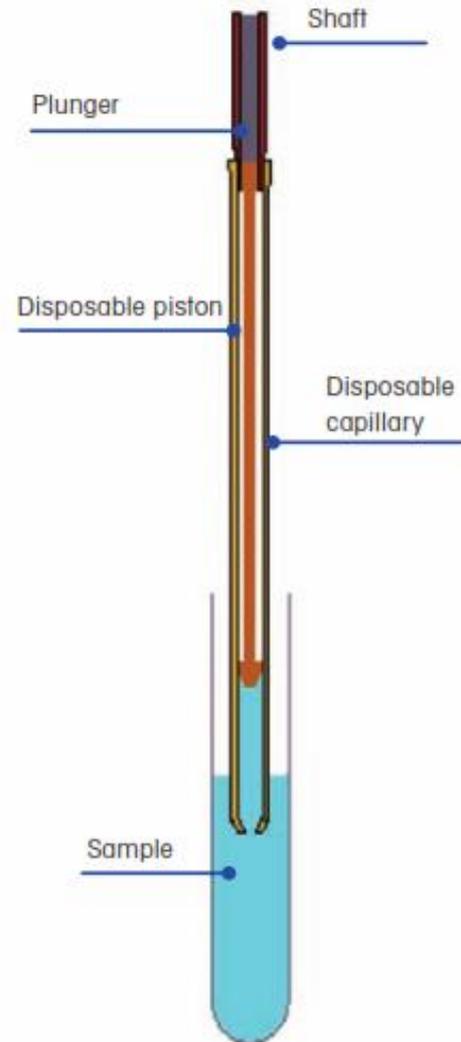
**AEROSOL:** particelle di liquido o solido (1-1000 nm) disperse in un gas.

Sistema ad aria ideale per soluzioni acquose o poco viscosi.



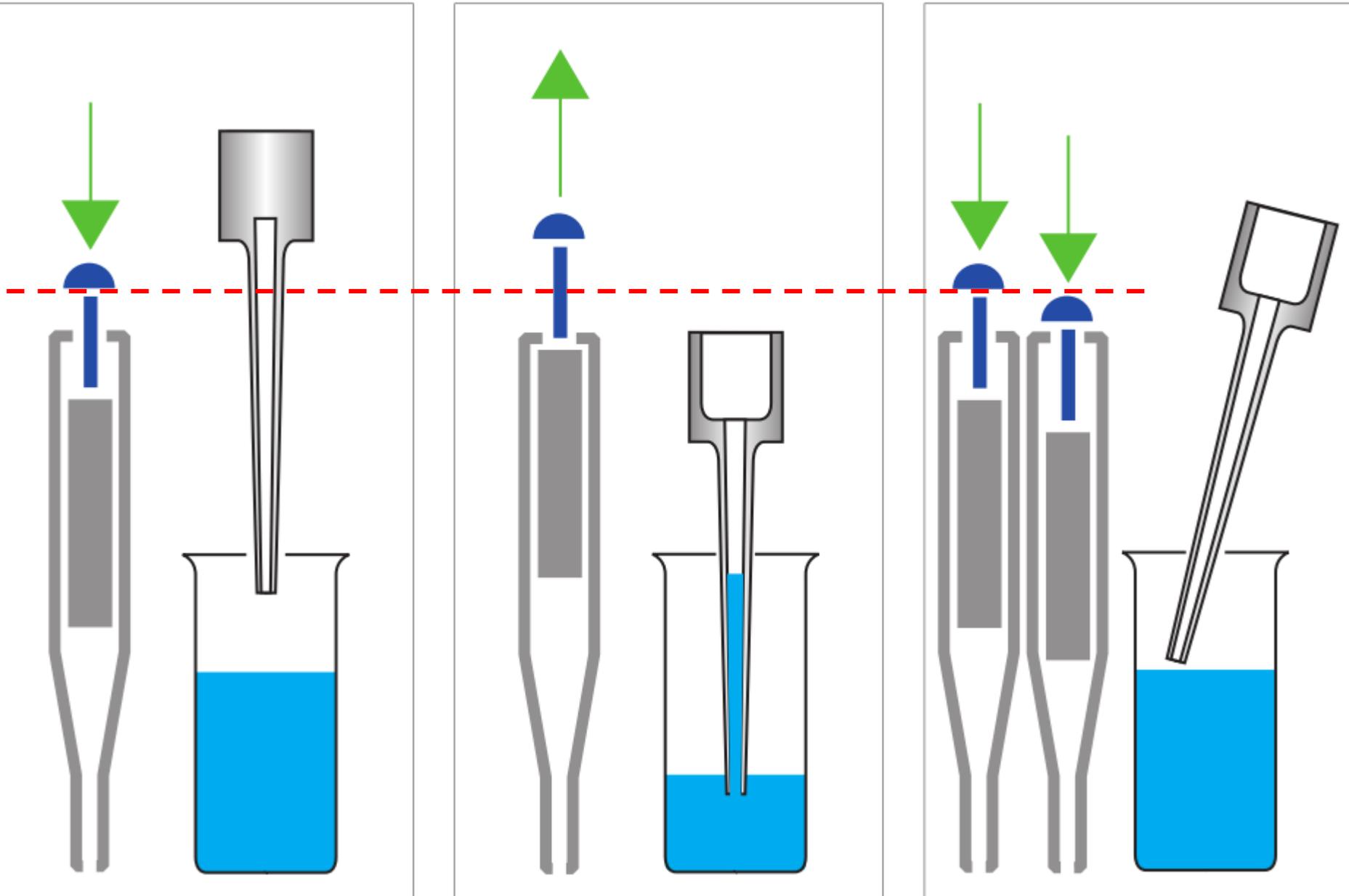
Air-cushion system

## Contatto diretto



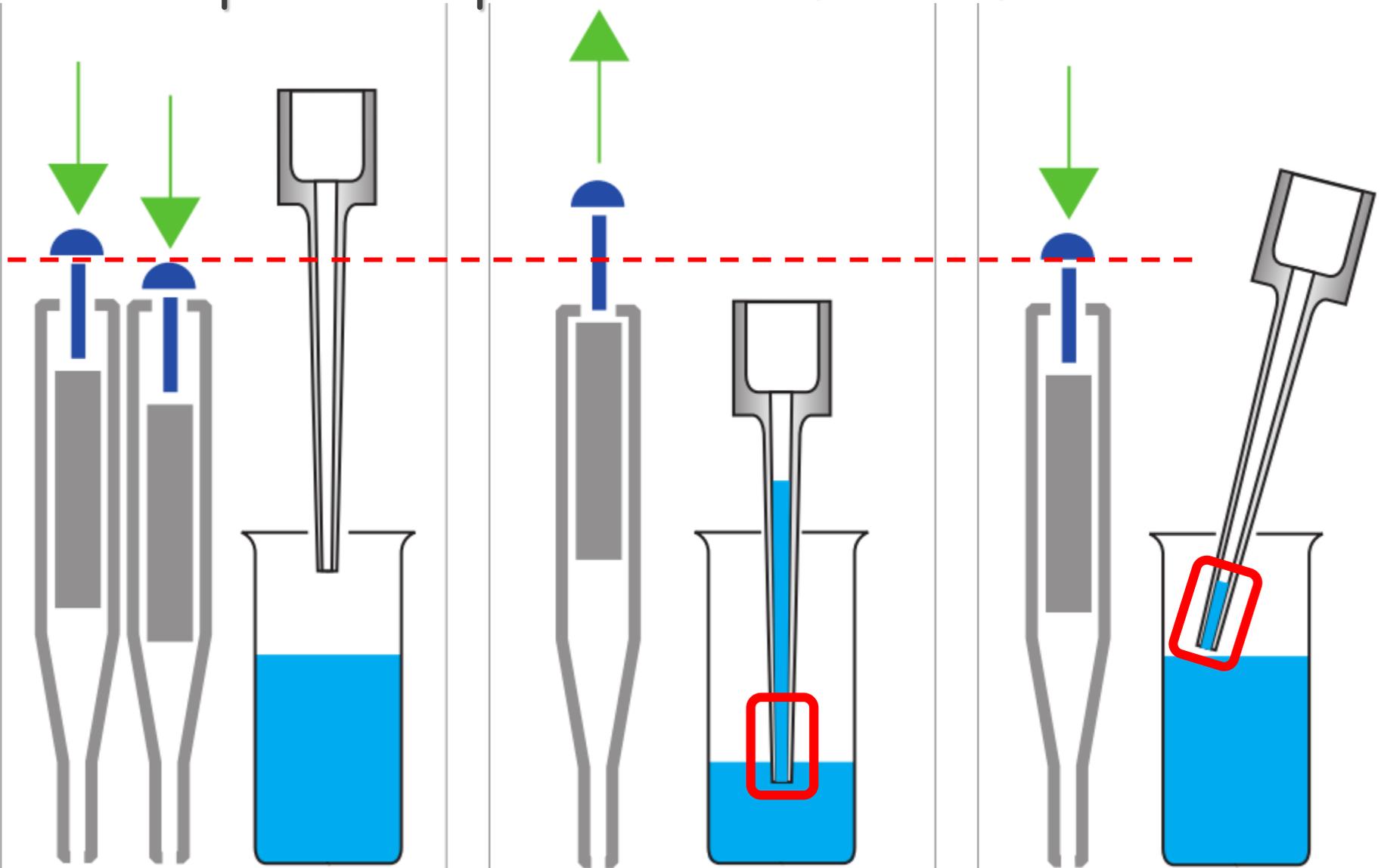
Direct displacement system

# PIPETTATA SEMPLICE



# PIPETTATA A ROVESCIO

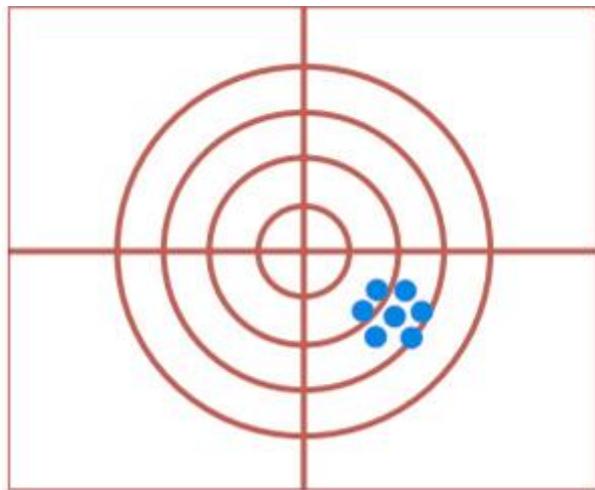
Per prelievi ripetuti della medesima sostanza.



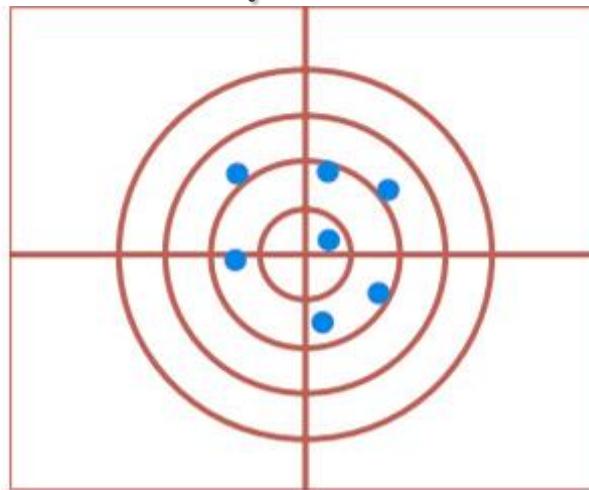
# COMPORTAMENTO DI UNO STRUMENTO



Preciso, ma  
non accurato



Accurato, ma  
non preciso



Accurato e preciso



# PROFONDITA' DI IMMERSIONE

Due problemi opposti:

- volume maggiore
- aria



Taglia della pipetta	Immersione
2 and 10 $\mu$ l	1 mm
20 and 100 $\mu$ l	2-3 mm
200 and 1000 $\mu$ l	3-6 mm
5,000 $\mu$ l and 10 ml	6-10 mm

Con la giusta profondità l'accuratezza incrementa dall'1 al 5% !

# ANGOLO DI PIPETTATA



L'accuratezza  
incrementa dall'**1 al 5%** !

# TOLLERANZE

Pipette di ditte diverse, hanno caratteristiche differenti.

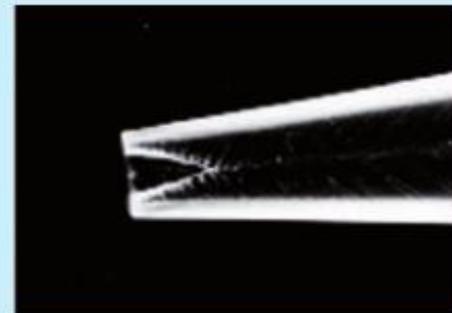
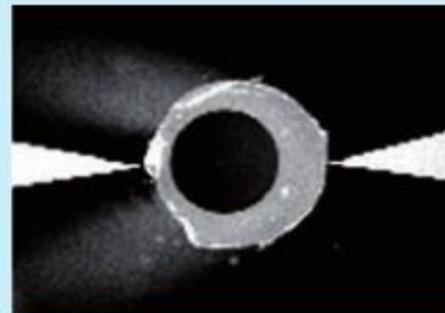
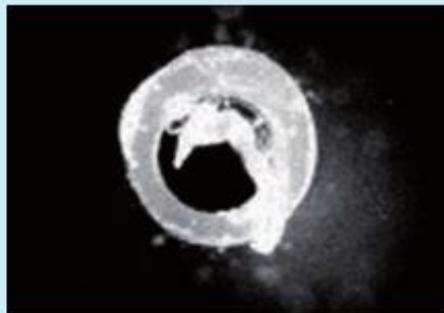
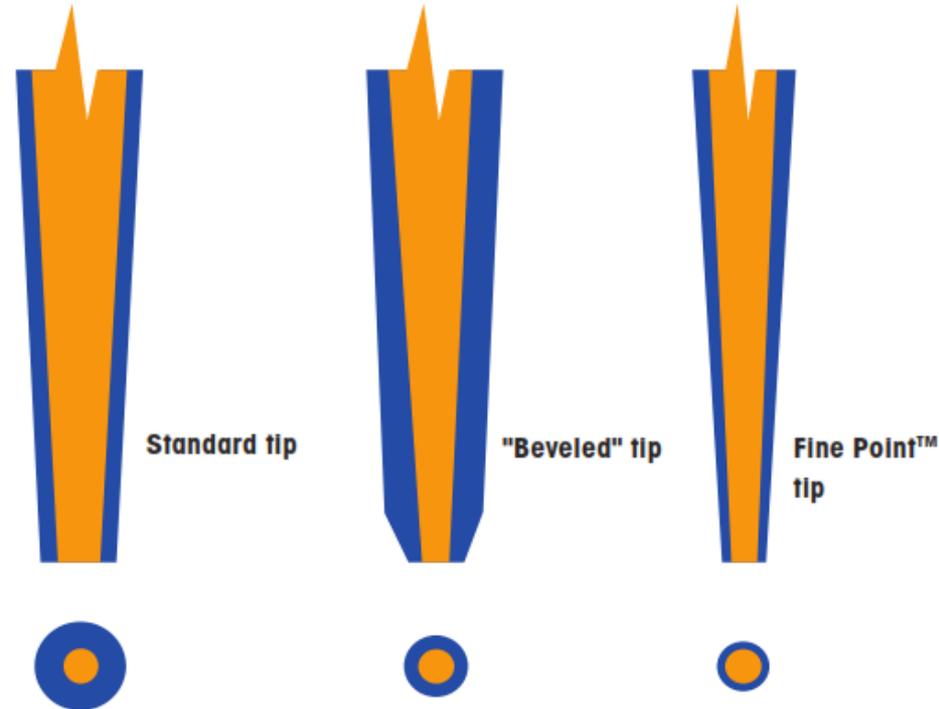
Taglie della pipetta	Errore massimo		Errore casuale	
	%	$\mu\text{l}$	%	$\mu\text{l}$
2	4.0	0.08	2.0	0.04
10	1.2	0.12	0.8	0.008
200	0.8	1.6	0.3	0.6
1,000	0.8	8.0	0.3	3.0

L'**errore** diventa **minimo** quando si preleva il **volume massimo** possibile di una pipetta.

# PUNTALI

Generalmente di plastica, economici, intercambiabili.  
Due parametri: **materiale e forma.**

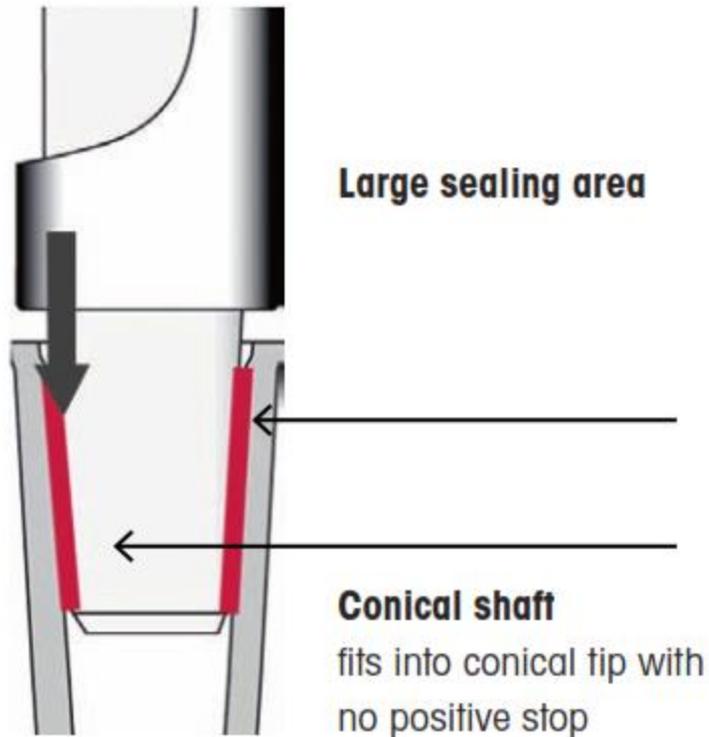
- Non-sterile
- Sterile (irradiation)
- Filter tip
- DNase/RNase-free (protection for DNA and RNA)
- DNA/RNA-free (important for PCR)
- Pyrogen-free (highly inflammable)
- ATP-free (important for pyrogen tests)



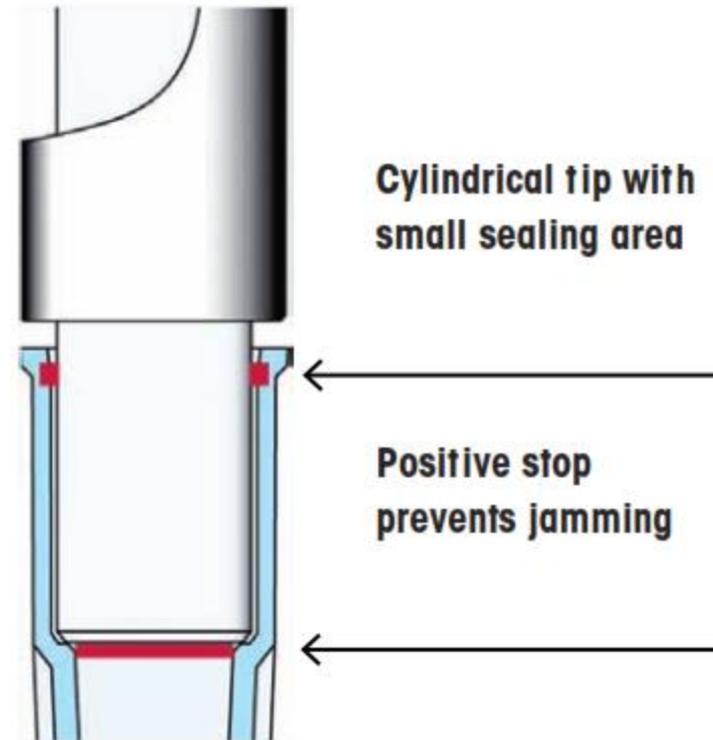
# EIEZIONE DEI PUNTALI

## Traditional shaft

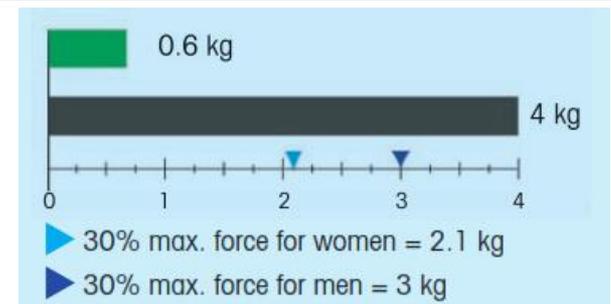
Typical conventional ejection forces



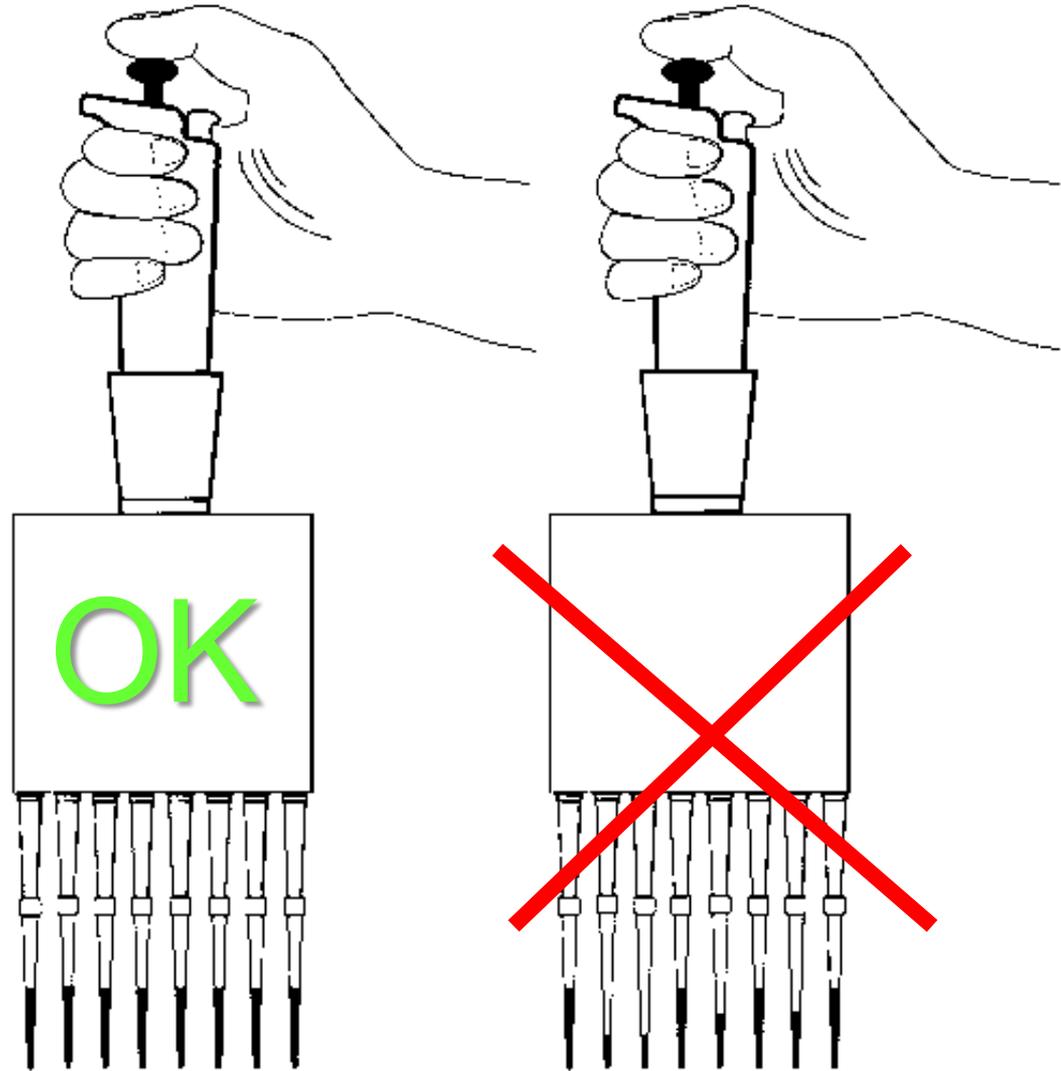
## Cylindrical LTS shaft/tip system



Dipende dalla pipetta.



# PIPETTE MULTICANALE



**I have a dream...**

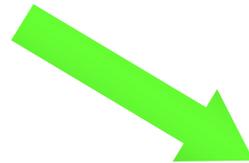
**16-48-64-Channel  
Multichannel  
Pipettes**



# TAMPONI

Organismi complessi e singole cellule resistono generalmente a grandi variazioni di pH dell'**ambiente esterno**.

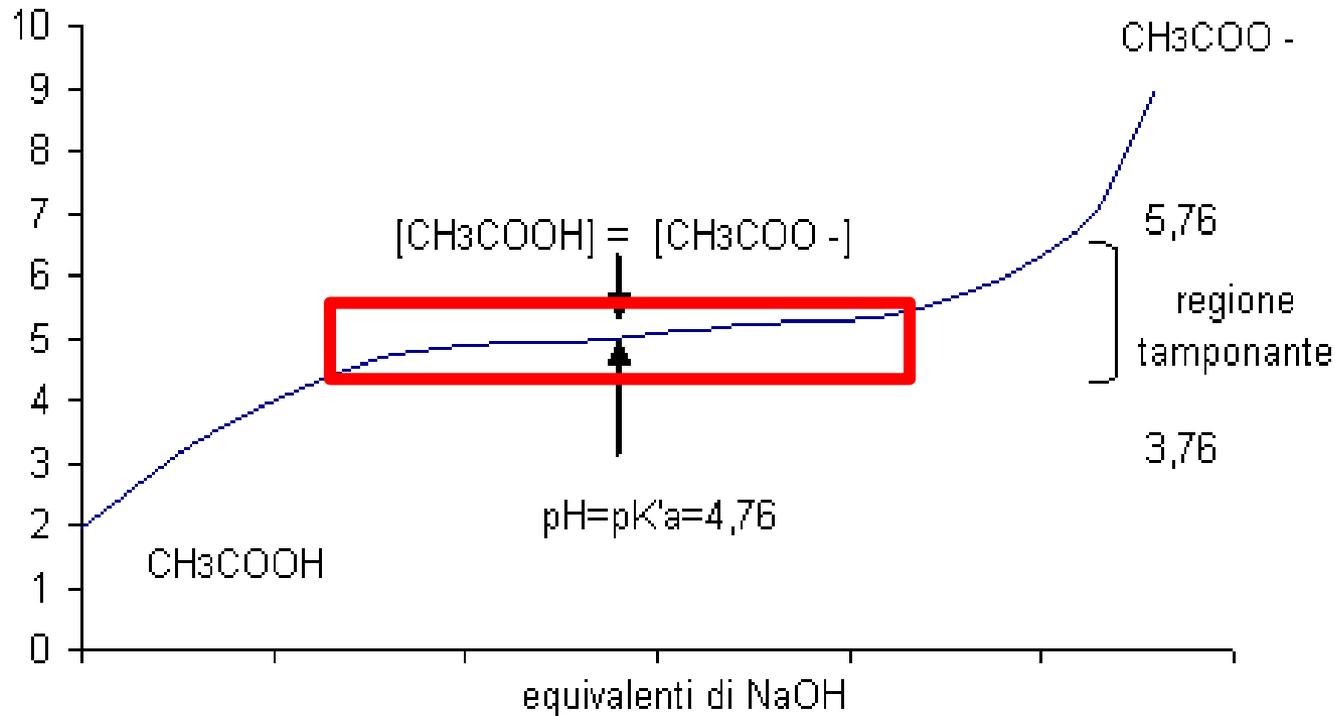
Al contrario, vi è una forte sensibilità al pH dei **processi endocellulari**



Proprietà finemente regolata  
(generalmente mantenuto vicino alla neutralità)  
mediante **sistemi tampone**.

# SELEZIONE DEI TAMPONI

Utilizzare un tampone con  $pK_a$  vicina al pH richiesto.



Oltre l'intervallo di  $pH = pK_a \pm 1$  la capacità tamponante è scarsa.

# SELEZIONE DEL TAMPONE SULLA BASE DELLA pKa

	pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20)	pKa (at 25)	pKa (at 37)
MES		5.5-6.7						5.5-6.7	6.16	6.10	5.97
BIS-TRIS		5.8-7.2						5.8-7.2	-	6.50	6.36
ADA		6.0-7.2						6.0-7.2	6.65	6.59	6.46
ACES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.88	6.78	6.54
PIPES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.80	6.76	6.66
MOPSO		6.2-7.6						6.2-7.6	-	6.90	6.75
BIS-TRIS PROPANE		6.3-9.5						6.3-9.5	-	6.8,9.0	-
BES		6.4-7.8						6.4-7.8	7.17	7.09	6.90
MOPS		6.5-7.9						6.5-7.9	7.28	7.20	7.02
TES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.50	7.40	7.16
HEPES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.55	7.48	7.31
DIPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.35
MOBS		6.9-8.3						6.9-8.3	-	7.60	-
TAPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA		7.0-9.0						7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO		7.1-8.5						7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO		7.2-8.5						7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA		7.3-8.3						7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS		7.3-8.7						7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE		7.4-8.8						7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE		7.5-8.9						7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE		7.6-9.0						7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS		7.6-9.0						7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS		7.7-9.1						7.7-9.1	8.49	8.40	8.18
AMPD		7.8-9.7						7.8-9.7	-	8.80	-
TABS		8.2-9.6						8.2-9.6	-	8.90	-
AMPSO		8.3-9.7						8.3-9.7	-	9.00	9.10
CHES		8.6-10.0						8.6-10.0	9.55	9.49	9.36
CAPSO		8.9-10.3						8.9-10.3	-	9.60	9.43
AMP		9.0-10.5						9.0-10.5	-	9.70	-
CAPS		9.7-11.1						9.7-11.1	10.56	10.40	10.02
CABS		10.0-11.4						10.0-11.4	-	10.70	-

# SELEZIONE DEI TAMPONI

Assicurarsi che il tampone non causi **precipitazioni** indesiderate (citrati e fosfati).

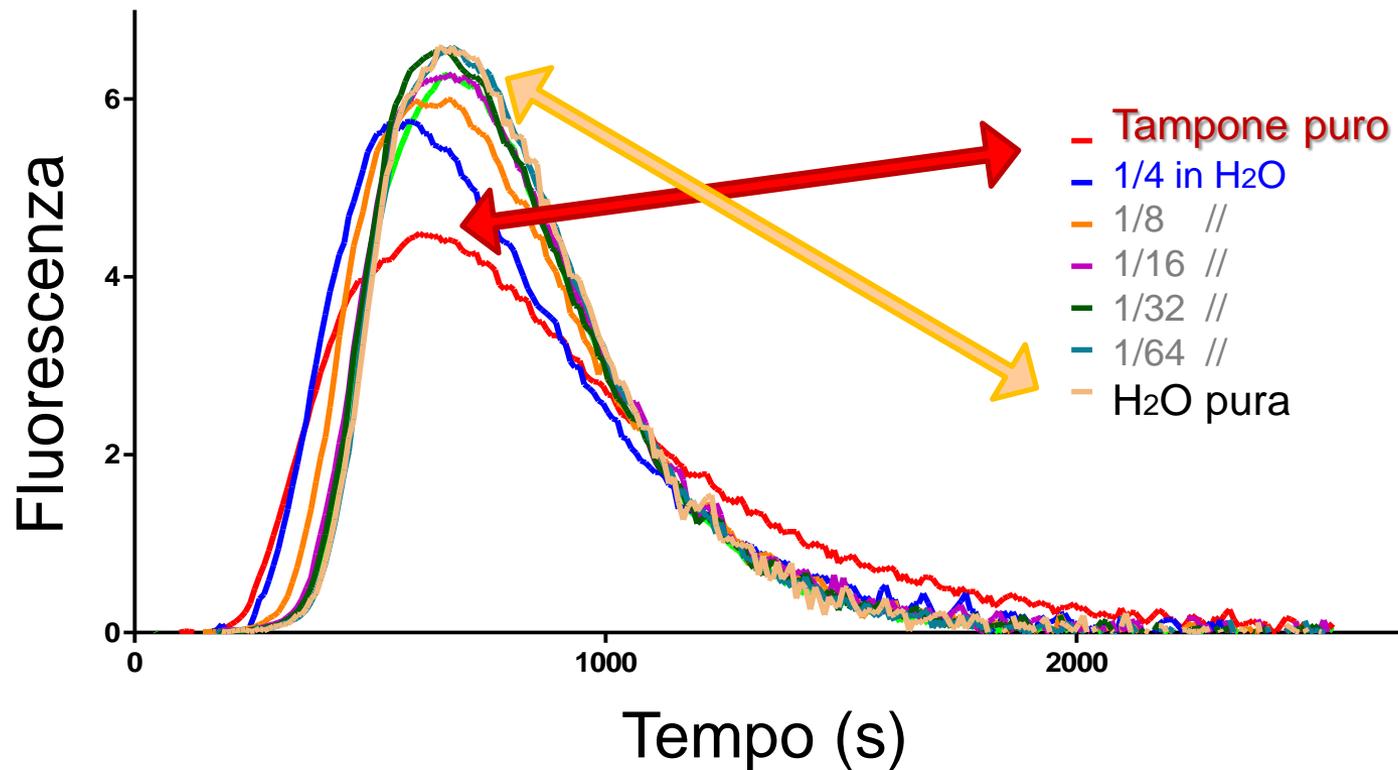


Per certi enzimi il fosfato di alcuni tamponi è substrato, attivatore o inibitore.

Il tris 2-idrossimetil-amminometano cloridrato o **TRIS** (pKa = 8.06 a 20 °C, range pH: 7.0-9.2 ) è spesso **tossico** in sistemi biologici, per la sua solubilità in lipidi.

# ESEMPIO DI TAMPONE DANNOSO

Più è alta la campana più è efficiente il sistema.



# RIASSUMENDO

Il tampone adatto:

1. **pKa** opportuna.
2. **Range di pH** sufficiente.
3. **Solubilizza** le molecole in studio.
4. **Non interferisce** con la reazione.

# GOOD'S BUFFERS

Sono 12 tamponi descritti da Norman Good (1966), basati su **molecole zwitterioniche**, portate al pH di “lavoro” con un acido forte o una base forte.

- Scelti per aver  $PK_a$  fra 6 e 8.
- Bassa solubilità in solventi non polari.
- Chimicamente **stabili**.
- **Non attraversano** le membrane cellulari.
- **Non assorbono** nell'UV-visibile.

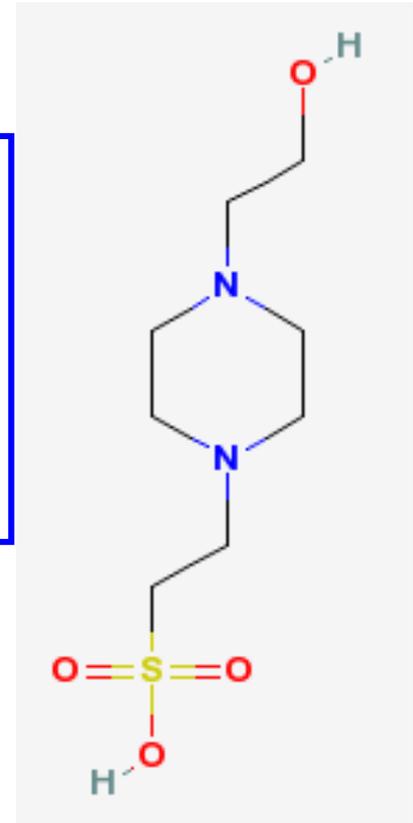
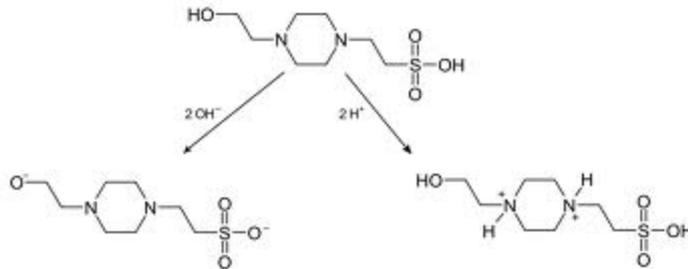
Buffer	<u>pK<sub>a</sub></u> at 20°C	$\Delta pK_a / ^\circ C$
<u>MES</u>	6.15	-0.011
ADA	6.6	-0.011
<u>PIPES</u>	6.8	-0.0085
<u>ACES</u>	6.9	-0.020
Choline chloride	7.1	-0.027
BES	7.15	-0.016
TES	7.5	-0.020
<u>HEPES</u>	7.55	-0.014
Acetamidoglycine	7.7	-
<u>Tricine</u>	8.15	-0.021
Glycinamide	8.2	-0.029
Bicine	8.35	-0.018

# HEPES

N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

Normalmente neutralizzato con NaOH

- $pK_a$  at 25°C of 7.55 (**7.31 at 37°C**)
- a second  $pK_a$  at pH 3 is not of interest
- usable buffering **range of 6.8 to 8.2**
- molecular weight 238.3
- HEPES contains tertiary amines, which are reactive under certain conditions. Chemical formula:  $C_8H_{18}N_2O_4S$



**Fototossico:** produzione di perossido di idrogeno se esposto a luce solare (**riproducibilità a rischio!**).

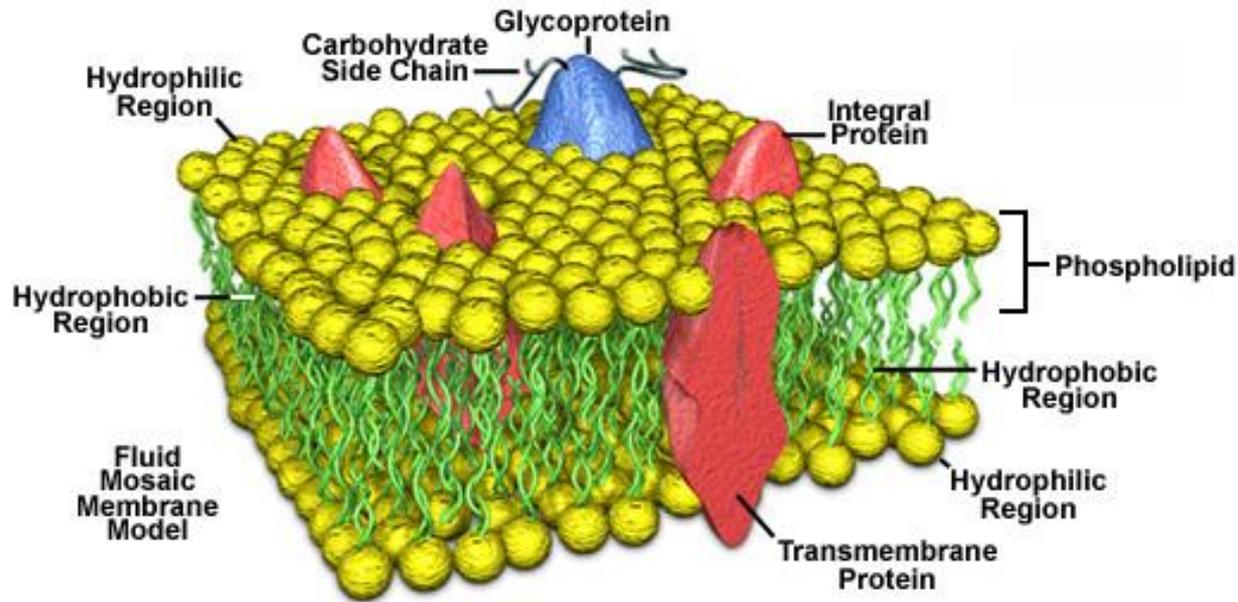
# DETERGENTI

I **detergenti** sono molecole **ANFIPATICHE**, ovvero contengono sia gruppi **polari** (idrofili), sia **apolari** (idrofobici, lipofili).

Alcuni sono naturali, la > parte di sintesi (dal 1836).

**Proteine transmembrana**, se isolate dalle membrane, espongono regioni idrofobiche, causando **aggregazione**.

# DETERGENTI



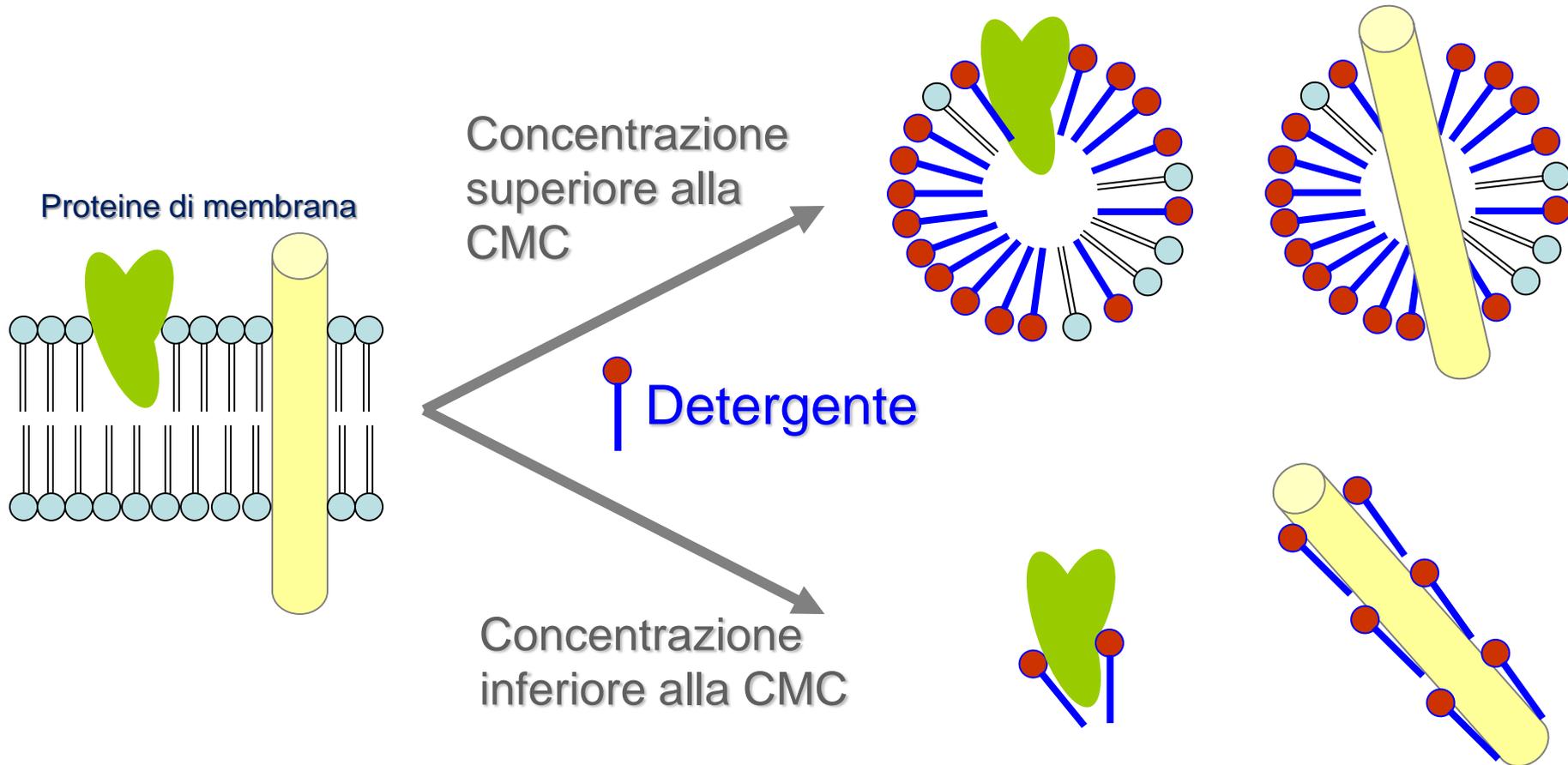
**Proteine transmembrana**, se isolate dalle membrane, espongono regioni idrofobiche, causando **aggregazione**.

I **detergenti** possono **solubilizzare** tali proteine avendo affinità per i gruppi idrofobici/idrofilici presenti in esse.

# CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA (CMC)

**Basse** [Detergente] = in H<sub>2</sub>O come molecola isolata.

**Alte** [Detergente] = forma micelle.



La **CMC** è caratteristica di ogni detergente e dipende dalla sua struttura chimica.

# TIPI DI DETERGENTI

**NON IONICI:** gruppo idrofilo **non carico** (alchiloamidi, esteri del glucosio e del saccarosio, alchilaminossidi, derivati etossilati).

**ANIONICI:** gruppo idrofilo **carico -** (alchilsolfati, alcoilсарcoinati, alchilsemisolfuccinati, condensati tra acidi grassi ed aminoacidi).

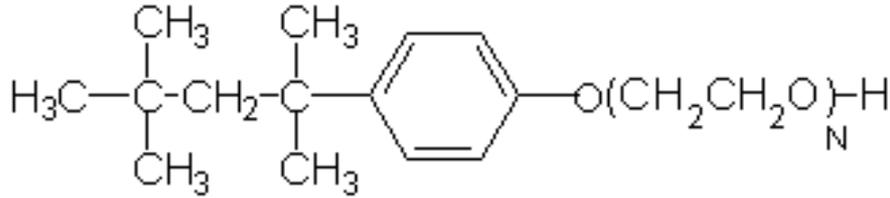
**CATIONICI:** gruppo idrofilo **carico +** (sali quaternari di ammonio, sali di piridinio quaternario, sali di isochinolinio quaternario).

**ANFOTERI:** contengono sia un gruppo carico - sia uno carico + (imidazoline e le betaine). Hanno un comportamento diverso a seconda del pH.

# DETERGENTI

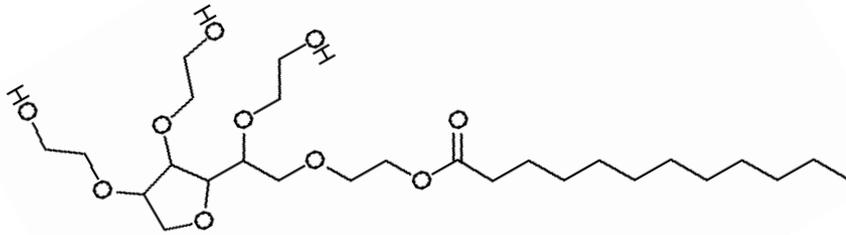
## Non ionici:

Triton X-100 (estrazione DNA)



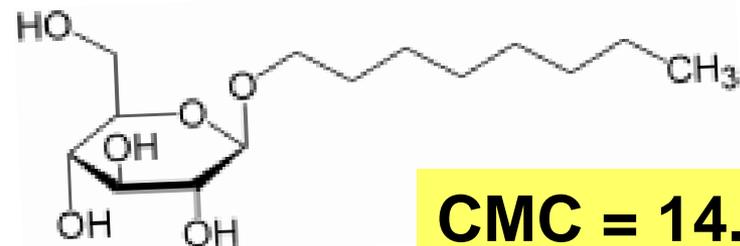
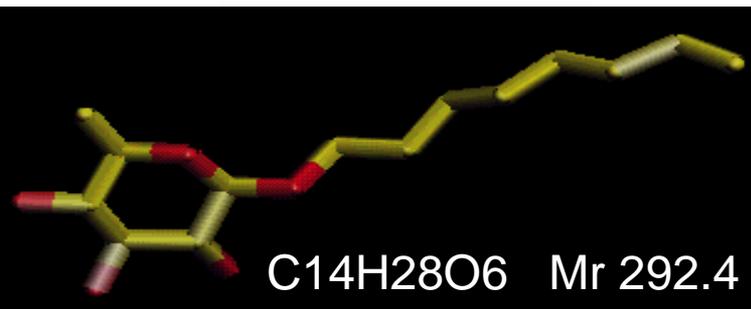
**CMC = ~0,2 mM**

Tween 20 (studi di interazione e funzione)



**CMC = 0,06 mM**

Octilglucoside (elettroforesi 2D)



**CMC = 14.5 mM**

# DETERGENTI

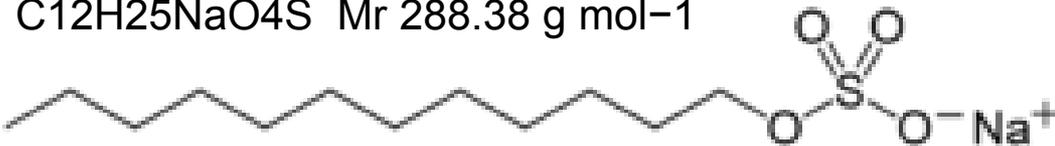
I **detergenti ionici**, a causa della propria carica, distruggono legami ionici e ponti idrogeno, portando anche alla completa **denaturazione** una proteina.

## Anionici:

**Sodio dodecil solfato (SDS)** o sodio laurilsolfato (**SLS**)

**CMC = 8.3 mM**

$C_{12}H_{25}NaO_4S$  Mr 288.38 g mol<sup>-1</sup>



Usato in prodotti, come dentifricio, shampoo, schiuma da barba e saponi liquidi.

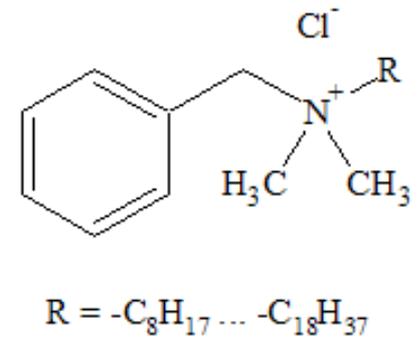
La **polvere di SDS** è molto volatile, irritante per occhi, cute e vie respiratorie. Contatti ripetuti o prolungati posson causar dermatiti. Alla combustione, forma gas tossici.

# DETERGENTI

## Cationici:

Medio/Alto potere disinfettante, per la capacità di agire sulla membrana esterna dei batteri gram -

Cloruro di benzalconio: miscela di cloruri di alchil-benzil-dimetilammonio (largamente presente in colliri e colluttori)



Trovano scarsa o nessuna applicazione nei comuni laboratori di biochimica e biologia molecolare.

# Preparazione di un tampone (1L)

- pesare
- H<sub>2</sub>O (~ l'80%)
- miscelare
- pH
- portare a volume

 CALBIOCHEM®

## Buffers

A guide for the preparation and use of buffers in biological systems

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

Advancing your life science discoveries™

# FORZA IONICA

$$\mu = \frac{1}{2} \sum cz^2$$

c = concentrazione specie ionica  
z = carica dello ione

L'unità di misura di  $\mu$  è la **molarità**.

Calcolo della forza ionica di 2 soluzioni:

1) 0.5 M KCl

2) 0.2 M NaCl + 0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>