

Insegnamento di Biochimica Applicata e Proteomica  
2019

## **Introduzione al corso**

**Informazioni di base da corsi precedenti**



# Insegnamento di Biochimica Applicata e Proteomica

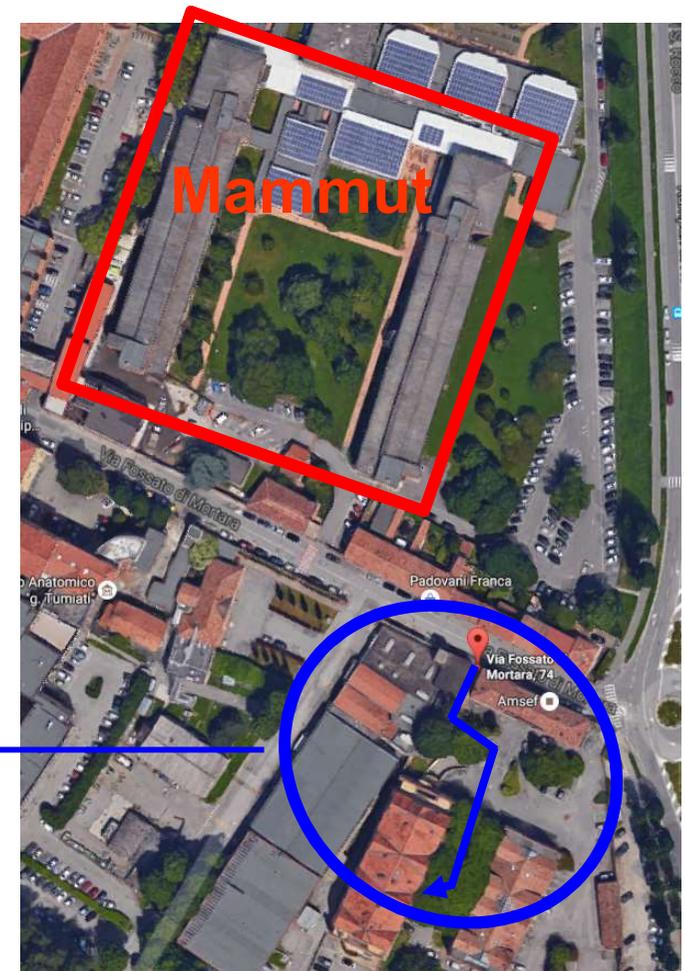
## Prof Francesco Bernardi

Martedì 14,30  
Ricevimento Studenti



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
BIOTECNOLOGIE  
c/o  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
BIOTECNOLOGIE

**Via Fossato di Mortara, 74**



## Testi consigliati

Testi in italiano:

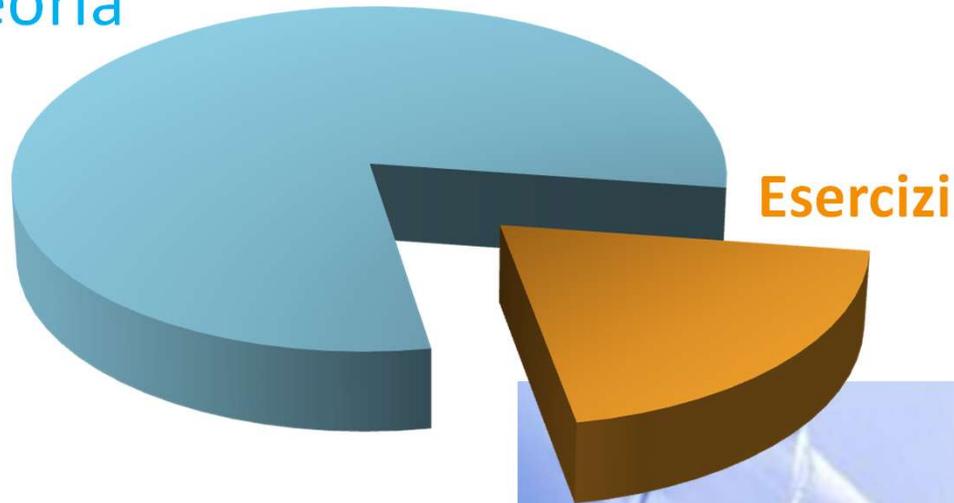
- **Biochimica Applicata. M. Stoppini e V. Bellotti. Ed. Edises. 2012.**
- **Biochimica e Biologia Molecolare. Principi e tecniche. Wilson K, Walker J. Ed. Cortina Raffaello. 2006.**
- Metodologie Biochimiche. Principi e tecniche per l'espressione, la purificazione e la caratterizzazione delle proteine. M.C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo. Ed. CEA. 2012.
- Principi di metodologia Biochimica . C. De Marco e C. Cini. Ed. Piccin. 2009.
- Metodologie di base per le scienze biomolecolari. R. Reed, D. Holmes, J. Weyers, A. Jones. Ed. Zanichelli. 2002.

Testi in inglese:

- **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Seventh Edition. K. Wilson, J. Walker. Ed. Cambridge University Press. 2010.**
- The Protein protocols Handbook. J.M. Walker. Third Edition. Ed. Humana Press. 2009.

# Insegnamento di Biochimica Applicata e Proteomica

Teoria



Esercizi

**Potete porre  
domande in  
qualsiasi  
momento**

**Orari lezione:**

**Lunedì 9.30 - 11.30**

**Mercoledì 8.30 - 10.30**



# **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**

# INFORMAZIONI DI BASE

# UNITÀ 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>peta</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>	<b>m</b>	Millesimo	0,001
$10^{-6}$	<u>micro</u>	<b>μ</b>	Milionesimo	0,000 001
$10^{-9}$	<u>nano</u>	<b>n</b>	Miliardesimo	0,000 000 001
$10^{-12}$	<u>pico</u>	<b>p</b>	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

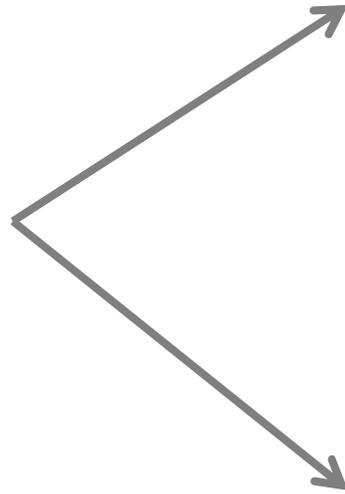
# UNITÀ DI MISURA

## 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>peta</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



# MISURAZIONI e COMPORTAMENTO DI UNO STRUMENTO



# MISURAZIONI e COMPORAMENTO DI UNO STRUMENTO



Preciso, ma non  
accurato



Preciso

Accurato  
e preciso



Accurato



Preciso e Accurato



Accurato, ma  
non preciso

# MISURAZIONI e COMPORAMENTO DI UNO STRUMENTO



Preciso, ma non  
accurato



Preciso

Accurato  
e preciso



Accurato



Preciso e Accurato

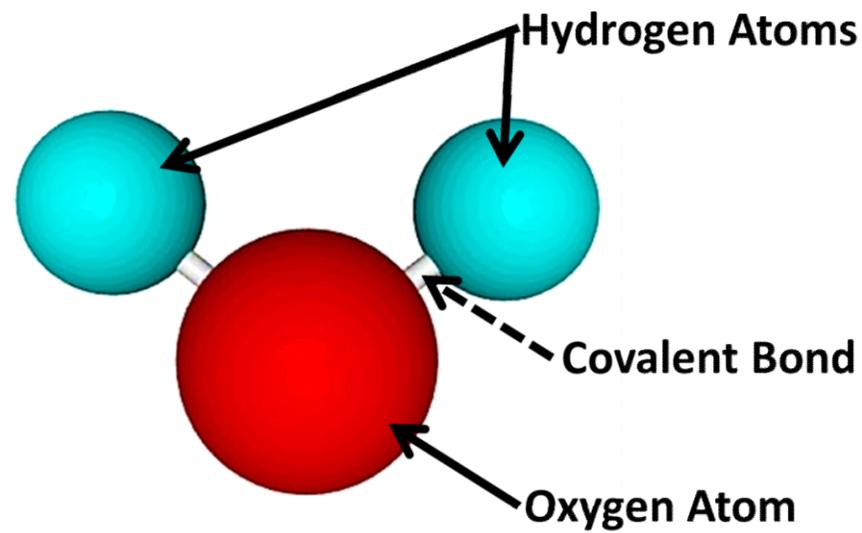


Né Preciso né Accurato

Accurato, ma  
non preciso

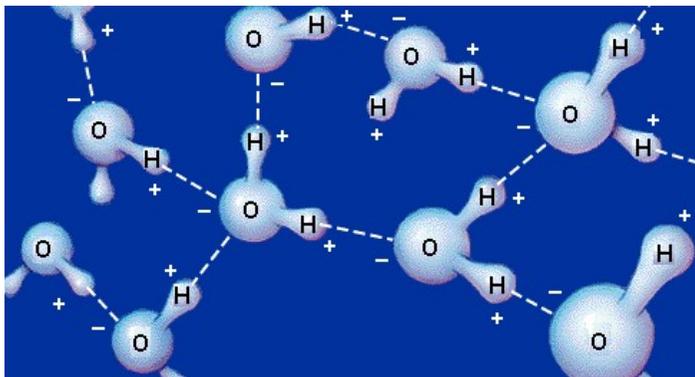
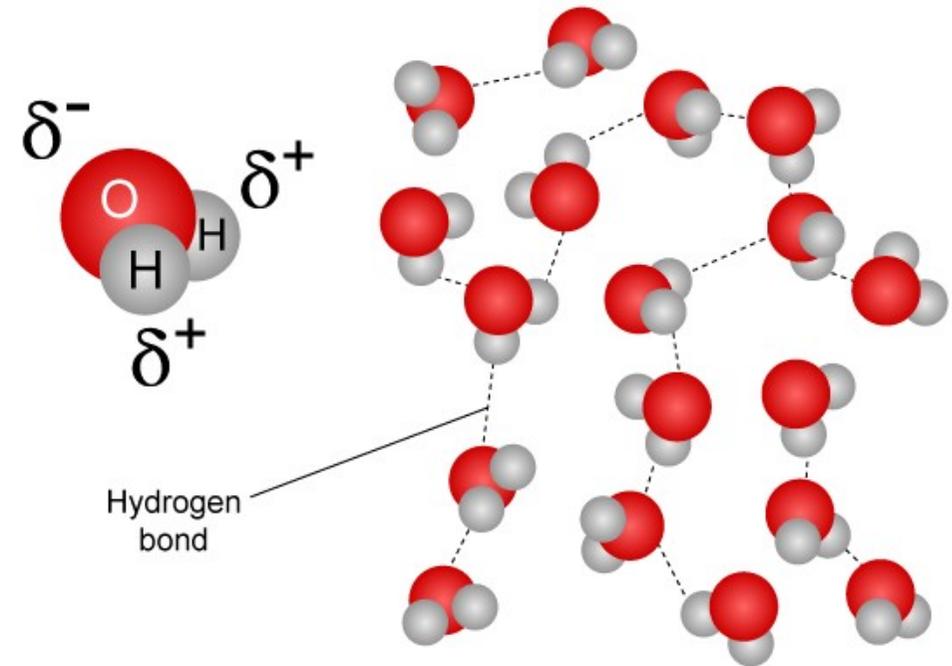
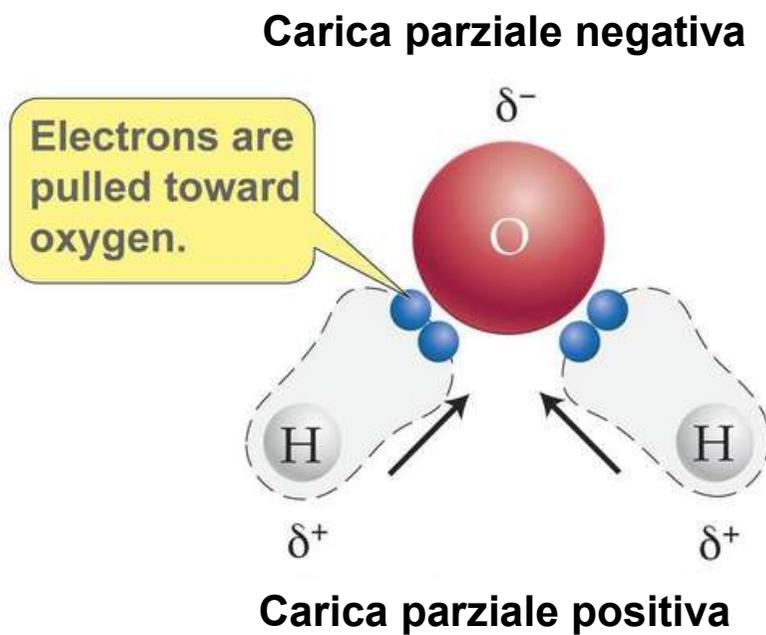


# Acqua e caratteristiche



# Acqua e caratteristiche

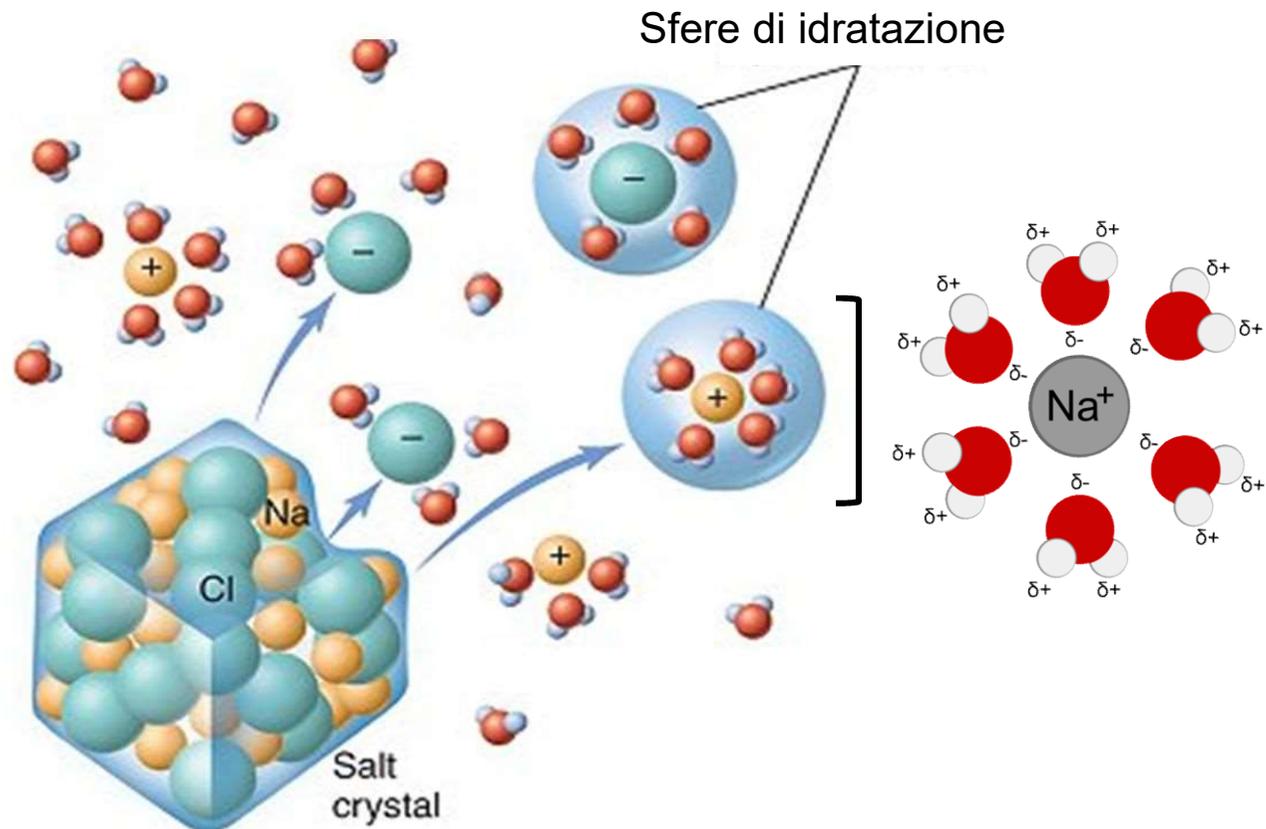
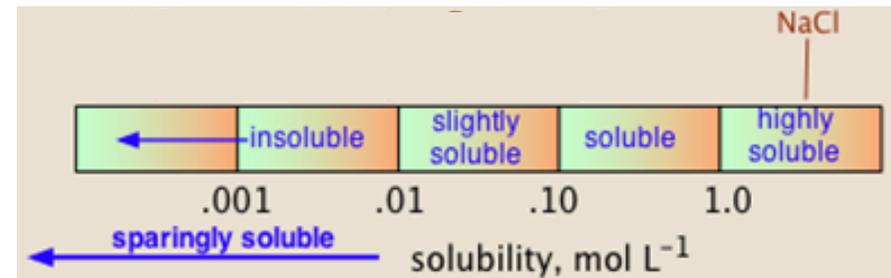
Unica sostanza ad essere presente naturalmente in tutti e tre gli stati di materia



# Soluzioni e solubilità dei sali

L'acqua dissolve sali come NaCl

- idrata e stabilizza  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$
- indebolisce attrazioni elettrostatiche

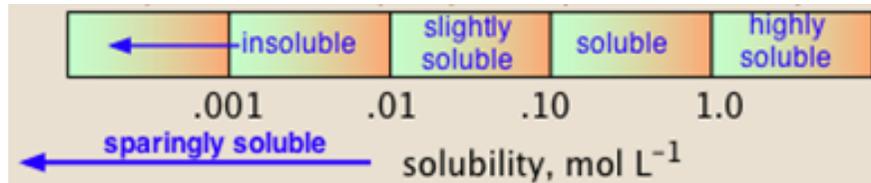


# Soluzioni e solubilità dei sali

solvente + soluto = SOLUZIONE



## Solubilità dei sali



Alcuni esempi di sali solubili:

Sale	PM (g/mol)	Solubilità 25°C		
		g/100ml <sub>H2O</sub>	g/L	mol/L
NaCl	58.44	35.8	358	6.13
NaNO <sub>3</sub>	84.5	92.1	921	10.9
KCl	74.55	33	330	4.43
KNO <sub>3</sub>	101.1	38	380	3.76

# Soluzioni e solubilità dei sali

solvente + soluto = SOLUZIONE

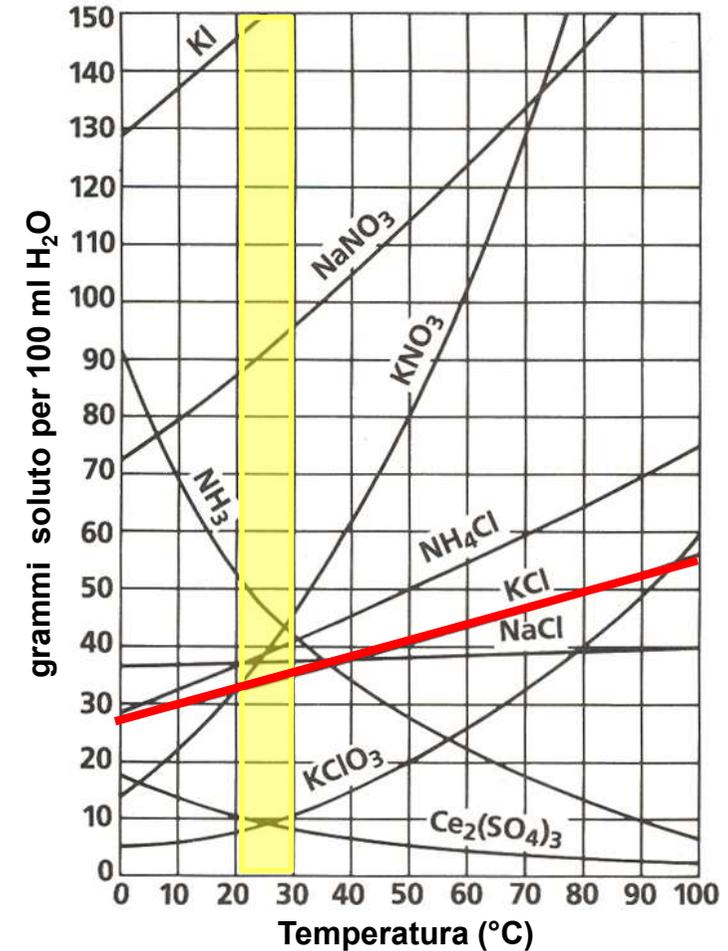


## Solubilità dei sali



Alcuni esempi di sali solubili:

Sale	PM (g/mol)	Solubilità 25°C		
		g/100ml <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	g/L	mol/L
NaCl	58.44	35.8	358	6.13
NaNO <sub>3</sub>	84.5	92.1	921	10.9
KCl	74.55	33	330	4.43
KNO <sub>3</sub>	101.1	38	380	3.76



**La temperatura influenza la solubilità dei sali!**

## Modi di esprimere la concentrazione

**Percentuale peso/volume** (%p/vol; %p/v; %weight/volume; %w/v)

Grammi di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale volume/volume** (%vol/vol; %v/v)

Volume di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale peso/peso** (%p/p; %weight/weight; %w/w)

Grammi di soluto per 100 g di soluzione

## Modi di esprimere la concentrazione

**Percentuale peso/volume** (%p/vol; %p/v; %weight/volume; %w/v)

Grammi di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale volume/volume** (%vol/vol; %v/v)

Volume di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale peso/peso** (%p/p; %weight/weight; %w/w)

Grammi di soluto per 100 g di soluzione

**Molarità** (mol/L; M)

Numero di moli in 1 L di soluzione

## Modi di esprimere la concentrazione

**Percentuale peso/volume** (%p/vol; %p/v; %weight/volume; %w/v)

Grammi di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale volume/volume** (%vol/vol; %v/v)

Volume di soluto in 100 mL di soluzione

**Percentuale peso/peso** (%p/p; %weight/weight; %w/w)

Grammi di soluto per 100 g di soluzione

**Molarità** (mol/L; M)

Numero di moli in 1 L di soluzione

**Rapporto di concentrazione** (X)

Usato per calcolare il volume di utilizzo

Es. PBS **10X** = PBS concentrato 10 volte di più (10X) rispetto alla concentrazione di lavoro (indicata come 1X)

→ **NO** unità di misura, **NO** informazioni su composizione/concentrazioni

# Scala del pH e concentrazioni di H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup>

## Hydrogen Ion [H<sup>+</sup>]

pH	[H <sup>+</sup> ]	
14	$1 \times 10^{-14}$	<b>1.0</b>
13	$1 \times 10^{-13}$	<b>0.1</b>
12	$1 \times 10^{-12}$	<b>0.01</b>
11	$1 \times 10^{-11}$	<b>0.001</b>
10	$1 \times 10^{-10}$	<b>0.0001</b>
9	$1 \times 10^{-9}$	<b>0.00001</b>
8	$1 \times 10^{-8}$	<b>0.000001</b>
7	$1 \times 10^{-7}$	<b>0.0000001</b>
6	$1 \times 10^{-6}$	<b>0.00000001</b>
5	$1 \times 10^{-5}$	<b>0.000000001</b>
4	$1 \times 10^{-4}$	<b>0.0000000001</b>
3	$1 \times 10^{-3}$	<b>0.00000000001</b>
2	$1 \times 10^{-2}$	<b>0.000000000001</b>
1	$1 \times 10^{-1}$	<b>0.0000000000001</b>
0	$1 \times 10^0$	<b>0.00000000000001</b>



# Scala del pH e concentrazioni di H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup>

Hydrogen Ion [H <sup>+</sup> ]			Hydroxyl Ion [OH <sup>-</sup> ]		
pH	[H <sup>+</sup> ]			[OH <sup>-</sup> ]	pOH
14	1 × 10 <sup>-14</sup>	1.0	0.0000000000000001	1 × 10 <sup>-0</sup>	0
13	1 × 10 <sup>-13</sup>	0.1	0.000000000000001	1 × 10 <sup>-1</sup>	1
12	1 × 10 <sup>-12</sup>	0.01	0.00000000000001	1 × 10 <sup>-2</sup>	2
11	1 × 10 <sup>-11</sup>	0.001	0.0000000000001	1 × 10 <sup>-3</sup>	3
10	1 × 10 <sup>-10</sup>	0.0001	0.000000000001	1 × 10 <sup>-4</sup>	4
9	1 × 10 <sup>-9</sup>	0.00001	0.0000000001	1 × 10 <sup>-5</sup>	5
8	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.000001	0.00000001	1 × 10 <sup>-6</sup>	6
7	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.0000001	0.0000001	1 × 10 <sup>-7</sup>	7
6	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.00000001	0.000001	1 × 10 <sup>-8</sup>	8
5	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.000000001	0.00001	1 × 10 <sup>-9</sup>	9
4	1 × 10 <sup>-4</sup>	0.0000000001	0.0001	1 × 10 <sup>-10</sup>	10
3	1 × 10 <sup>-3</sup>	0.00000000001	0.001	1 × 10 <sup>-11</sup>	11
2	1 × 10 <sup>-2</sup>	0.000000000001	0.01	1 × 10 <sup>-12</sup>	12
1	1 × 10 <sup>-1</sup>	0.0000000000001	0.1	1 × 10 <sup>-13</sup>	13
0	1 × 10 <sup>0</sup>	0.000000000000001	1.0	1 × 10 <sup>-14</sup>	14



[H<sup>+</sup>] e [OH<sup>-</sup>] sono espresse in **molarità**, ovvero **moli/L**



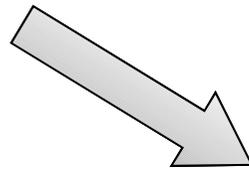
**1 unità di pH** indica una differenza di [H<sup>+</sup>] di **10 volte**

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} \longrightarrow \text{pH} = \log \frac{1}{1.0 \times 10^{-7}} = 7.0$$

# TAMPONI

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

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



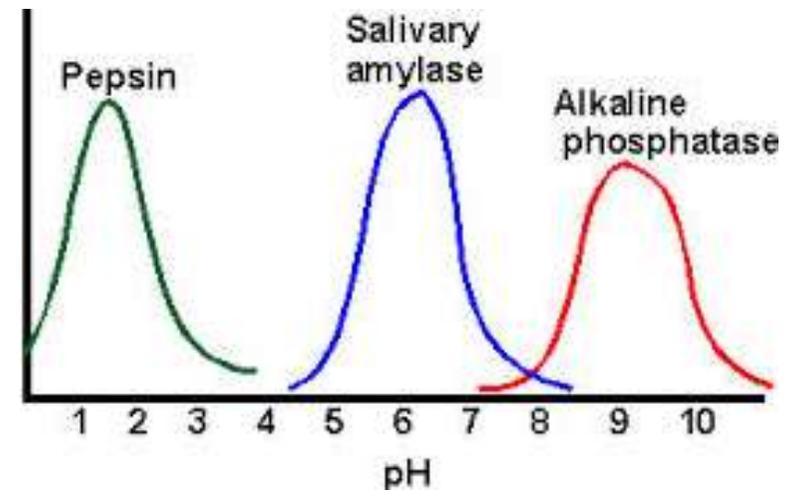
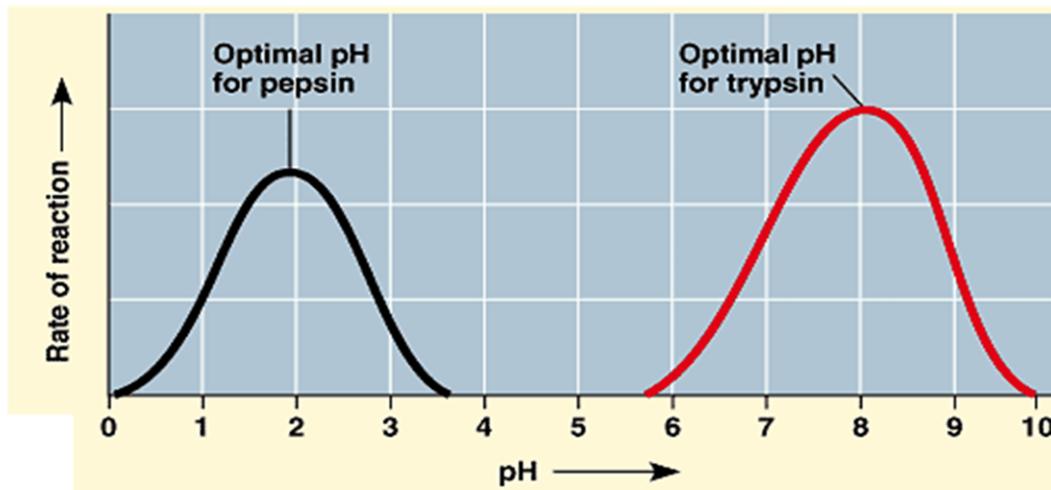
Proprietà finemente regolata  
(generalmente mantenuto vicino alla neutralità)  
mediante **sistemi tampone**.

# **Il pH influenza la stabilità (e la funzione) delle proteine**

## Il pH influenza la stabilità (e la funzione) delle proteine

Tuttavia.....

Non sempre pH "estremi" risultano dannosi...

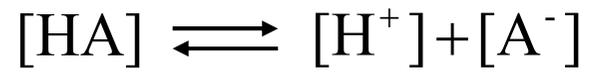


È quindi importante mantenere **controllato**

il valore di **pH** necessario alle **condizioni ottimali** di lavoro

(che dipendono dalle molecole oggetto di studio)

# SELEZIONE DEI TAMPONI



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$K_a$  = Costante di  
dissociazione acida

**pK<sub>a</sub>**      $\text{p}K_a = \log \frac{1}{[K_a]} = -\log K_a$

# SELEZIONE DEI TAMPONI

I **tamponi** (buffer) sono soluzioni acquose in grado di resistere a piccole variazioni di pH (aggiunta di  $[H^+]$  o  $[OH^-]$ )

**Acido debole**

(donatore di protoni)

+

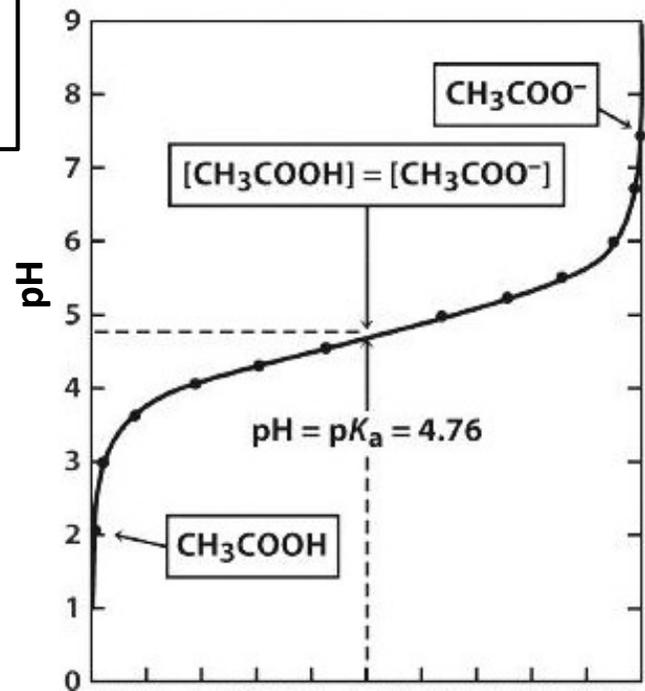
**Base coniugata**

(accettore di protoni)

# SELEZIONE DEI TAMPONI

I **tamponi** (buffer) sono soluzioni acquose in grado di resistere a piccole variazioni di pH (aggiunta di  $[H^+]$  o  $[OH^-]$ )

**Acido debole**  
(donatore di protoni)  
+  
**Base coniugata**  
(accettore di protoni)



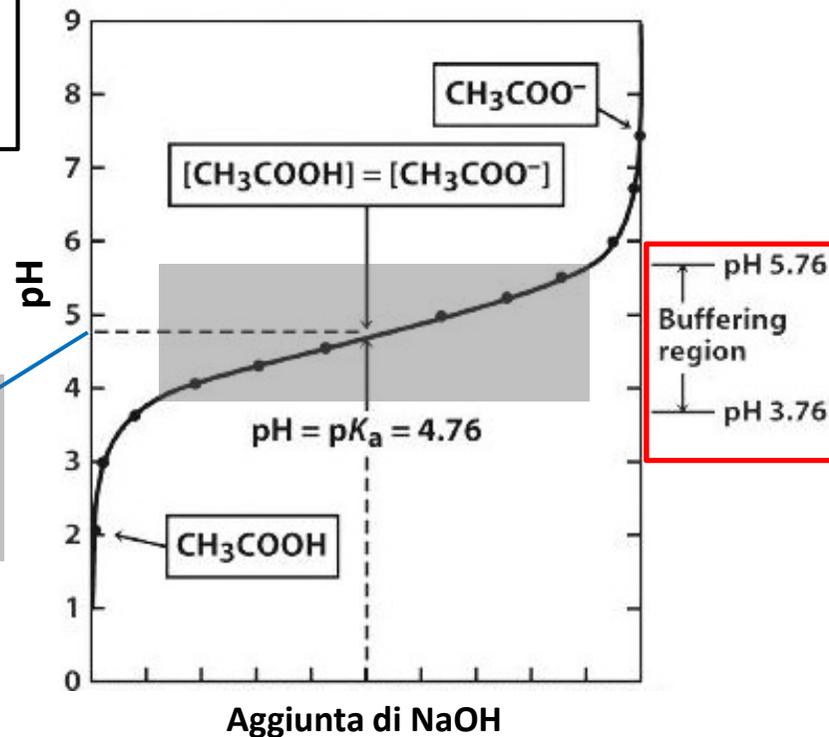
Aggiunta di NaOH ad Acido Acetico

# SELEZIONE DEI TAMPONI

I **tamponi** (buffer) sono soluzioni acquose in grado di resistere a piccole variazioni di pH (aggiunta di  $[H^+]$  o  $[OH^-]$ )

**Acido debole**  
(donatore di protoni)  
+  
**Base coniugata**  
(accettore di protoni)

**Punto di  
equivalenza**



$$pK_a = \log \frac{1}{[K_a]} = -\log K_a$$



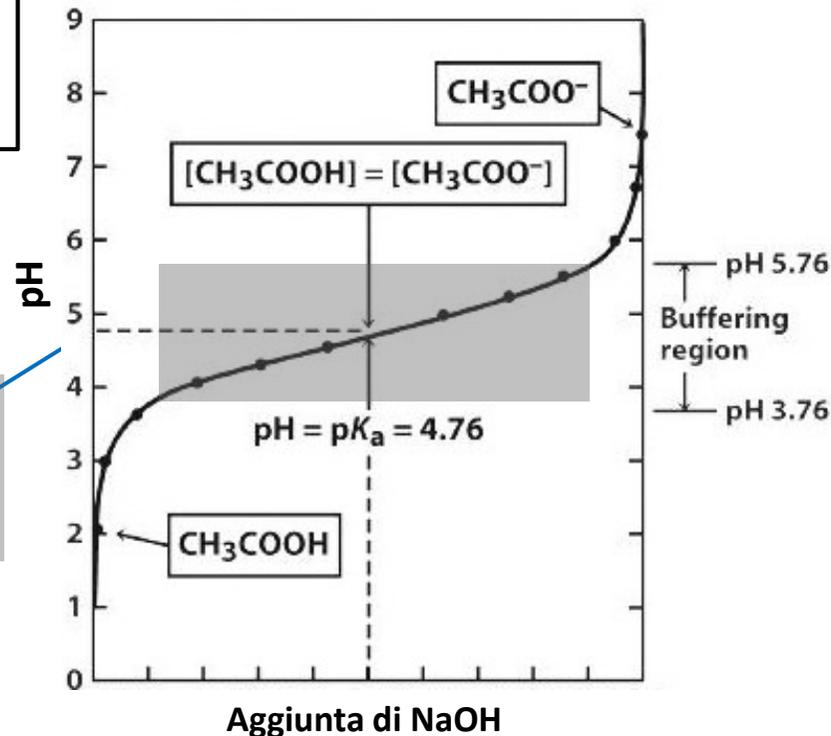
$$K_a = \frac{1}{10^{4.76}} \quad \text{or} \quad K_a = 10^{-4.76}$$

# SELEZIONE DEI TAMPONI

I **tampone** (buffer) sono soluzioni acquose in grado di resistere a piccole variazioni di pH (aggiunta di  $[H^+]$  o  $[OH^-]$ )

**Acido debole**  
(donatore di protoni)  
+  
**Base coniugata**  
(accettore di protoni)

**Punto di  
equivalenza**



$$pK_a = \log \frac{1}{[K_a]} = -\log K_a$$



$$K_a = \frac{1}{10^{4.76}} \quad \text{or} \quad K_a = 10^{-4.76}$$

$K_a$  = Costante di dissociazione acida

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

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 DEI TAMPONI

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

## - Henderson-Hasselbalch -

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

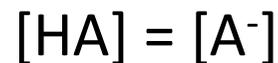
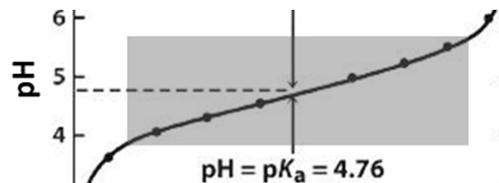
Esprime la **variazione** dello **stato di ionizzazione** di un elettrolita debole in funzione del pH.



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$K_a$  = Costante di dissociazione **acida**

Al **punto di equivalenza**



$$\longrightarrow pH = pK_a + \log 1$$

$$\downarrow$$
$$pH = pK_a$$

# SELEZIONE DEL TAMPONE (1) 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	6.16	6.10	5.97	
<b>BIS-TRIS</b>		[ ]						5.8-7.2	-	6.50	6.36	
ADA		[ ]						6.0-7.2	6.65	6.59	6.46	
ACES		[ ]						6.1-7.5	6.88	6.78	6.54	
PIPES		[ ]						6.1-7.5	6.80	6.76	6.66	
MOPSO		[ ]						6.2-7.6	-	6.90	6.75	
BIS-TRIS PROPANE		[ ]							6.3-9.5	-	6.8,9.0	-
BES			[ ]					6.4-7.8	7.17	7.09	6.90	
MOPS			[ ]					6.5-7.9	7.28	7.20	7.02	
TES			[ ]					6.8-8.2	7.50	7.40	7.16	
<b>HEPES</b>			[ ]					6.8-8.2	7.55	7.48	7.31	
DIPSO			[ ]					7.0-8.2	-	7.60	7.35	
MOBS			[ ]					6.9-8.3	-	7.60	-	

## SELEZIONE DEL TAMPONE (2) SULLA BASE DELLA pKa

pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20°)	pKa (at 25°)	pKa (at 37°)
TAPSO			▭				7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA			▭				7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO			▭				7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO			▭				7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA			▭				7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS			▭				7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE			▭				7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE			▭				7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE			▭				7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS			▭				7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS			▭				7.7-9.1	8.49	8.40	8.18
AMPD				▭			7.8-9.7	-	8.80	-
TABS				▭			8.2-9.6	-	8.90	-
AMPSO				▭			8.3-9.7	-	9.00	9.10
CHES				▭			8.6-10.0	9.55	9.49	9.36
CAPSO				▭			8.9-10.3	-	9.60	9.43
AMP				▭			9.0-10.5	-	9.70	-
CAPS					▭		9.7-11.1	10.56	10.40	10.02
CABS					▭		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**

( $pK_a = 8.06$  a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , range pH: 7.0-9.2 ) è spesso **tossico** in sistemi biologici, per la sua solubilità in lipidi.

## RIASSUMENDO

Il tampone adatto:

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

(Intervallo di utilizzo: **0.02 - 0.5 mol/L**)

# GOOD'S BUFFERS

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

VOL. 5, NO. 2, FEBRUARY 1966

## Hydrogen Ion Buffers for Biological Research\*

Norman E. Good, G. Douglas Winget, Wilhelmina Winter, Thomas N. Connolly, Seikichi Izawa, and Raizada M. M. Singh

- Scelti per aver **pK<sub>a</sub>** fra **6 e 8**.
- Bassa solubilità in solventi non polari.
- Chimicamente **stabili**.
- **Non attraversano** le membrane cellulari.
- **Non assorbono** nell'UV-visibile.

# GOOD'S BUFFERS

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

VOL. 5, NO. 2, FEBRUARY 1966

## Hydrogen Ion Buffers for Biological Research\*

Norman E. Good, G. Douglas Winget, Wilhelmina Winter, Thomas N. Connolly, Seikichi Izawa, and Raizada M. M. Singh

- 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.

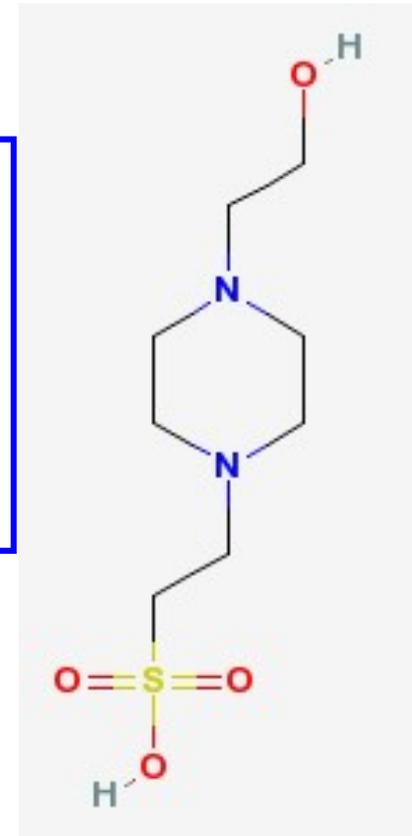
Buffer	$pK_a$ at 20°C
<u>MES</u>	6.15
ADA	6.6
<u>PIPES</u>	6.8
<u>ACES</u>	6.9
Choline chloride	7.1
BES	7.15
TES	7.5
<u>HEPES</u>	7.55
Acetamidoglycine	7.7
<u>Tricine</u>	8.15
Glycinamide	8.2
Bicine	8.35

# 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:  $C_8H_{18}N_2O_4S$

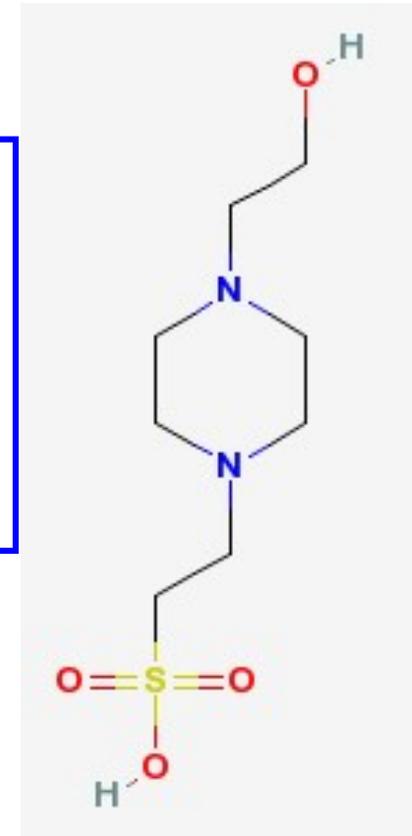
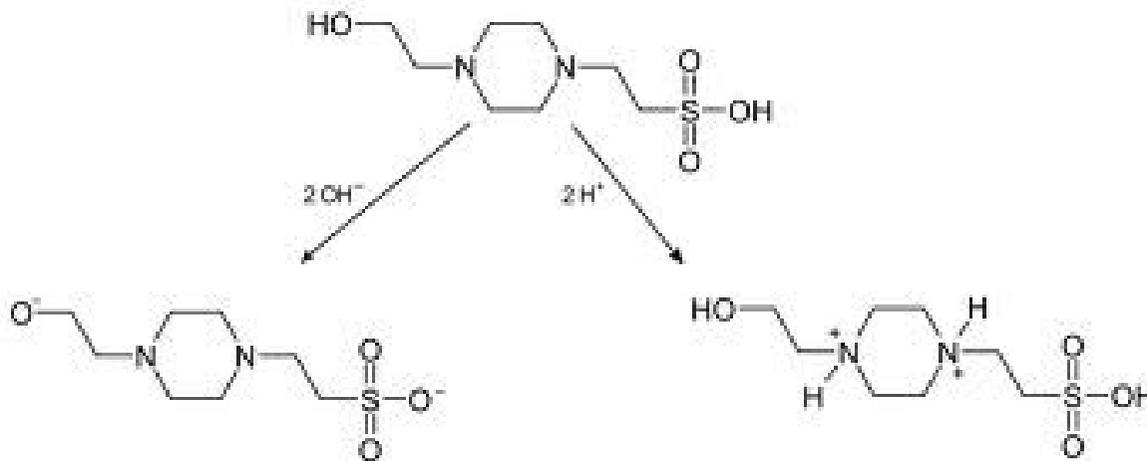


# HEPES

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:  $C_8H_{18}N_2O_4S$

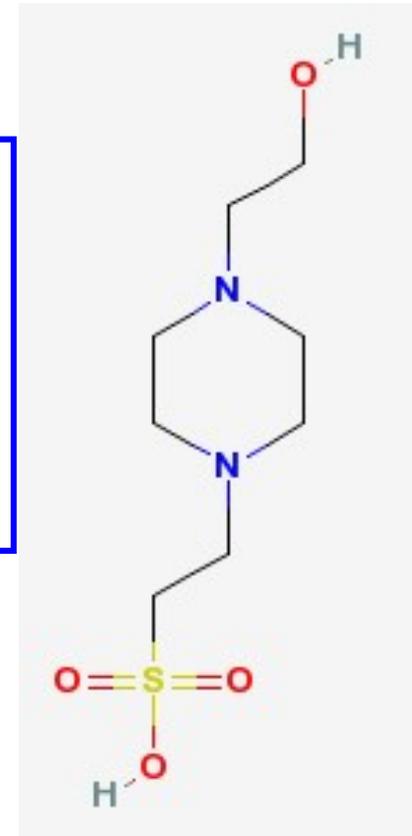
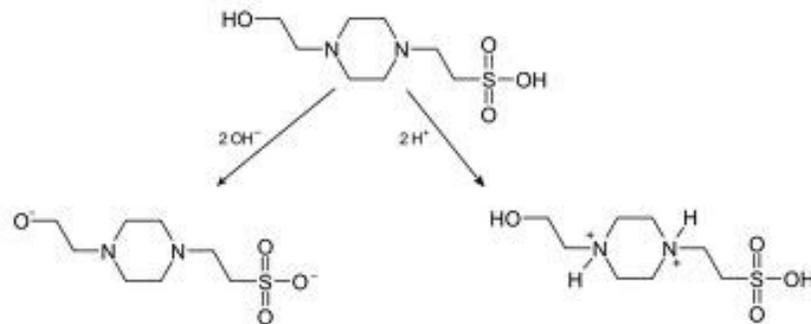


# HEPES

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!**).

# SOLUZIONI TAMPONE FREQUENTEMENTE UTILIZZATI NELL'INDAGINE BIOCHIMICA

## Hepes buffered saline (**HBS**)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

## Phosphate buffered saline (**PBS**)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

## Tris buffered saline (**TBS**)

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4

(In alcuni casi, aggiunta di **BSA 0.5-5% p/v** a seconda del tipo di esperimento)



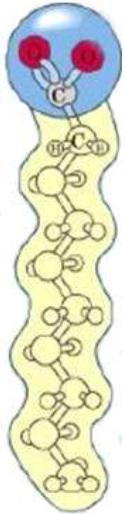
# DETERGENTI

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

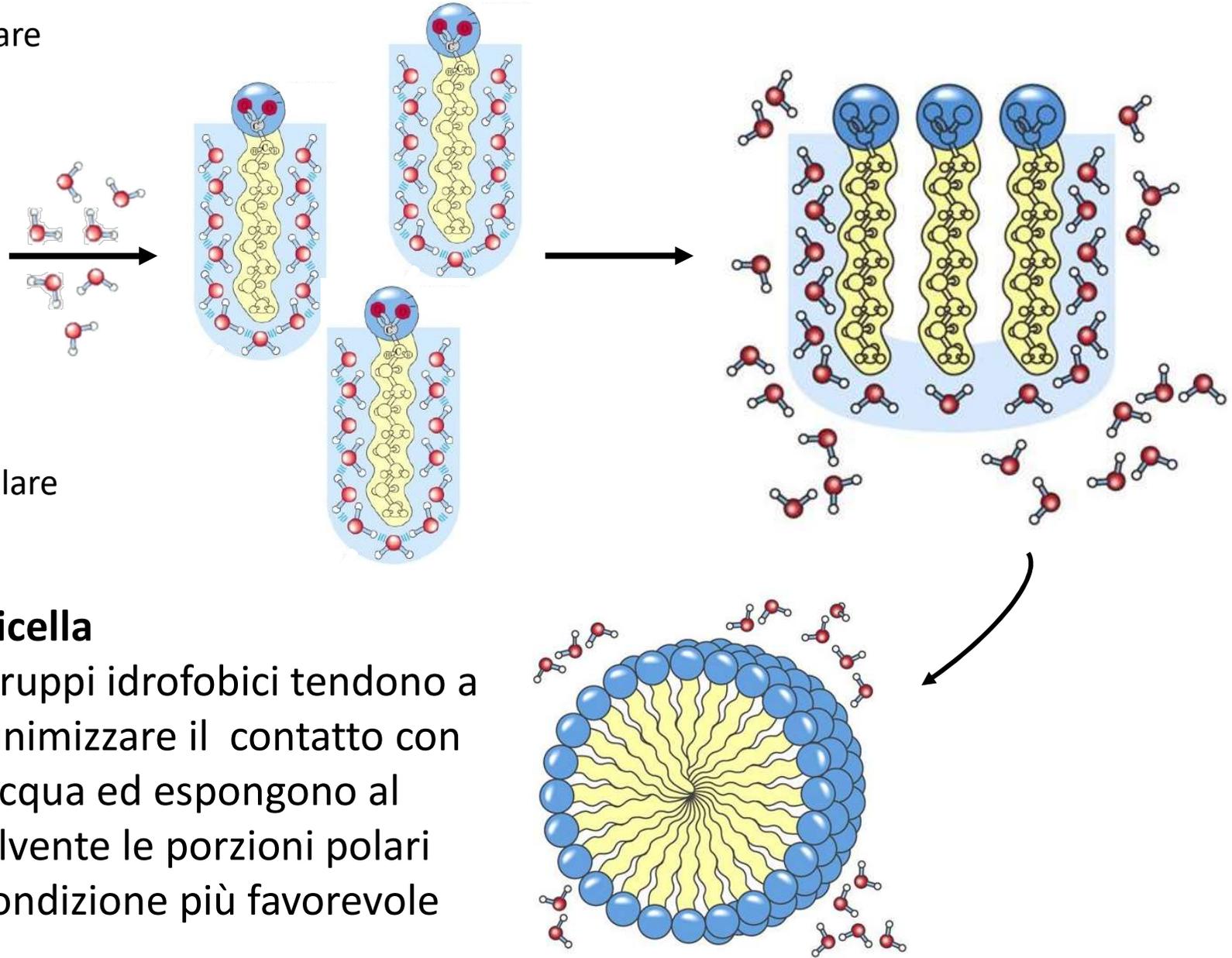
Alcuni sono naturali, la maggior parte di sintesi (dal 1836).

# Molecole apolari / anfipatiche

"Testa" polare



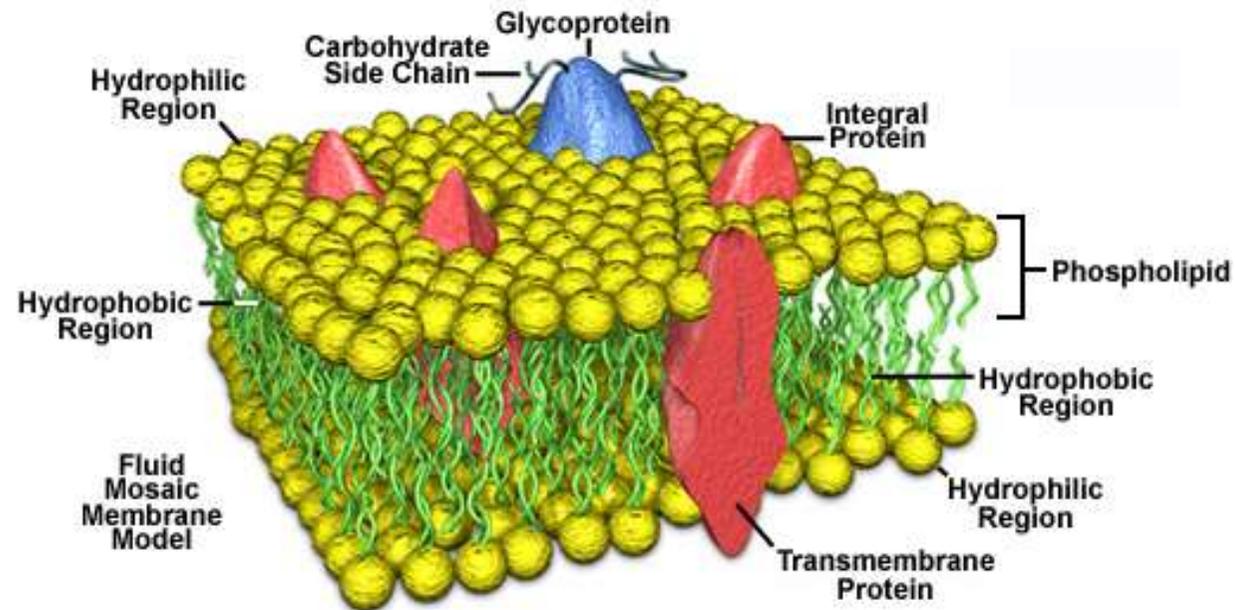
"Coda" apolare



## Micella

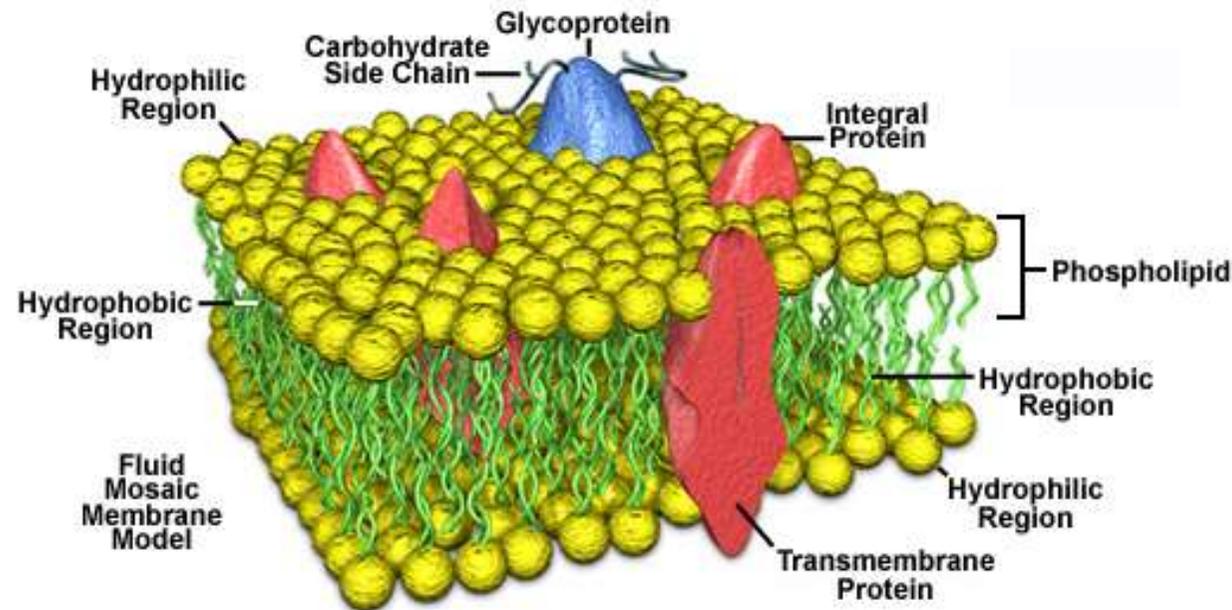
I gruppi idrofobici tendono a minimizzare il contatto con l'acqua ed espongono al solvente le porzioni polari (condizione più favorevole)

# DETERGENTI



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

# DETERGENTI

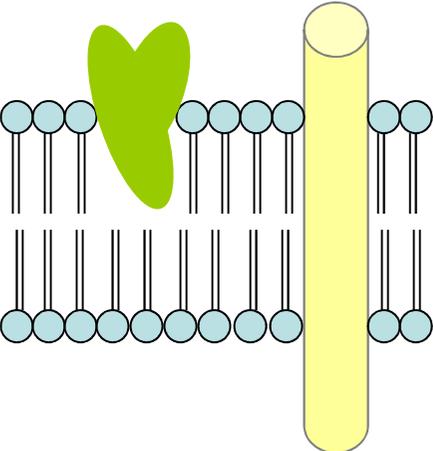


Proteine transmembrana, se isolate dalle membrane, espongono regioni idrofobiche, causando **aggregazione**.

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

# CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA (CMC)

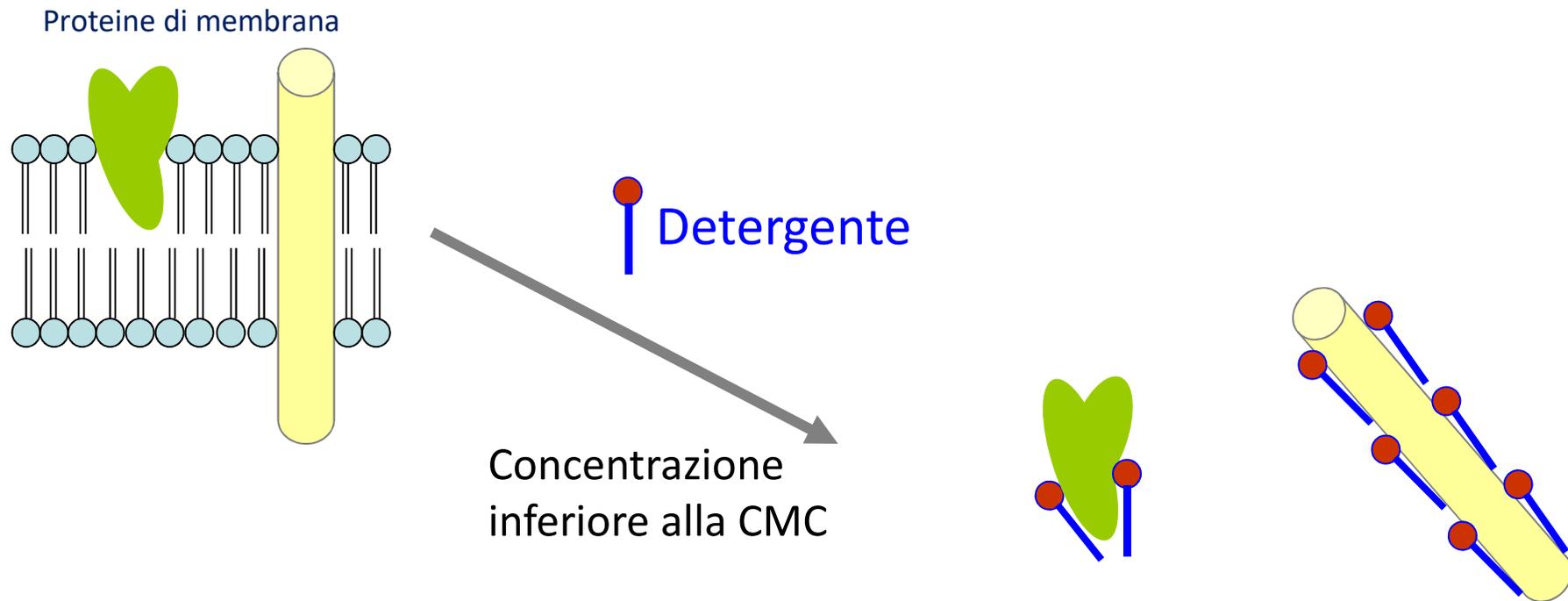
Proteine di membrana



Detergente

# CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA (CMC)

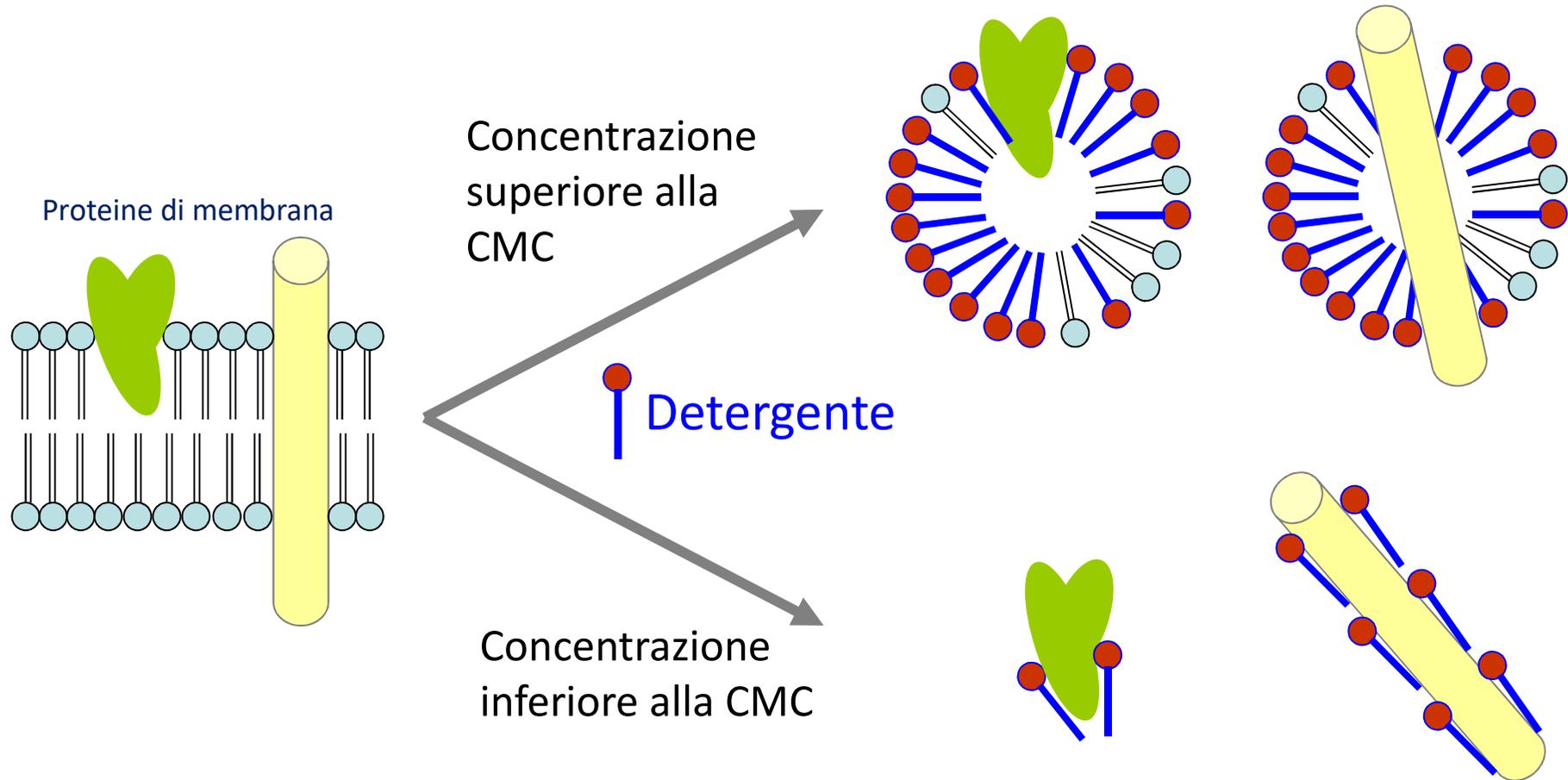
Basse [Detergente] = in H<sub>2</sub>O come molecola isolata.



# CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA (CMC)

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

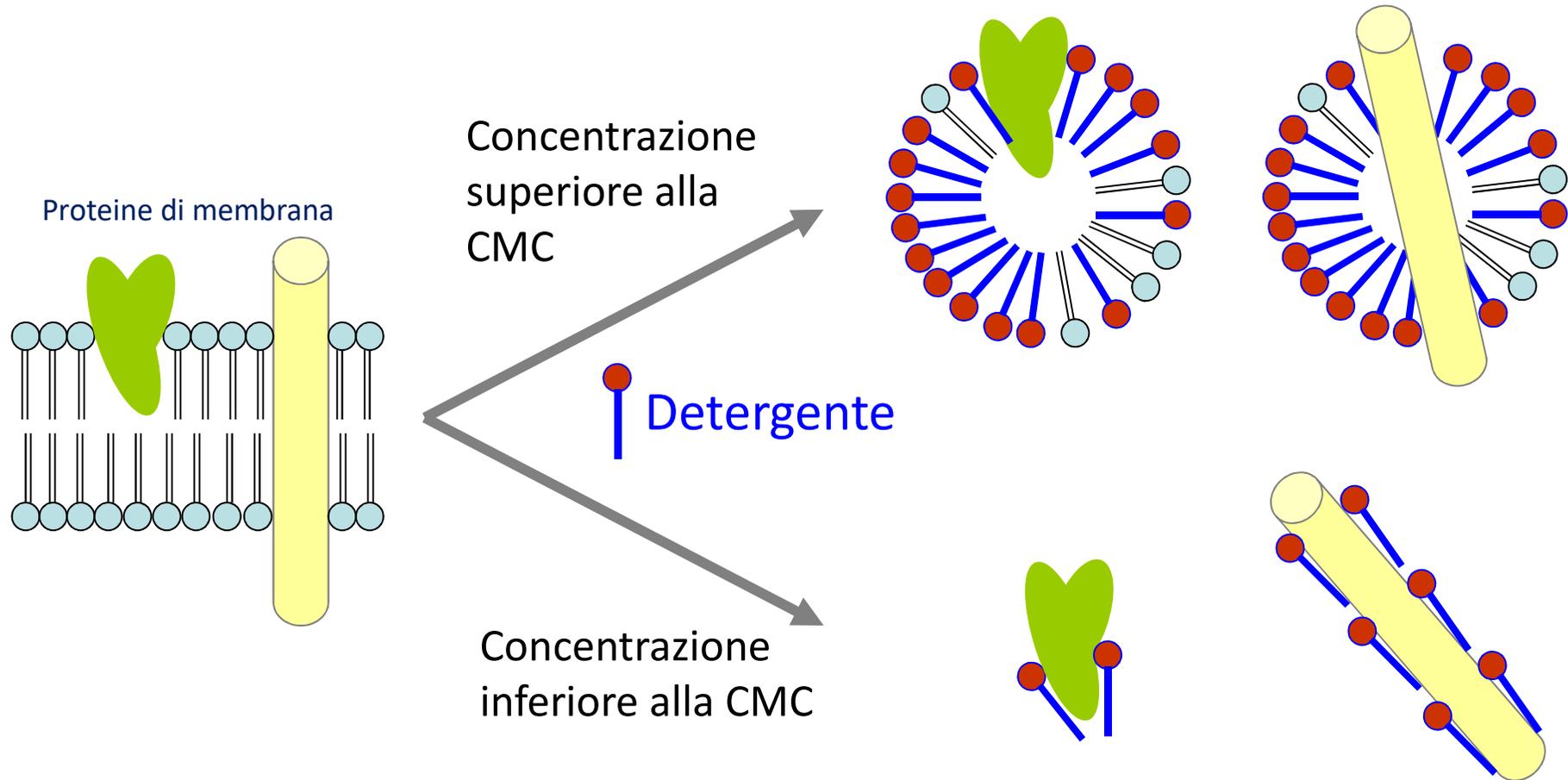
**Alte** [Detergente] = forma micelle.



# 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).

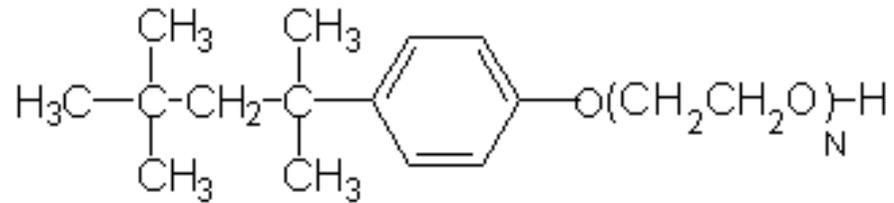
**CATIONICI:** gruppo idrofilo carico + (sali quaternari di ammonio, sali di piridinio quaternario, sali di isochinolinio quaternario).

**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, permeabilizzazione membrane)

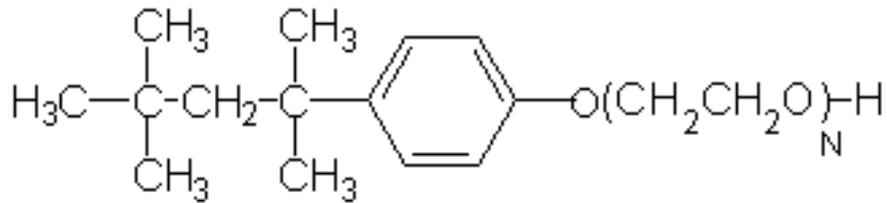


**CMC = ~0,2 mM**

# DETERGENTI

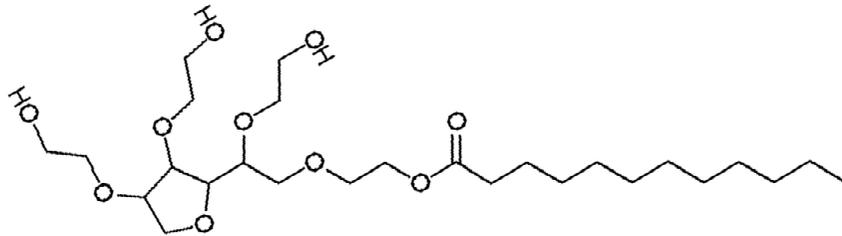
## Non ionici:

**Triton X-100** (estrazione DNA, permeabilizzazione membrane)



**CMC = ~0,2 mM**

**Tween 20** (studi di interazione e funzione)

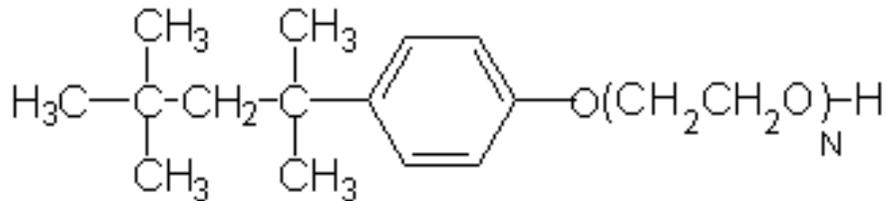


**CMC = 0,06 mM**

# DETERGENTI

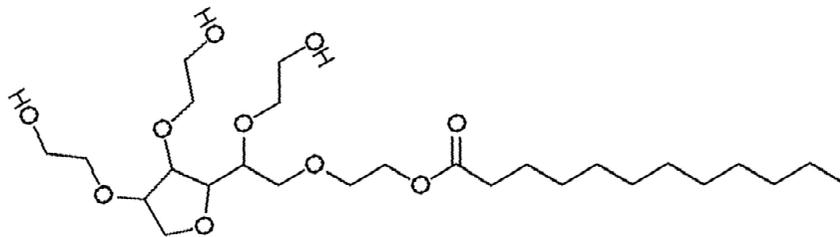
## Non ionici:

**Triton X-100** (estrazione DNA, permeabilizzazione membrane)



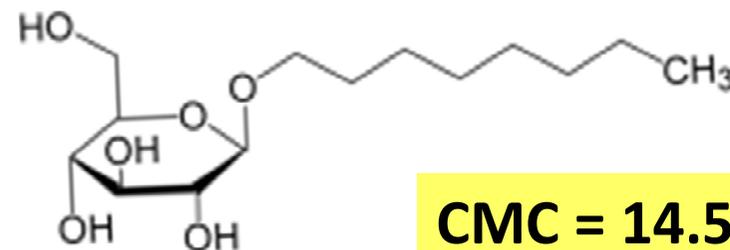
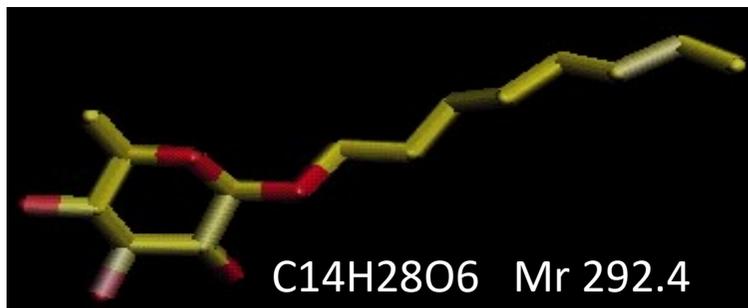
**CMC = ~0,2 mM**

**Tween 20** (studi di interazione e funzione)



**CMC = 0,06 mM**

**Octilglucoside** (solubilizzazione proteine di membrana, elettroforesi 2D)



**CMC = 14.5 mM**

## DETERGENTI

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

# DETERGENTI

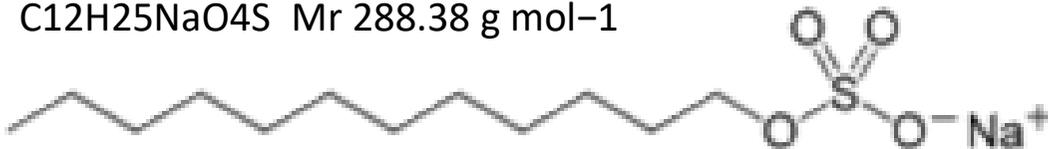
I **detergenti ionici**, a causa della carica, distruggono legami ionici e ponti idrogeno, portando anche alla completa **denaturazione** una proteina.

## Anionici:

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

CMC = 8.3 mM

C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S Mr 288.38 g mol<sup>-1</sup>



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

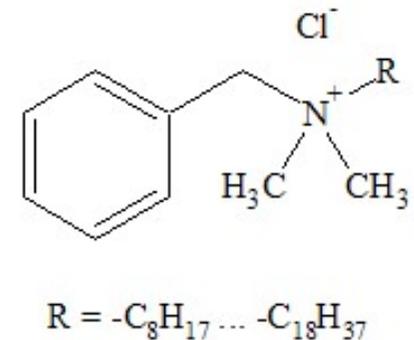
La **polvere di SDS** è molto volatile, irritante per occhi, cute e vie respiratorie. Contatti ripetuti o prolungati possono causare dermatiti. Alla combustione, forma gas tossici.

# 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 coluttori)



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

## Es. Preparazione di un tampone 1

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM
V finale		1 L

$$\text{n. moli} = \frac{\text{g soluto}}{\text{PM (g/mol)}}$$

**Hepes**

PM (g/mol) x n. moli = g soluto

$$238.3 \text{ g/mol} \times 0.02 \text{ mol} = 4.76 \text{ g}$$

**NaCl**

PM (g/mol) x n. moli = g soluto

$$58.44 \text{ g/mol} \times 0.15 \text{ mol} = 8.77 \text{ g}$$

## Es. Preparazione di un tampone 2

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM
V finale		1 L

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

## Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

V finale 1 L

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

**Hepes**

$$C_1 = 1 \text{ M}; C_2 = 20 \text{ mM}; V_2 = 1 \text{ L}$$

$$V_1 = (20 \text{ mM} \times 1000 \text{ ml}) / 1000 \text{ mM} = 20 \text{ ml}$$

**NaCl**

$$C_1 = 1.5 \text{ M}; C_2 = 150 \text{ mM}; V_2 = 1 \text{ L}$$

$$V_1 = (150 \text{ mM} \times 1000 \text{ ml}) / 1500 \text{ mM} = 100 \text{ ml}$$

## Es. Preparazione di un tampone

Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM

V finale

1 L

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

V finale

1 L

Fattore di diluizione

## Es. Preparazione di un tampone

### Hepes buffered saline (HBS)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4

	PM	C finale
Hepes	238.3 g/mol	20 mM
NaCl	58.44 g/mol	150 mM

**V finale** 1 L

	C iniziale	C finale
Hepes	1 M	20 mM
NaCl	1.5 M	150 mM

**V finale** 1 L

### Fattore di diluizione

$$\left. \begin{array}{l} 238.3 \text{ g} = 1 \text{ M} \\ \text{C finale} = 20 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 50$$

(50 volte meno)  $\rightarrow 238.3 / 50 = 4.76 \text{ g}$

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 1 \text{ M} \\ C_2 = 20 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 50$$

(50 volte meno)  $\rightarrow 1000 \text{ ml} / 50 = 20 \text{ ml}$

$$\left. \begin{array}{l} 58.44 \text{ g} = 1 \text{ M} \\ \text{C finale} = 150 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 6.66$$

(6.66 volte meno)  $\rightarrow 58.44 / 6.66 = 8.77 \text{ g}$

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 1.5 \text{ M} \\ C_2 = 150 \text{ mM} \end{array} \right\} \text{Rapporto} = 10$$

(10 volte meno)  $\rightarrow 1000 \text{ ml} / 10 = 100 \text{ ml}$



# METODO SCIENTIFICO

Ricerca del PERCHÉ, con consapevolezza della **fallibilità** delle ipotesi sperimentali.

## INDAGINE BIOCHIMICA

- Valutazione conoscenze nel settore di indagine (letteratura).
- Formulazioni ipotesi sperimentali.
- Selezione del sistema biologico.
- Scelta della variabile da studiare.
- Progettazione ed esecuzione dell'esperimento.
- Replicazione dell'esperimento e calcolo della variabilità.
- Formulazione delle conclusioni e nuove ipotesi.