Centro Stampa

N° 3741

BIOCHIMICA APPLICATA
2003-2004

DI PERETTI GIORGIA

1

PROGRAMMA DEL CORSO DI BIOCHIMICA APPLICATA
Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (CT.F.).

Docente: Prof.ssa Franca VIOLA – tel. 011/6707698
Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco

Ore di lezione: 65 (8 crediti)

Finalità del corso: acquisizione delle conoscenze di base circa le metodologie applicate nella sperimentazione biochimica, nella biologia molecolare e in biochimica clinica.

Programma:

Preparazione e manipolazione di campioni biologici. Uso e preparazione di soluzioni tampone. Rottura di cellule; preparazione e purificazione di organelli cellulari; centrifugazione: centrifughe, rotori, relazione tra numero di g e rpm, centrifugazione differenziale e di isodensità all'equilibrio con esempi applicativi (separazione di organelli cellulari, purificazione di acidi nucleici in gradiente di sali di cesio).

Metodi spettrofotometrici.: generalità: definizione di lunghezza d'onda, frequenza. Unità di misura e regioni dello spettro. Spettri di assorbimento con esempi di spettri di assorbimento di sostanze di interesse biochimico: proteine, acidi nucleici, NAD, citocromo c, citocromo P-450. Funzioni e meccanismo catalitico del citocromo P-450. Spettri differenziali e loro uso per lo studio delle interazioni citocromo-ligandi. Legge di Lambert-Beer e dosamenti quantitativi. Esempi di dosamenti: dosamento delle proteine (assorbanza a 280 nm, metodi di Lowry e del biureto): dosamenti di attività enzimatiche: unità di attivita' enzimatica, attività specifica, fattore di arricchimento durante una purificazione. Saggi in cinetica ed a tempo fisso. Relazione tra v_0, V_{max} e concentrazione di un enzima. Esempi di determinazione di attività enzimatiche: citocromo *c* reduttasi, lattico deidrogenasi, maltasi, proteasi. Utilizzo di reazioni accoppiate con enzimi deidrogenasici NAD-dipendenti: esempio dosamento di transaminasi. Utilizzo di enzimi come "reattivi" per il dosamento di metaboliti: esempio determinazione quantitativa del colesterolo. Fluorimetria ed applicazioni in biochimica. Luminometria e sistema luciferina-luciferasi per il dosamento di ATP. Dosamento spettrofotometrico del DNA e studio della temperatura di fusione di un DNA.

Tecniche cromatografiche ed elettroforetiche applicate all'isolamento, alla purificazione e all'analisi di sostanze di interesse biochimico e biochimico-clinico.

Tecniche cromatografiche: Generalità e definizioni. Tecniche cromatografiche particolarmente usate per la separazione di biomolecole. Polimeri utilizzati per le fasi stazionarie. Caratteristiche ed applicazioni delle cromatografie: di scambio ionico, di esclusione dimensionale (con esempi di determinazione del peso molecolare di proteine), di bioaffinità (con esempi di ligandi e strategie generali per il legame covalente dei ligandi alla fase stazionaria), di interazione idrofobica, di chelazione (IMAC) e covalente. Esempi di strategie di purificazione di proteine.

Prof Viola € 0,06

Tecniche elettroforetiche: principi generali: concetto di mobilità elettroforetica e relazione tra mobilità, carica, campo elettrico applicato, dimensioni. Relazione tra punto isoelettrico e mobilità delle proteine. Elettroforesi su strisce di acetato di cellulosa (esempio: separazione di siero proteine e descrizione delle principali frazioni proteiche del siero); elettroforesi su gelo di poliacrilammide (SDS-PAGE, elettroforesi su gelo con gradiente di reticolazione). Determinazione del peso molecolare di proteine in elettroforesi. Isoelettrofocalizzazione. Elettroforesi bidimensionale (applicazioni allo studio del proteoma). Elettroforesi di acidi nucleici. Elettroforesi capillare.
Tecniche di trasferimento di macromolecole dai geli (Southern, Northern, Western Blot) con esempi di applicazioni diagnostiche.

Metodiche di analisi della struttura delle proteine : struttura primaria e degradazione di Edman, determinazione di peso molecolare e sequenza con spettrometria di massa, metodiche utilizzate per la determinazione della struttura secondaria e terziaria (dicroismo circolare, cristallografia con raggi X, NMR). Proteomica e proteoma.

Tecniche di biologia molecolare: sequenziamento del DNA con il metodo enzimatico di Sanger. Amplificazione del DNA mediante PCR. PCR quantitativa e "real time" PCR. Utilizzo di banche dati per l'analisi e l'allineamento di sequenze. Enzimi di restrizione e mappe di restrizione. Analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione, sonde molecolari e diagnostica molecolare. Clonazione del DNA: taglio con enzimi di restrizione, plasmidi ed altri vettori per la clonazione, selezione cellule trasformate, biblioteche genomiche e di cDNA. Espressione di proteine in procarioti ed eucarioti. Mutagenesi sitospecifica. Microarray di DNA.

Saggi immunologici. Nozioni su antigene e anticorpo, anticorpi monoclonali. Sistemi di dosamento immunologico basati sulla marcatura di antigeni od anticorpi con isotopi radioattivi (RIA) e con enzimi (ELISA). Saggi di immunoprecipitazione; immunodiffusione semplice e radiale, immunoelettroforesi, rocket elettroforesi.

Traccianti radioattivi. Nozioni sull'uso dei principali traccianti radioattivi utilizzati nel laboratorio biochimico e biochimico-clinico. Tipi di radiazioni; legge del decadimento radioattivo, tempo di dimezzamento. Unità di misura della radioattività. Strumentazione: contatori di Geiger-Mueller, contatori a scintillazione (contatore a scintillatore solido e liquido), autoradiografia.

Testi consigliati

K.Wilson, K.H.Goulding – Biochimica Applicata – Raffaello Cortina Ed. Milano (1989).

Modalità di esame: esame orale.

PROBLEMI CHE SI DEBBONO AFFRONTARE PRIMA DI INIZIARE UNO STUDIO BIOCHIMICO: 2

A) FONTE DEL MATERIALE
- ANIMALE
- VEGETALE — eventualmente organismi - transgenici
- BATTERIO o FUNGO
  - CEPPO SELVATICO
  - CEPPO MUTATO O RICOMBINANTE

"IN VIVO" oppure "IN VITRO"?

→ RICERCA BIBLIOGRAFICA

B) METODICA DI OMOGENIZZAZIONE

(eventuale purificazione)

→ SCREENING PRELIMINARE DI VARIE METODICHE

C) METODO ANALITICO

(identificazione quantitativa e/o funzionale)

→ MESSA A PUNTO DI UNA METODICA ANALITICA

D) SCELTA DI CONDIZIONI OPERATIVE OTTIMALI

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 6 di 576

1 marzo 2004

3

BIOCHIMICA APPLICATA

⇒ Il PROGRAMMA in generale è costituito dai seguenti punti:

- Preparazione e manipolazione di campioni biologici
- Elettroforesi
- Biologia molecolare: DNA (sequenza, clonazione, ...); PROTEINE
- Metodi cromatografici (scambio ionico, affinità, ...)
- Dosamento di proteine, attività enzimatiche, immunologici,
- Metodiche genomiche e proteomiche

⇒ TESTI

WILSON, WALKER "Metodologia biochimica" ed. CORTINA (la vecchia edizione si intitola "biochimica applicata", ma NON va bene perché è troppo vecchia).

⇒ ESAME: ORALE

PREPARAZIONE E MANIPOLAZIONE DI CAMPIONI BIOLOGICI

Prima di cominciare uno STUDIO BIOCHIMICO su un campione biologico è necessario affrontare alcuni problemi fondamentali:

(→ vd. LUCIDO n° 1)

(A) FONTE DEL MATERIALE

È necessario determinare da dove estrarre l'oggetto del nostro studio.
Quindi innanzi tutto si procede con una ricerca bibliografica che può essere effettuata sia in biblioteca che con il computer.
La fonte del materiale può essere di diversa natura:

→ ANIMALE
→ VEGETALE
→ BATTERIO o FUNGO

In genere questi ultimi sono più semplici da studiare perché sono unicellulari; a loro volta, si suddividono in SELVATICI e MUTATI o RICOMBINANTI (il cui DNA, cioè, è stato combinato con il DNA di un altro organismo).
Al giorno d'oggi, quando si parla di fonte del materiale, bisogna tener presente anche gli ORGANISMI TRANSGENICI.
La ricombinazione e la mutazione sono molto utilizzate in biochimica applicata perché è possibile avere grandi quantità di materiale di studio (spesso, infatti, accade di studiare una proteina prodotta naturalmente da un organismo soltanto in tracce; con la manipolazione genetica si può fare in modo che l'organismo ne produca in grandi quantità).
Al di là di come ognuno la pensa, poi, chiaramente parlando è possibile evitare qui sorta di discussione in quanto si lavora esclusivamente su batteri da laboratorio (Escherichia coli) mutati, che non sono in grado di sopravvivere fuori dall'ambiente di laboratorio.

L'utilizzo di questi batteri "trasformati" è, dunque, solamente un ennesimo strumento di studio e pericolosità nulla.

Tornando al discorso originale, è poi necessario stabilire se condurre lo studio IN VIVO o IN VITRO.

Quando si lavora in VIVO si utilizzano molto le colture di cellule di organismi complessi, come gli animali.

Queste sono cellule derivanti da un organismo, mantenute vive e fatte moltiplicare, conservando attività metaboliche e riproduttive proprie.

Le colture cellulari possono essere di svariati tipi di cellule, ma le più semplici sono quelle di condroblasti, cheratinociti ed epatociti.

Le altre sono più difficili da coltivare e quindi normalmente si utilizzano cellule tumorali proprio perché sono caratterizzate dall'elevata proliferazione.

In laboratorio, comunque, non si riesce a far moltiplicare all'infinito una coltura cellulare e dunque si congelano in AZOTO LIQUIDO nel gelo durano anche per anni.

Una volta ri-immesse in sostanze nutritizie e scongelate, riprendono tutte le loro attività.

Per quanto riguarda i batteri, invece, la conservazione avviene in GLICEROLO al 50% a −80°C (in realtà basta anche a −20°C, ma durano di meno).

Il problema della conservazione delle cellule è

estremamente importante, soprattutto per la standardizzazione e la confrontabilità dei vari studi effettuati sugli stessi tipi cellulari. È importante avere sempre la stessa fonte.

(B) METODICA DI OMOGENIZZAZIONE

È un passo importante perché serve a purificare ciò che interessa allo studio.
Infatti la maggior parte delle tecniche biochimiche sono volte alla purificazione dei componenti.

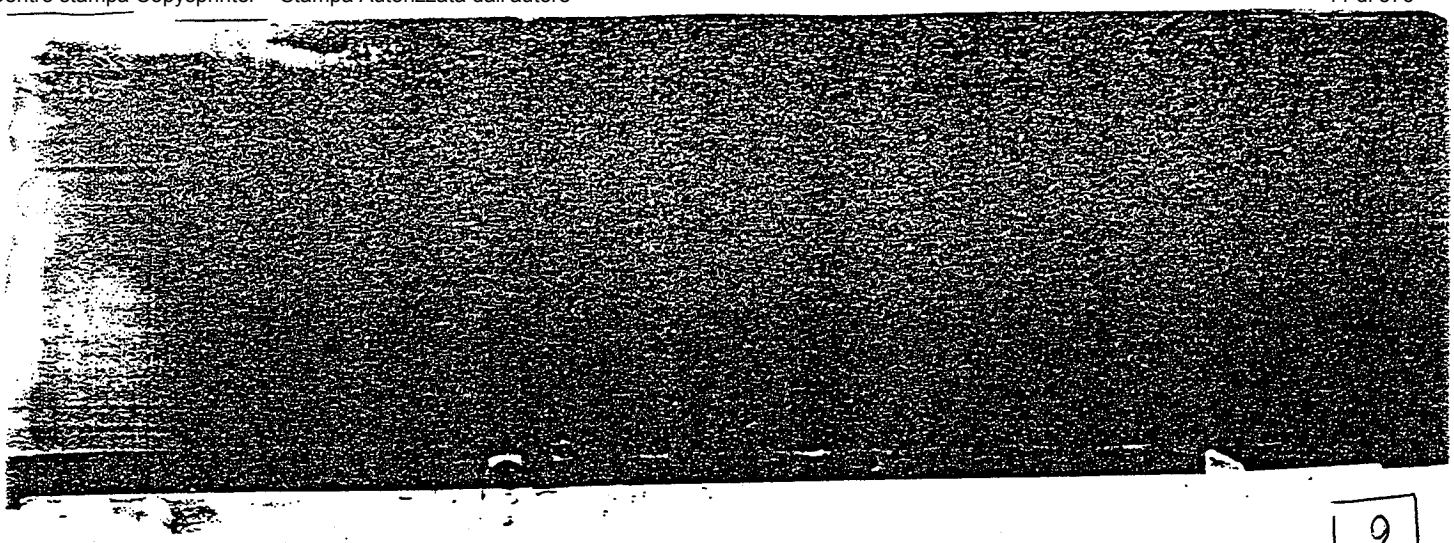
(C) METODI ANALITICI

Identificazione quantitativa e/o funzionale in base alla presenza o meno di determinati sali o ioni, al pH, alla temperatura, ecc...
Si sceglie il metodo analitico da utilizzare.

Caratteristiche e differenze delle cellule

⇒ CELLULE BATTERICHE (→ VEDI LUCIDO n° 2)

- le dimensioni sono molto variabili, ma l'ordine di grandezza è sui 0,5 μm.
- la cellula è molto semplice, il DNA è un solo CROMOSOMA CIRCOLARE piuttosto grosso immerso nel citoplasma, privo di nucleo.
- Gli organelli sono ridotti: RIBOSOMI e VESCICOLETTE sono presenti, ma mancano i mitocondri, i lisosomi, ... e non si hanno "compartimenti".
- Gli enzimi si trovano o nel CITOPLASMA o legati alla MEMBRANA.



2

5

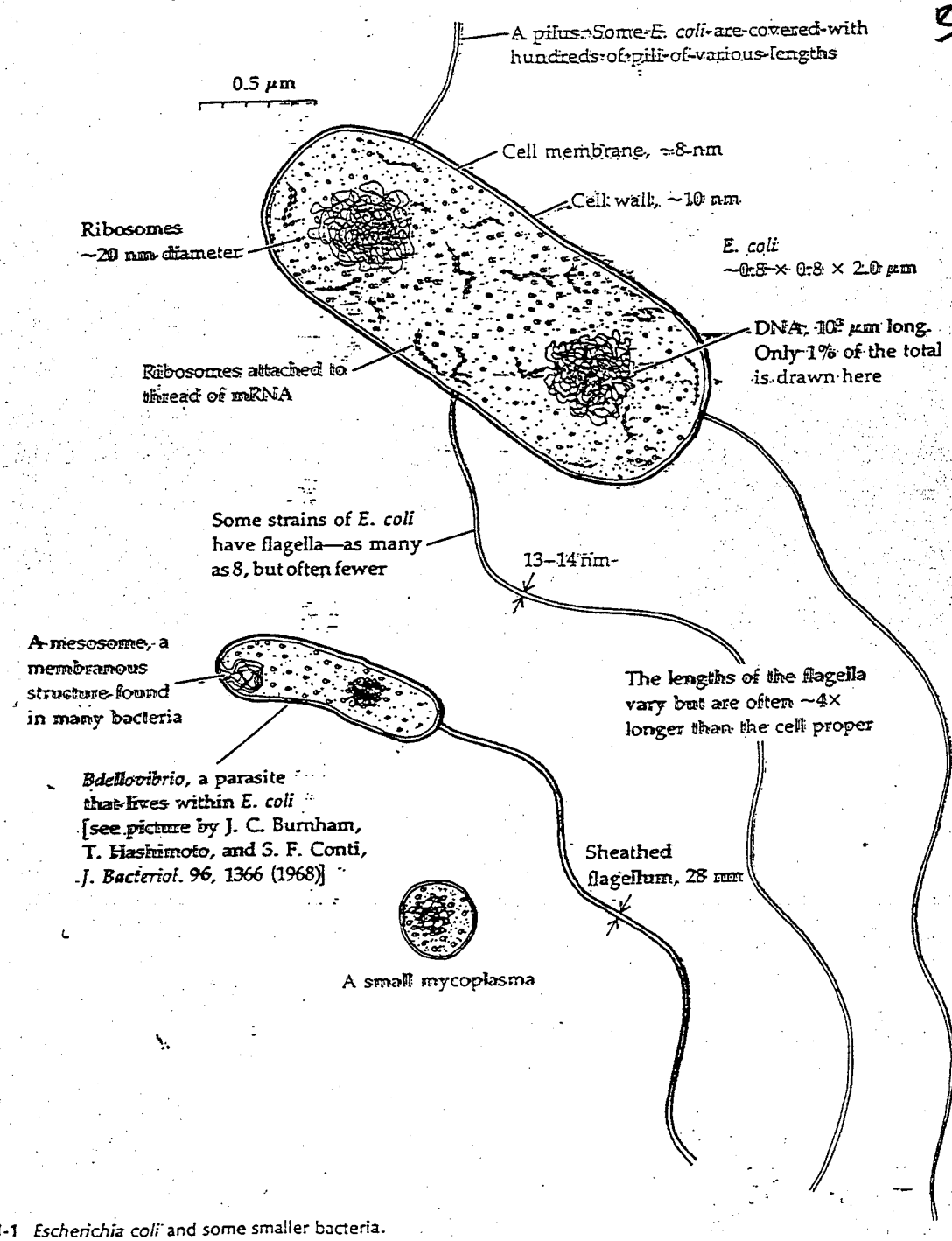
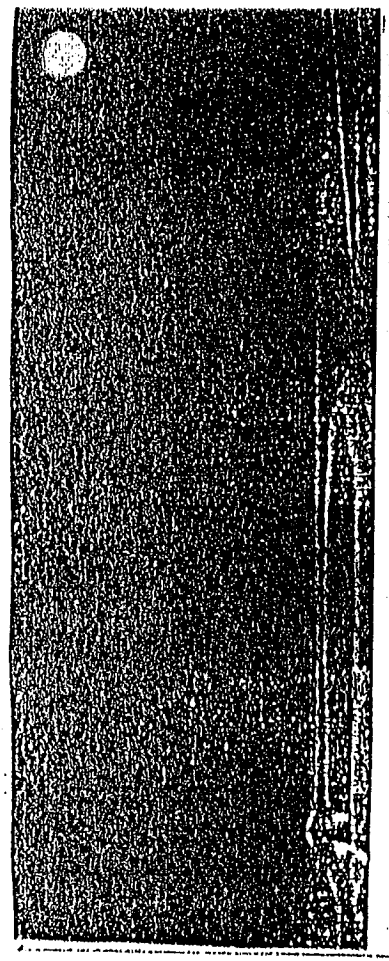


Fig. 1-1 *Escherichia coli* and some smaller bacteria.

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 12 di 576



CELLULA PROTETICA, non esiste una cell così perché ogni cell a seconda di dove si trova, sviluppa caratteristiche RETICOLO propie ENDOPLASMATICO del tessuto cui appartiene

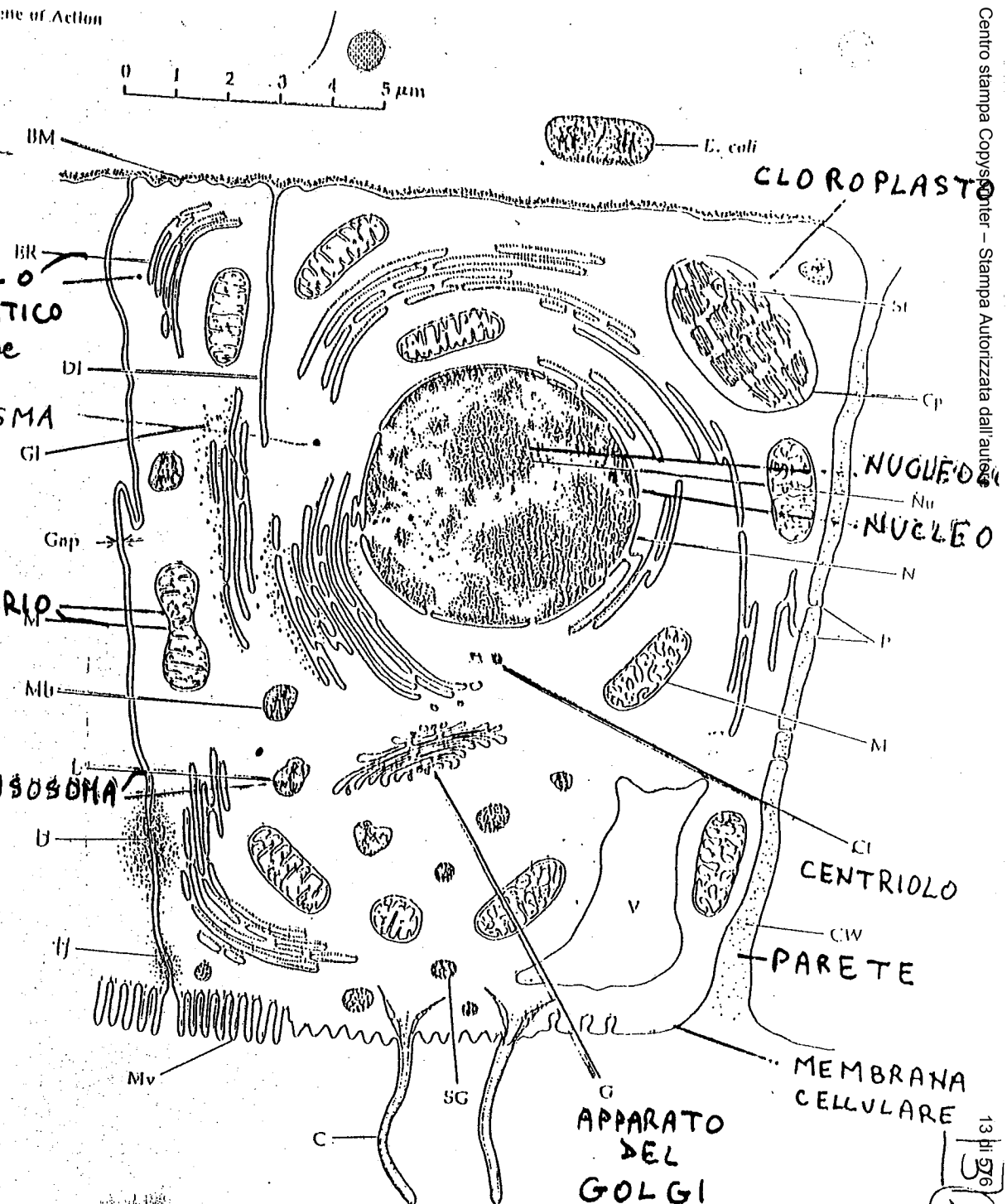


Fig. 1-3 The "average" eukaryotic cell. This composite drawing shows the principal organelles of both animal and plant cells approximately to the correct scale. Abbreviations: BM, basement membrane; ER, endoplasmic reticulum (rough, with ribosomes attached; smooth ER is depicted nearer the nucleus and on the right side of the cell); DI, deep indentation of plasma membrane; GI, glycogen granules; Gap, space ~10–20 nm thick between adjacent cells; M, mitochondrion; Mb, microbody; L, lysosome; D, desmosome; SG, secretion granule; TJ, tight junction; Mv, microvilli; C, cilium; G, Golgi apparatus; V, vacuole; CW, cell wall (of a plant); Ci, centrioles; P, plasmodesmata; N, nucleus; Nu, nucleolus; Cp, chloroplast; St, starch granule. Adapted from a drawing by Michael Metzler.

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 14 di 576

4

TAPPE DI UN'ANALISI BIOCHIMICA :

1) OMOGENIZZAZIONE

2) FRAZIONAMENTO

3) ANALISI

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 16 di 576

Omogeneizzazione 2

B) METODI MODERATI O VIGOROSI

Metodo	Principio	Esempi di applicazione
Omogenizzatori a lame	Sminuzzamento,forze frizionali	Tessuto muscolare, tessuti animali fibrosi, tessuti vegetali
Macinatura in presenza di materiale abrasivo	Microrugosità del materiale abrasivo	Tessuti vegetali, batteri
Mulini a palle	Vibrazioni provocate dall'agitazione delle sfere di vetro	Sospensioni cellulari (anche di cellule batteriche)
French press e sistemi analoghi	Compressione e decompressione	Batteri, vegetali
Sonicazione	Cavitazione, onda d'urto	Batteri, funghi, sospensioni cellulari in genere

METODI DI OMOGENIZZAZIONE

A) METODI DELICATI

metodo	Principio	Esempi di applicazione
Lisi cellulare	osmosi	Eritrociti, cellule isolate
Digestione enzimatica	Lisi enzimatica della parete	Batteri, lieviti
Omogenizzatori a pistone	Forze frizionali	Tessuti animali non fibrosi

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore

18 di 576

- Caratteristica tipica delle cellule batteriche è la presenza della PARETE CELLULARE (tipica di batteri, vegetali e funghi).
  Si trova nella parte esterna della cellula e si differenzia dalla membrana cellulare perché quest'ultima è uguale per tutte le cellule, mentre la parete no.
  Inoltre è costituita da cellulosa ed ha quindi una struttura molto rigida che ha proprio la funzione di evitare lo scoppio della cellula: spesso, infatti, si trovano in soluzioni IPOTONICHE che, in assenza di parete, causerebbero l'ingresso di H_2O nella cellula per contrastare la Pressione osmotica.
  Essendo molto rigida, è anche difficile da rompere.

⇒ CELLULE EUCARIOTICHE (→ Volume n° 3)

- Le dimensioni anche in questo caso sono molto variabili, ma l'ordine di grandezza è sui 5 μm.
- Il NUCLEO è ciò che occupa più spazio nella cellula, è molto grosso e delimita il DNA, che non è dunque libero nel citoplasma come nei batteri.
  (Naturalmente si sta parlando di cellule in generale, ma ci sono poi le eccezioni, come ad es. i globuli rossi che, una volta maturi, risultano privi di nucleo).
- Sono poi presenti ORGANELLI VARI a seconda del tipo cellulare: cloroplasti (presenti solo nelle cellule vegetali, servono per la fotosintesi); mitocondri (dove sono presenti

tutti gli enzimi della respirazione, ma anche dei processi metabolici come il ciclo di Krebs); vescicole varie come lisosomi, perossisomi ecc. (dove ci sono enzimi che devono essere isolati altrimenti digerirebbero tutta la cellula: proteasi, lipasi, ...)

- Oltre alla membrana cellulare, c'è poi tutto un sistema di altre membrane che è il RETICOLO ENDOPLASMATICO che contiene molte proteine ed enzimi.

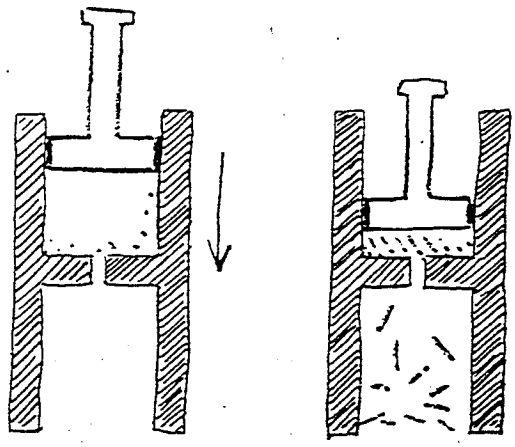
Infatti molto spesso si omogeneizza il RE perché molto spesso è oggetto di studio proprio qualcosa che si trova lì.

L'omogeneizzazione porta spesso alla rottura di questo sistema di membrane che ricomponendosi formano delle vescicole chiudendosi su loro stesse dette MICROSOMI (quindi la cellula normale NON li ha, sono il risultato della rottura del RE.

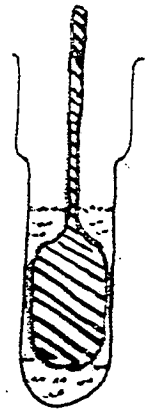
- Ci sono poi ancora i RIBOSOMI ed infine
- la MEMBRANA

Omogeneizzazione 3

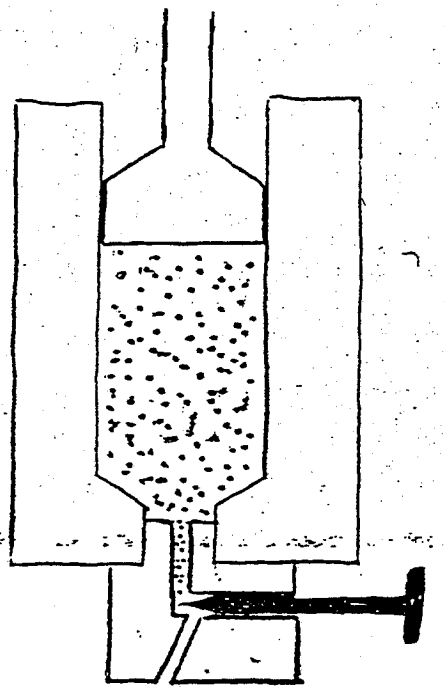
7



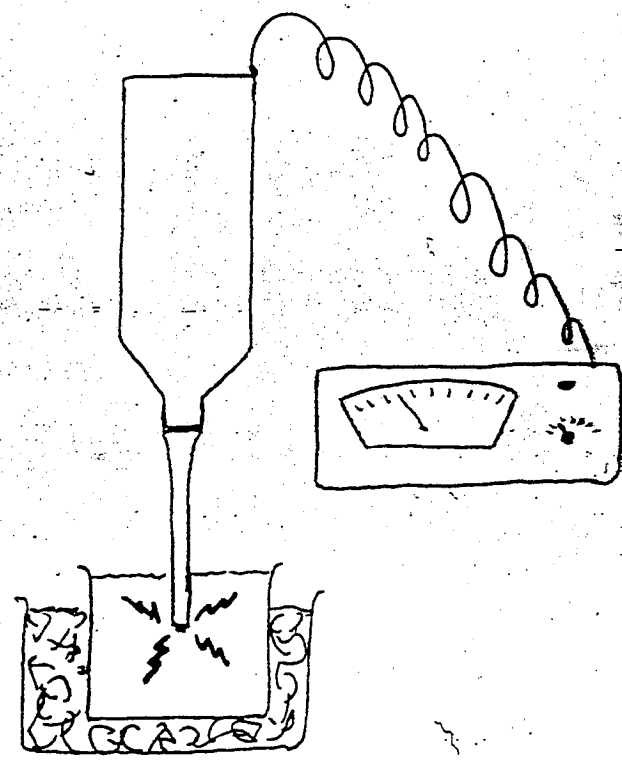
X- PRESS



POTTER



FRENCH-PRESS



SONICATORE

Prof VICCA II PARTE BIOCHIM. APPLIC. CTF € 0.59

Frazionamento cellulare e isolamento di organelli

Il frazionamento e la separazione di organelli da un omogenato di cellule mediante centrifugazione differenziale è descritto nel Capitolo 23. Organelli particolari si possono ottenere mediante una scelta appropriata del tessuto di partenza e del metodo di omogeneizzazione, come illustrato nella Tabella 17.2 per i tipi principali di organelli.

Tabella 17.2 Metodi di isolamento e frazionamento di vari organelli

Stadio	Nuclei	Mitocondri	Microsomi	Cloroplasti
Fonte	Timo, che ha poco citoplasma e dà una resa alta	Cuore di bue, dopo rimozione di grasso e di tessuto connettivo, quindi tagliato a cubetti e sminuzzato. Tenere a pH 7,5 con tampone TRIS	Fegato di ratto, conservato per una notte per ridurre il contenuto di glicogeno	Foglie di spinaci, private della costola e tagliate in strisce di 1 cm
Pretrattamento	Sciacquare con salina fisiologica tamponata. Sospendere nel mezzo di omogeneizzazione	Sospendere in un volume 2× di mezzo di omogeneizzazione. Spremere attraverso una garza fine	Sminuzzare finemente con forbici e lavare in un volume 2× di mezzo di omogeneizzazione	Sciacquare, quindi sospendere in un volume 3× di mezzo di omogeneizzazione
Mezzo di omogeneizzazione	Saccarosio 250 mmol L^{-1}; TRIS/HCl 10 mmol L^{-1}, pH 7,6; $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}; Triton X-100 0,2-0,5 v/v	Saccarosio 250 mmol L^{-1}; TRIS/HCl 10 mmol L^{-1}, pH 7,7 contenente 1 mmol L^{-1} di acido succinico e EDTA 0,2 mmol L^{-1}	Saccarosio 250 mmol L^{-1}; TRIS/HCl 50 mmol L^{-1}, pH 7,5; KCl 25 mmol L^{-1}; $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}	Saccarosio 400 mmol L^{-1}; HEPES/NaOH 25 mmol L^{-1}, pH 7,6; EDTA 2 mmol L^{-1}
Omogeneizzazione	Waring blender, bassa velocità, 3 min.	Portare a pH 7,8 usando TRIS base 2 mol L^{-1}; Waring blender, alta velocità, 15 s; controllate e aggiustate il pH a 7,8 e ripetete il passaggio di omogeneizzazione	Omogeneizzatore di vetro Potter-Elvejham con un pestello di Teflon – 3 × 5 min a 800 rpm	Waring blender o rotore-stativo preraffreddato
Filtrazione/ centrifugazione	Filtrare con garza. Centrifugare a 2000 g per 10 min; scartare il sopranatante. Ripetere l'omogeneizzazione, la filtrazione e la centrifugazione per migliorare la purezza degli organelli	Centrifugare a 1200 g per 20 min: filtrare il sopranatante con garza fine. Centrifugare a 26 000 g per 15 min. Rimuovere e scartare lo strato superiore (più leggero) del sedimento. Risospendere lo strato inferiore e omogeneizzare di nuovo (2 × 5 s). Centrifugare a 26 000 g per 15 min	Centrifugare a 680 g per 10 min. Scartare il sedimento; centrifugare a 10 000 g per 10 min. Scartare il sedimento; centrifugare a 100 000 g per 60 min. Tenere il sedimento. Risospendere in tampone, pH 8,0 e centrifugare di nuovo a 100 000 g per 60 min	Passare attraverso diversi strati di garza fine (indossare guanti); centrifugare a 500 g per 60 s; risospendere il sedimento in tampone pH 7,6; centrifugare di nuovo a 2500 g per 60 s. Il colore dà un'indicazione visiva del danno ai cloroplasti (ad esempio se verde)
Prima dell'uso	Risospendere in mezzo di omogeneizzazione senza Triton X-100	Risospendere il sedimento in tampone, pH 7,8 e usare immediatamente o conservare a –20 °C per una notte	Risospendere in soluzione tampone a pH 8,0	Risospendere il sedimento nel mezzo di incubazione appropriato, contenente saccarosio, ad esempio per studi di CO_2/O_2, p. 206

* Un approccio alternativo è l'uso di protoplasti vegetali (p. 78) come materiale di partenza, rilasciando i cloroplasti con lisi blanda (diluendo il mezzo con acqua).

OMOGENIZZAZIONE

La prima operazione pratica da svolgere è quella di rompere il tessuto, disgregare le cellule: questo viene detto processo di OMOGENIZZAZIONE. Lo scopo è di rompere la cellula per liberare gli organelli che vi sono contenuti senza danneggiarli.

I metodi di omogenizzazione si suddividono in:

- DELICATI
- MODERATI o VIGOROSI

Vediamoli nel dettaglio:

⇒ METODI DELICATI (→ vd. tix n°5)

Sono i più conservativi, cioè rompono meno

METODO	PRINCIPIO	ESEMPI DI APPLICAZIONE
Lisi cellulare	Osmosi	Eritrociti, cell. isolate
Digestione enzimatica	Lisi enzimatica della parete	Batteri, lieviti
Omogenizzazione a pistone	Forze frizionali	Tessuti animali non fibrosi

Essendo metodi delicati, si possono utilizzare per cellule prive di parete cellulare (oppure si effettua prima la lisi della parete).

① **LISI CELLULARE PER OSMOSI**:

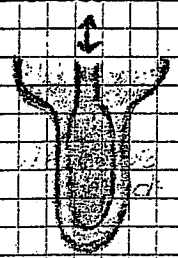
È il più delicato in assoluto.

Si immergono le cellule in H_2O che, essendo una soluzione ipotonica, entra all'interno

della cellula causandone lo scoppio.
Il materiale contenuto all'interno fuoriesce e resta solo l'involucro vuoto, ma intatto (perché si forma solo un fosfolipide, non è che si distrugge in pezzi!); questo viene comunemente chiamato GHOST (fantasma) perché sembra un fantasmino spettro.
Vengono usati per studiare il passaggio delle sostanze attraverso le membrane.

(2) La DIGESTIONE ENZIMATICA viene utilizzata soprattutto per batteri e lieviti: la loro parete viene digerita da enzimi specifici. La cellula priva di parete assume una forma sferica e proprio per questo motivo si dice che si ottengono gli SFEROPLASTI. Questi vengono poi trattati ad esempio con il metodo della lisi cellulare.

(3) Gli OMOGENIZZATORI A PISTONCINO vengono utilizzati per tessuti morbidi NON fibrosi come il fegato o il cervello.



(→ vd. LUC n°7)

POTTER

Si usano i cosiddetti POTTER, che sono dei cilindri di vetro con sospensione di liquido all'interno del quale si mette il tessuto.
L'operatore (o il motorino elettrico) fa andare su e giù il pistone ed in questo modo si schiaccia il tessuto contro le pareti. Questa operazione va fatta un numero di volte limitato (~10) e a freddo per non rovinare troppo le cellule (si sviluppa calore che denatura le proteine).
La delicatezza del metodo dipende dallo

spazio tra il pistone e le pareti del recipiente.

È importante ricordare che tutti questi metodi di omogeneizzazione sono molto utilizzati in laboratorio, dove si lavorano piccole quantità; le industrie usano metodologie nettamente diverse

⇒ METODI MODERATI o VIGOROSI (→ vd. lez. n° 6)

Sono meno conservativi rispetto agli altri.

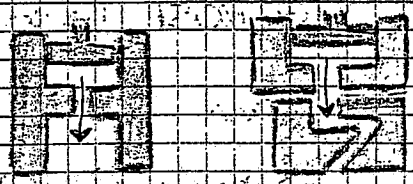
METODO	PRINCIPIO	ESEMPI DI APPLICAZIONE
Omogeneizzatori a lame	Sminuzzamento, forze frizionali	Tessuti muscolari, fibrosi e vegetali
Macinatura in presenza di materiale abrasivo	Microrugosità del materiale abrasivo	Tessuti vegetali e batterici
Mulini a palle	Vibrazioni provocate dall'agitazione delle sfere di vetro	Sospensioni cellulari (anche batteriche)
French press e sistemi analoghi	Compressione e decompressione	Tessuti batterici e vegetali
Sonicazione	Cavitazione, onda d'urto	Batteri, funghi e sospensioni cellulari in genere

① OMOGENIZZATORI A LAME:
Sono simili ad un frullatore con delle lame d'acciaio che ruotano ad alta velocità.

(2) MACINATURA CON MATERIALE ABRASIVO:
Il materiale abrasivo normalmente usato è la sabbia di quarzo

(3) MULINI A PALLE:
Sono microsfere di vetro vorticosamente agitate in un recipiente che originano vibrazioni

(4) FRENCH PRESS E ANALOGHI:
Il materiale congelato viene compresso e poi spinto attraverso un orifizio affinché venga sminuzzato e di conseguenza la pressione viene meno (→ il liquido m° f)



(apre la valvola)

(5) SONICAZIONE:
È costituita da una sonda che emette ultrasuoni nel materiale, le cui onde pressorie sono in grado di sviluppare una forza di rottura all'interno delle cellule. Produce un elevato sviluppo di calore e per questo è poco consigliato, tende a rovinare il materiale (→ sbriciolamento)

$$AH + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

$$K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$$

$$pK_a = -\log K_a$$

Risolvendo per $[H^+]$

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

$$-\log [H^+] = -\log K_a + \left(-\log \frac{[AH]}{[A^-]}\right)$$

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

Se $[A^-] = [AH]$ $\quad \log \frac{[A^-]}{[AH]} = 0$

quindi $\boxed{pH = pK_a}$

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 28 di 576

CAPACITÀ TAMPONANTE (β) =
quantità di base forte necessaria per fare variare il pH di 1 unità

10

determine the buffer capacity, ...
buffers, HEPES. It can be seen that the buffer capacity is grea

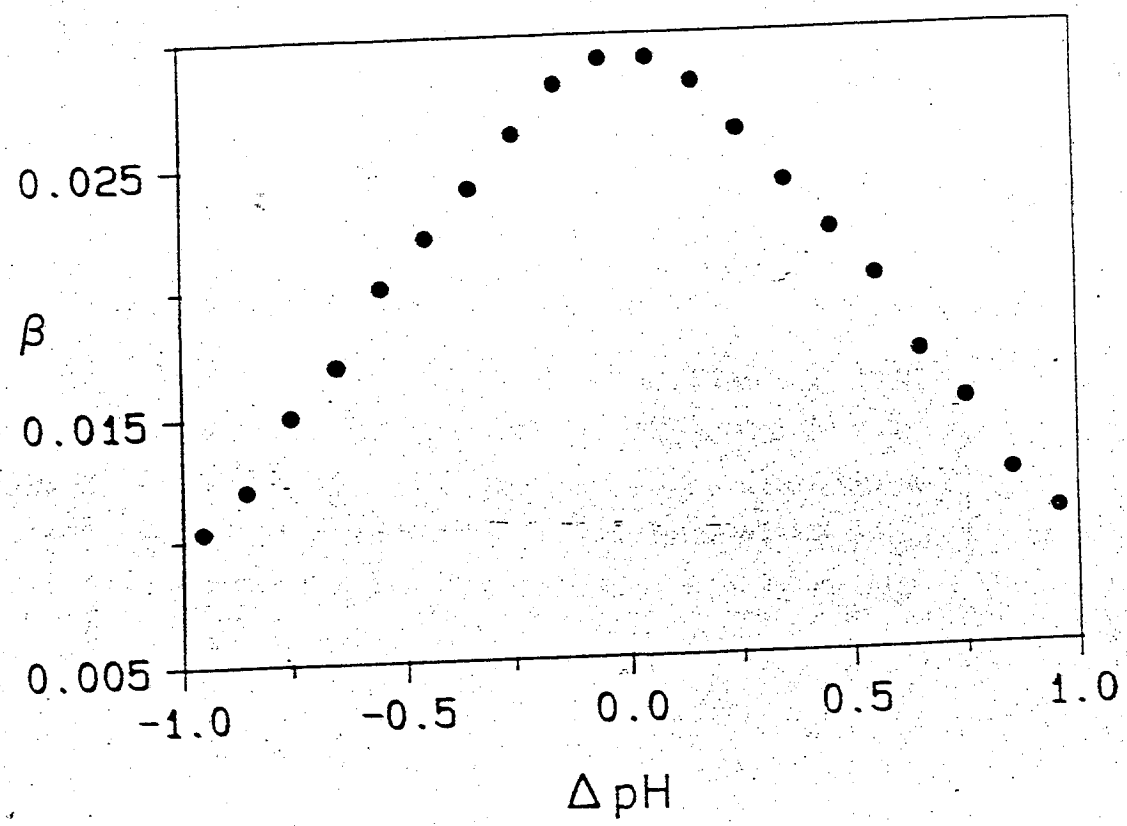


FIG. 1. Buffer capacity (β) versus ΔpH over the range ± 1 pH unit of the p
(0.05 *M*). Points calculated using Eq. (5), and data from D. D. Perrin and Dem
for pH and Metal Ion Control'' (Chapman and Hall, London, 1974).

$$\frac{d[B]}{dpH} = \beta \qquad \beta_{max} = 2{,}303 \cdot C/4 = 0{,}576\ C$$

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore 30 di 576

3 marzo 2004

TAMPONI

La presenza del tampone è importante per controllare l'ambiente; infatti i saggi biochimici in vitro si fanno sempre in tampone.
Nonostante sembri un problema di poco conto, in realtà non è così semplice scegliere il tampone adatto.

Definizione di
TAMPONE => Soluzione che si oppone alla variazione di pH (e dunque della concentrazione di H^+) in seguito all'aggiunta di acido o base

Normalmente lo si ottiene con un acido o una base debole ed il sale corrispondente.
Quando si parla di tamponi, inevitabilmente ci si riferisce all': (→ vd LUCIDO n° 9)

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

EQUAZIONE DI HANDERSON-HASSELBACH

In biochimica, però, l'incognita non è mai il pH perché noi sappiamo sempre a quale valore di pH vogliamo operare.
Per noi, l'incognita è sempre: $\frac{[A^-]}{[AH]}$
perché la concentrazione di AH (l'acido) che aggiungiamo la conosciamo, ma non sappiamo la concentrazione di A^- perché deriva anche dal sale.
Esistono delle tabelle dette "monografiche"

che forniscono già il valore del rapporto e sono estremamente complete.
Il problema è che se noi dobbiamo preparare un tampone 0,05M ma ho solo una tabella per un tampone 0,1M, non è sufficiente dividere tutti i valori forniti dalla tabella per 2. Il motivo è che cambia la FORZA IONICA. (Comunque se non bisogna preparlo fare i fiscali, normalmente si fa!)

I tamponi più utilizzati sono:

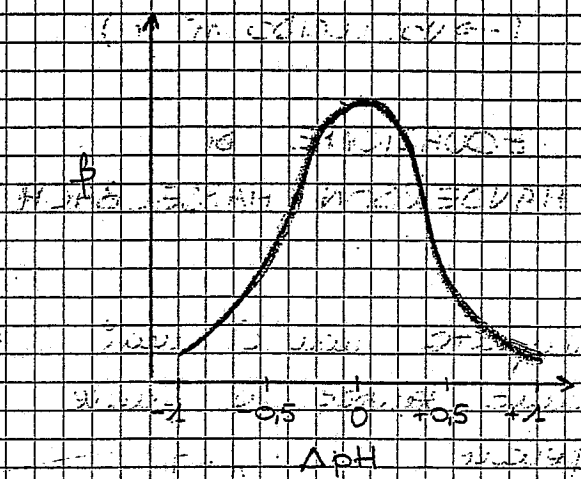
→ TAMPONE FOSFATO

→ TAMPONE TRIS

La scelta del tampone adatto si effettua anche sulla base della capacità tamponante (β).

Definizione di

CAPACITÀ TAMPONANTE (β) ⇒ Quantità di base forte necessaria per far variare il pH di una unità (→ ind. uc mi/lo)



La capacità tamponante non è uguale ad ogni valore di pH. Quindi la scelta del tampone adatto dipende anche dal pH a cui si opera. Infatti se lo studio biochimico comporta una variazione di pH di 3 unità, il tampone rappresentato nel grafico non è utilizzabile perché ha già una grossa variazione di β nell'intervallo ±1.

TAMPONE FOSFATO (→ vd. LUCIDO n° 11)

Quando si parla di tampone fosfato, si intende l'utilizzo di NaH_2PO_4 come forma acida e questo è proprio il motivo per cui si chiama così (desinenza "ato"): infatti non si usa l'H_3PO_4 (acido fosforico) perché ha una pK_a troppo basso.

$$H_2PO_4^{\ominus} \rightleftharpoons H^{\oplus} + HPO_4^{\ominus}$$

ha $pK_a \sim 7$ e può essere utile come tampone in un range $6 < pH < 8$

la forma basica sarà anch'essa un sale e per esempio può essere Na_2HPO_4

Quindi il tampone sarà costituito da:

$$NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$$

e ci si darà calcolare quale deve essere il rapporto fra i due per avere il pH che ci interessa

Dalla tabella, ad esempio, si vede che:

Per avere pH:	mL di NaH_2PO_4	mL di Na_2HPO_4
7,2	28,0	72,0
8	5,3	94,7

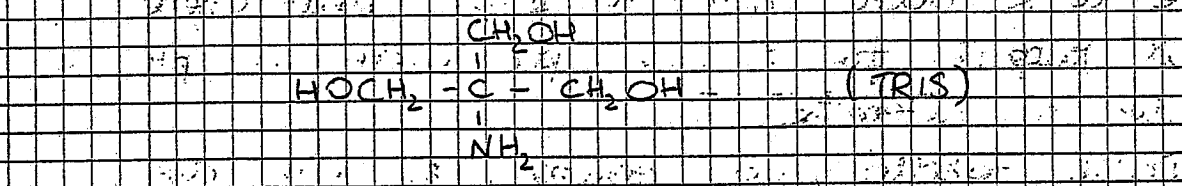
Come si può notare, la somma dei due componenti è sempre 100 mL perché è una tabella che consente di preparare un tampone fosfato 0,1 M

Se però noi vogliamo preparare una soluzione 0,01 M non è sufficiente miscelare 2,8 mL e 7,2 mL di componenti e poi portare a volume perché, come già detto in precedenza,

cambia la forza ionica.
Il modo migliore per preparare un tampone del genere resta il METODO DELLA TITOLAZIONE, anche se un po' più lungo.
Infatti, si prende la forma acida NaH_2PO_4 in quantità di 0,01 moli, si diluisce fino a poco meno di 1 litro e, con l'ausilio di un pH metro si aggiunge NaOH fino ad ottenere il pH desiderato. Dopodiché si porta a volume, sempre facendo attenzione a mantenere il pH.

Oltre a pH = 8 il tampone fosfato non tampona più molto bene, e quindi si usa il

TAMPONE TRIS (→ vd. UC n° 13)



2-ammino-2-idrossimetil propan-1,3-diolo

La funzione di tampone la espleta il gruppo amminico che si protona; si ha dunque un tampone basico.
Si può inoltre utilizzare in molti modi: ad esempio è possibile partire dal "TRIS base", che ha un pH piuttosto elevato (~10) e poi titolarlo con un acido forte come l'HCl, ottenendo così il tampone TRIS-HCl; in questo modo abbasso il pH al punto in cui mi serve.
Oltre all'HCl, molto usata è la GLICINA (un amminoacido), oppure si può

TAMPONE FOSFATO:

Si ottiene miscelando opportune quantità di fosfato monobasico e dibasico (sali sodici o potassici:

$$NaH_2PO_4 \qquad Na_2HPO_4$$
$$KH_2PO_4 \quad + \quad K_2HPO_4$$

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{--} \qquad HPO_4^{--} \overset{H^+}{\rightleftharpoons} H_2PO_4^-$$

$$pK_a^\circ = 7{,}2 \quad (25°C)$$

pK_a° per forza ionica 0,1 $= 6{,}89$ (25°C)

Intervallo utile per un efficace tamponamento:

pH 5,9 – 8

ESEMPIO: Fare un tampone fosfato 0,1 M a pH 7,5

applichiamo l'equazione di Henderson-Hasselbach

$$pH = 7{,}5 = 6{,}8 + 0{,}7 :$$

$$\log \frac{[BASE]}{[ACIDO]} = 0{,}7 \qquad \frac{[BASE]}{[ACIDO]} = 10^{0{,}7} = 5$$

12

poichè la molarità complessiva del fosfato deve essere 0,1 M

$$[H_2PO_4^-] + [HPO_4^{--}] = 0,1$$

Se chiamo (x) $[H_2PO_4^-]$,

$$[HPO_4^{--}] = 5x$$

$$5x + x = 0,1$$

$$6x = 0,1$$

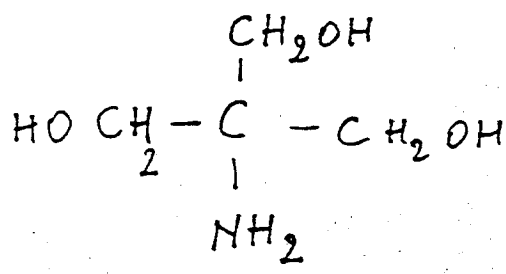
$$x = \frac{0,1}{6} = 0,0167 \text{ M}$$

$$[H_2PO_4^-] = 0,0167$$

$$[HPO_4^{--}] = 0,0167 \times 5 = 0,0835 \text{ M}$$

TAMPONE TRIS :

(2 - amino - 2 - idrossimetil propano - 1,3 - diolo)



$$RNH_2 \rightleftarrows RNH_3^+$$

pK_a (25°C) = 8,14

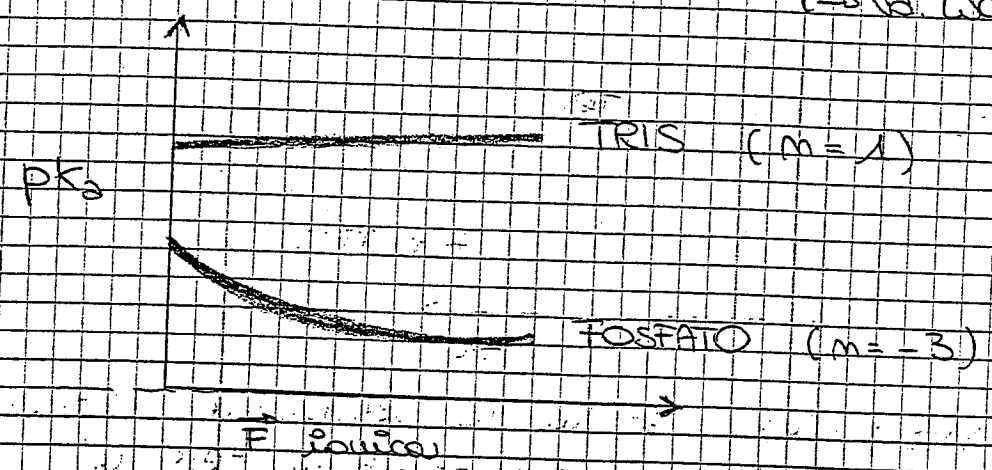
Intervallo utile per una efficace azione tamponan

pH 7,2 – 9

utilizzare il TRIS-CLORIDRATO, che ha un pH piuttosto acido.
Normalmente, comunque, si parte dal TRIS semplice.

Mettiamo a confronto i due:

(→ vd. lez. n° 14)



Come si può vedere dal grafico, la forza ionica del tampone TRIS varia decisamente meno al variare della pKa rispetto a quella del tampone fosfato.
Il termine n è

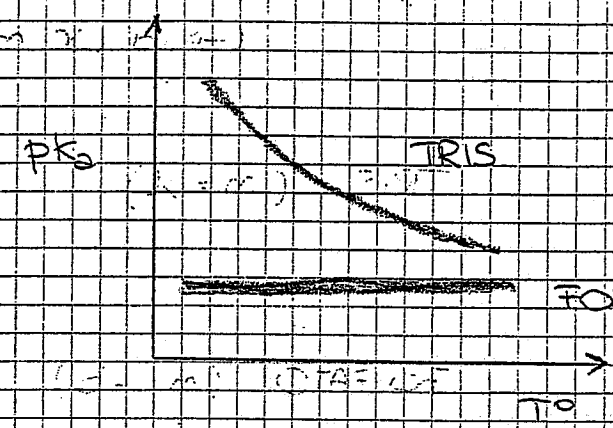
$$n = 2z - 1$$

carica della FORZA ACIDA

Se $-1 < n < +1$ significa che la forza IONICA influisce poco sulla pK_a mentre se è elevato influisce molto.
Le tabelle che indicano i materiali utili per la preparazione di un tampone, infatti, riportano sempre il valore di n proprio perché è un parametro molto importante ed è altrettanto importante che sia ± 1
Unica eccezione è proprio il tampone FOSFATO che, pur avendo $n = -3$, è molto utilizzato

perché estremamente versatile.

Un altro parametro che influenza notevolmente la pK_a è la temperatura, come si può vedere dal grafico: (→ vd LUCIDO n° 15)



In questo caso, si ha la situazione esattamente opposta a prima: sul tampone TRIS la temperatura influisce moltissimo, sul tampone fosfato no.
Anche questo è un parametro molto importante perché normalmente il tampone si prepara a T° ambiente ma poi tutti gli esperimenti vengono condotti in ghiaccio: quindi usando il TRIS varierà molto la pK_a e di conseguenza varierà tanto anche il pH.

Un'altra caratteristica estremamente importante nella scelta del tampone è l'influenza che esso ha sul materiale in esame.
Ad esempio, il fosfato stabilizza molti enzimi e questo è da considerarsi positivo.

Infine, il tampone scelto non deve assorbire tanto all'UV (se si ha intenzione di effettuare questo genere di analisi) perché altrimenti costituisce un interferenza.

14 B

$$pK_a = pK_a^0 + \frac{0{,}51 \cdot n \cdot I^{\frac{1}{2}}}{1 + 1{,}6\, I^{\frac{1}{2}}}$$

$$I = \text{forza ionica} = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

c_i = concentrazione di una specie ionica
z_i = carica " " " "

8.1 Control of pH: Buffers

Table 8.1. Effect of Ionic Strength of pK_a of Some Characteristic Buffers[a]

$n = 2z - 1$

(acido)	n	pK_a^0	pK_a, $I = 0.01$	pK_a, $I = 0.1$	Concentration of buffering species at the pK_a, if $I = 0.1$, entirely due to buffer
Acetate	−1	4.76	4.72	4.66	0.2
Phosphate	−3	7.20	7.08	6.89	0.05
Citrate	−5	6.40	6.29	5.88	0.022
Tris	+1	8.06	8.10	8.16	0.2

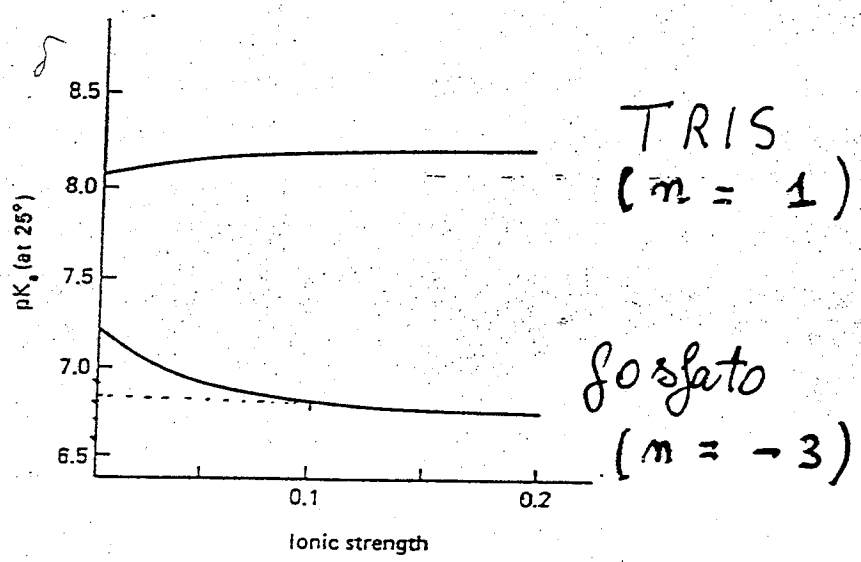


Figure 8.2. Variation of pK_a with ionic strength for phosphate (lower line) and Tris (upper line). The effect on phosphate is greater by a factor of 3 (the ratio of the n values), and is in the opposite direction (since n is negative for phosphate and positive for Tris).

+ alto il valore di n, più marcato l'effetto della forza ionica su pKa.
Per i tamponi cationici, come TRIS, pKa aumenta con l'aumento di forza ionica

FORZA IONICA $= I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ 15

c_i = concentrazione di una specie ionica

z = carica " " "

$$pK_a = pK_a^0 + \frac{0{,}51 \cdot n \cdot I^{1/2}}{1 + 1{,}6\, I^{1/2}}$$

$n = 2z - 1$

Table 8.2. Thermodynamic Values for a Range of Buffers[a]

	n	pK_a^0	dpK_a/dT (at 25°C)	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔG^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 (J deg^{-1} mol^{-1})
Phosphoric acid pK_1	−1	2.15	+0.004	−6.8	12.3	−64
Acetic acid	−1	4.76	−0.0002	0.3	27.3	−90
Citric acid pK_3	−5	6.40	0	0	36.6	−123
Imidazole	+1	6.95	−0.020	34.0	39.9	−19
Phosphoric acid pK_2	−3	7.20	−0.0028	4.8	41.3	−122
Tes	−1	7.50	−0.020	34.0	43.0	−30
Tris	+1	8.06	−0.028	48.0	46.2	6
Ammonia	+1	9.25	−0.031	53.0	53.1	0
Carbonate	−3	10.33	−0.009	15.4	59.3	−147

[a] The values of ΔH^0, ΔG^0, ΔS^0 were calculated from the pK_a and dpK_a/dT, which were obtained from other sources (75, 76).

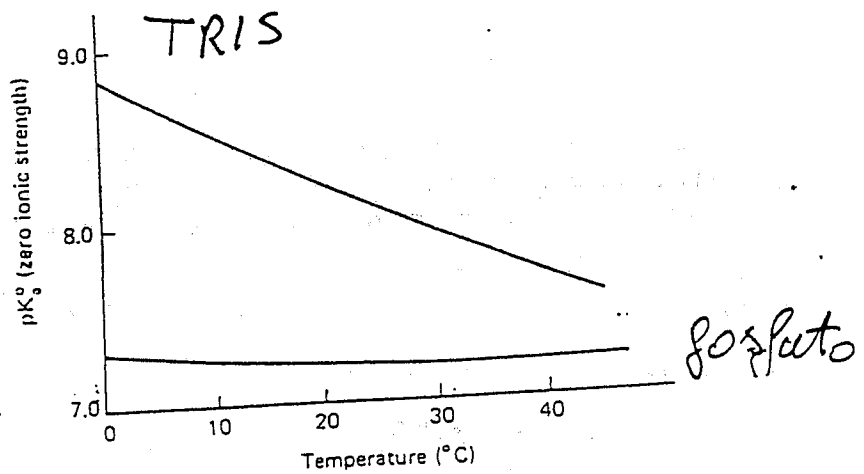


Figure 8.1. Variation of pK_a with temperature for phosphate (lower line) and Tris (upper line). Note that temperature has only a small effect on phosphate, but a large effect on Tris.

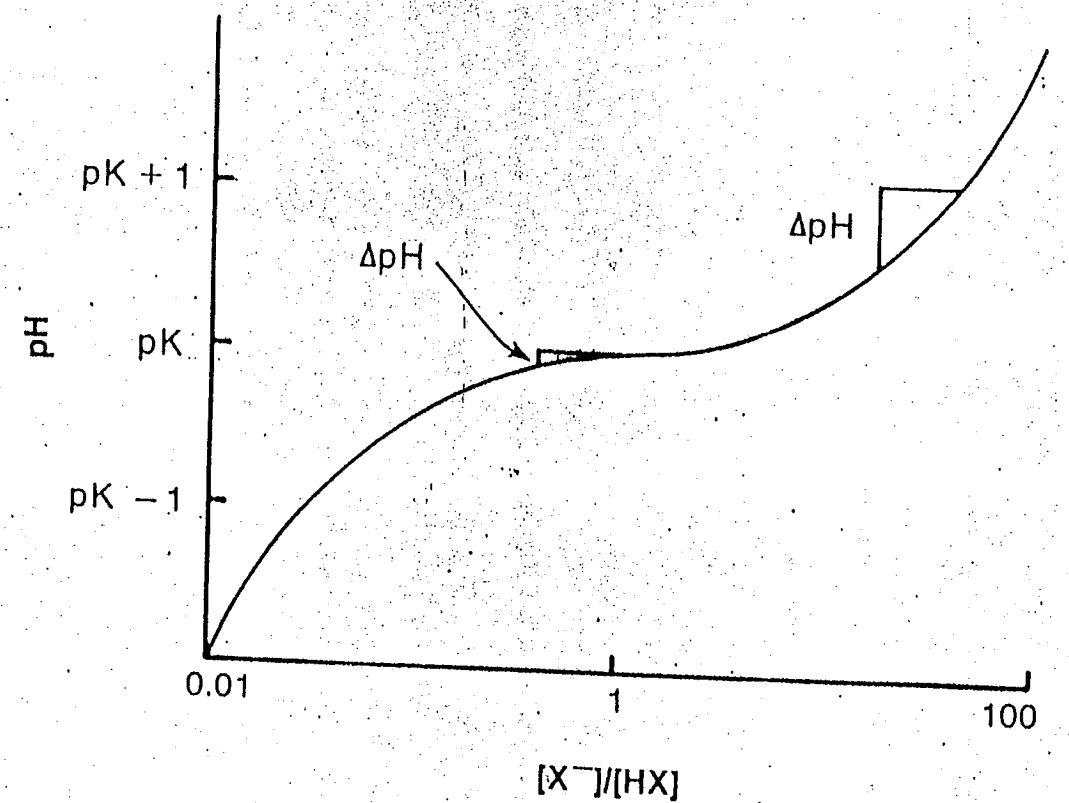


Figura 4-1. Variazione del pH in funzione del rapporto $[X^-]/[HX]$. Si osservi che, quando il rapporto è uguale a 1, p*K* è numericamente uguale a pH. Questa curva è descritta dall'equazione di Henderson-Hasselbalch.

Centro stampa Copysprinter – Stampa Autorizzata dall'autore
43 di 576

Tabella 1.2 pK_a di acidi e basi comunemente usati per la pre

acido o base	pK_a (a 25°C)
Acido acetico	4,75
Acido barbiturico	3,98
Acido carbonico	6,10; 10,22
Acido citrico	3,10; 4,76; 5,40
Glicilglicina	3,06; 8,13
HEPES[1]	7,50
Acido fosforico	1,96; 6,70; 12,3
PIPES[2]	6,80
Acido ftalico	2,90; 5,51
Acido succinico	4,18; 5,56
Acido tartarico	2,96; 4,16
Tris[3]	8,14

[1] HEPES = acido N-2-idrossietilpiperazina-N'-2-etansulfonico
[2] PIPES = acido piperazina-N-N'-bis (2-etansulfonico)
[3] Tris = 2-amino-2-idrossimetilpropano-1,3-diolo

TRIS

soluzioni fisiologiche possono essere classificate a se
gate per brevi tempi d'incubazione o per il manteni
In ogni caso, tuttavia, è necessario che il medium s
(cioè possieda la stessa pressione osmotica) e sia
garantirne l'integrità metabolica.

18

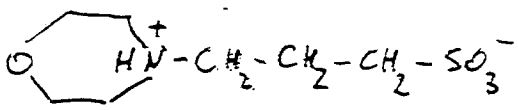
MOPS 

Table 8.3. A Selection of Useful Buffers

Name	n	pK_a^0 (25°C)	Comments
Lactic acid	−1	3.86	
Acetic acid	−1	4.76	
Pivalic acid (trimethylacetic acid)	−1	5.03	Not very soluble; unpleasant odor
Pyridine	+1	5.23	Volatile, poisonous
Picolinic acid	−1[a]	5.4	Strong UV absorption
Succinic acid	−3	5.64	
Histidine	+1[a]	6.0	Complexes Me^{2+} strongly
N-Morpholinoethane sulfonic acid (Mes)	−1[a]	6.15	
Bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris-(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris)	+1	6.5	
N-(2-acetamido)-2-aminoethane sulfonic acid (Aces)	−1[a]	6.9	
Imidazole	+1	6.95	Complexes Me^{2+}
Phosphate	−3	7.20	Stabilizes many enzymes
N-Morpholinopropane sulfonic acid (Mops)	−1[a]	7.2	
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid (Tes)	−1[a]	7.5	
Triethanolamine	+1	7.75	
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	+1	8.06	
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-glycine (Tricine)	−1[a]	8.15	
Tris(hydroxymethyl)aminopropane sulfonic acid (Taps)	−1[a]	8.4	
2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	+1	8.8	
Diethanolamine	+1	8.9	
Taurine	−1[a]	9.1	
Ammonia	+1	9.25	Volatile
Boric acid	−1	9.23	Complexes with many carbohydrates
Ethanolamine	+1	9.5	
Glycine	−1[a]	9.8	
1-Aminopropan-3-ol	+1	9.95	
Carbonate	−3	10.3	

[a] Indicates zwitterionic buffer in either acidic or basic form.

would also be present. It might even be that triethanolamine was adjusted with sulfuric acid, in which case the doubly charged sulfate ions contribute more to the ionic strength, in this case $I = 0.018$. Authors rarely give full details of how

19

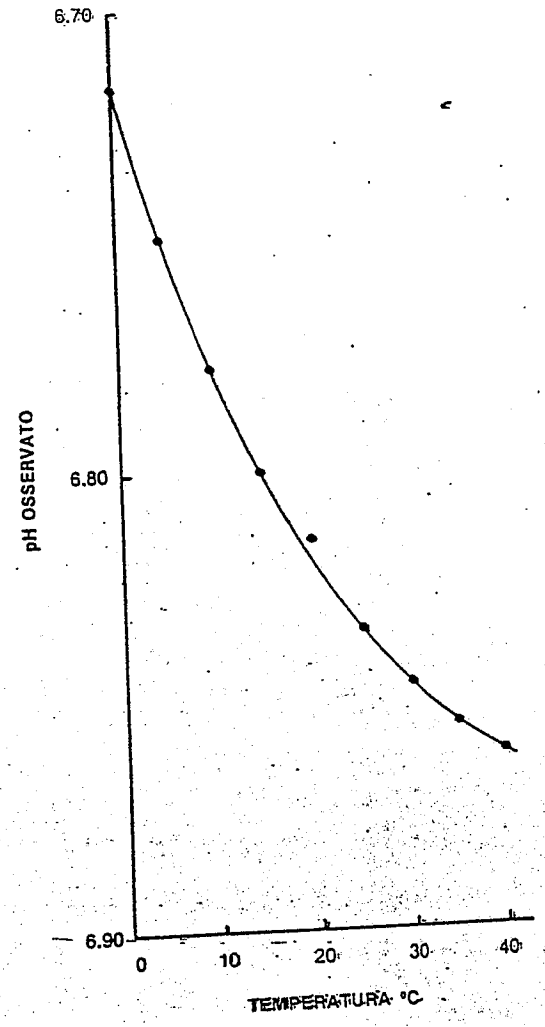


Figura 4-3. Effetto della temperatura sul pH del tampone fosfato di sodio 25 m

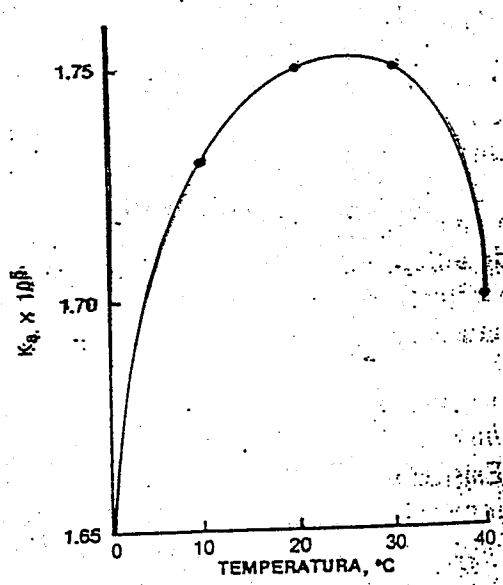
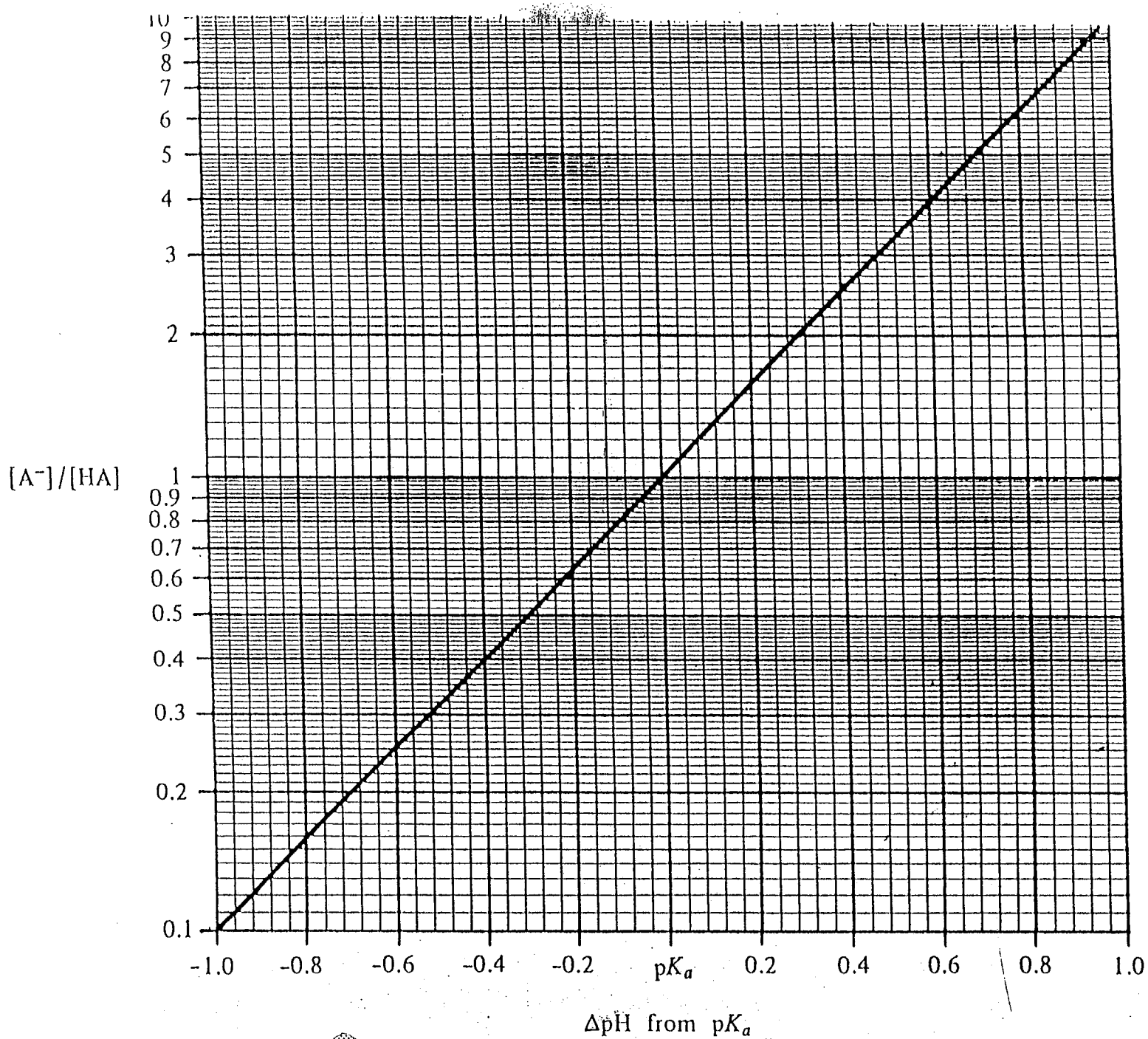


Figura 4-2. Effetto della temperatura sulla costante di dissociazione acida, K_a, l'acido acetico.



21

6. *Cacodylate Buffer*[14]

Stock Solutions

A: 0.2 *M* solution of sodium cacodylate (42.8 g of $Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3H_2O$ in 1000 ml)
B: 0.2 *M* NaOH

50 ml of A + *x* ml of B, diluted to a total of 200 ml:

x	pH	*x*	pH
2.7	7.4	29.6	6.0
4.2	7.2	34.8	5.8
6.3	7.0	39.2	5.6
9.3	6.8	43.0	5.4
13.3	6.6	45.0	5.2
18.3	6.4	47.0	5.0
13.8	6.2		

7. *Phosphate Buffer*[9] 0,1 M

Stock Solutions

A: 0.2 *M* solution of monobasic sodium phosphate (27.8 g in 1000 ml)
B: 0.2 *M* solution of dibasic sodium phosphate (53.65 g of $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ or 71.7 g of $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ in 1000 ml)

x ml of A + *y* ml of B, diluted to a total of 200 ml:

x	*y*	pH	*x*	*y*	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

[14] M. Plonnet, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 30, 129 (1949).

volume (l) · M = numero di moli

numero di moli / volume (l) = M

8. *Barbital Buffer*[15]

Stock Solutions

A: 0.2 *M* solution of sodiu
B: 0.2 *M* HCl

50 ml of A + *x* ml of B, di

Solutions more concentrate especially in the cold.

9. *Tris(hydroxymethyl)amin*

Stock Solutions

A: 0.2 *M* solution of tris(h ml)
B: 0.2 *M* HCl

50 ml of A + *x* ml of B, (

[9] L. Michaelis, *J. Biol. Chem.* 87
[15] O. Hayaishi, this series, Vol. 1.

21b

Il FRAZIONAMENTO consiste nella separazione dei componenti l'omogenato in base alle loro proprietà fisiche, come
dimensioni, forma, densità, idrofobicità, carica.

Una delle tecniche più importanti ed usate in biochimica, biologia cellulare e biologia molecolare per il frazionamento di un omogenato è la **CENTRIFUGAZIONE.**

Viene usata principalmente per separare materiale particolato dal materiale solubile, tipicamente per separare componenti solubili ed estraibili, come enzimi e proteine dai componenti insolubili della cellula: pareti cellulari, fibre, cellule integre, organelli cellulari.
La centrifugazione consiste nell' esporre una sospensione di materiale , contenuta in una provetta (tubo da centrifuga), ad una forza di gravità relativa elevata: questo si può ottenere in una centrifuga facendo ruotare il tubo da centrifuga ad alta velocità.