* Allestimento del laboratorio

Al termine della lezione lo studente sarà in grado di:

- **Descrivere l'organizzazione di un laboratorio di biochimica** (aree di lavoro, flussi di materiali, percorsi pulito/sporco).
- **Riconoscere la vetreria e la plasticheria di base e indicarne l'uso corretto** (becher, matracci, provette, pipette, micropipette, cilindri, ecc.).
- **Elencare e spiegare la funzione della strumentazione di base** (pHmetro, bilance, centrifughe, agitatori, bagnetto termostatato, sistemi di refrigerazione, spettrofotometro, ecc.).
- **Descrivere la dotazione di un laboratorio per colture cellulari** (cappa a flusso laminare, incubatori CO_2, microscopio rovesciato, ecc.) e i requisiti ambientali fondamentali.
- **Distinguere i diversi livelli di biosicurezza** (BSL1–4) e le principali misure di contenimento nei laboratori biomolecolari.
- **Applicare le principali norme di sicurezza e comportamento in laboratorio** (DPI, segnaletica, gestione rifiuti, incidenti) in linea con le linee guida

- VETRERIA E PLASTICHERIA DI LABORATORIO

- STRUMENTAZIONE DI BASE:

pHmetro;
BILANCE;
SISTEMI DI REFRIGERAZIONE (per il mantenimento di colture batteriche e per la conservazione di molti reagenti deperibili come sieri, terreni di coltura e tamponi; frigotermostatati, conservazione in azoto liquido a – 180° C);
CAPPE CHIMICHE;
ARMADI DI SICUREZZA;
CENTRIFUGHE;
AGITATORI E PIASTRE RISCALDANTI;
STUFE;
MICROPIPETTE DI PRECISIONE;
SPETTROFOTOMETRO

Tabella 3.1 **Intervalli di volumi delle principali micropipette di precisione.**

Micropipetta	Intervallo di misura (µL)
P2	0,1-2,0
P10	0,5-10
P20	2-20
P100	10-100
P200	50-200
P1000	200-1000
P5000	1000-5000

M. Maccarrone, *Metodologie biochimiche e biomolecolari*, Zanichelli editore 2019

ZANICHELLI

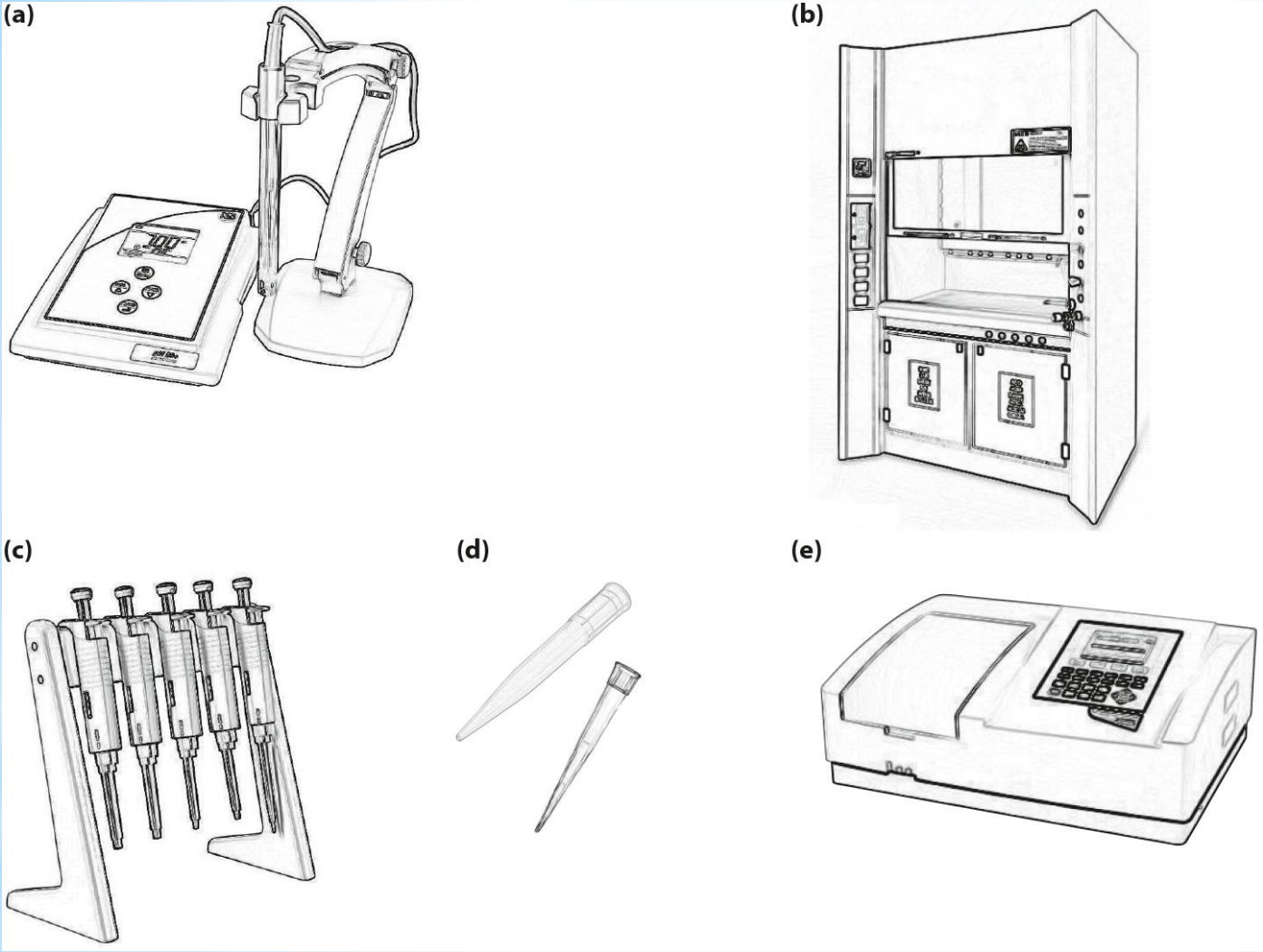


Figura 3.1
Alcune strumentazioni di base: (**a**) pHmetro; (**b**) cappa chimica; (**c**) micropipette di precisione; (**d**) puntali; (**e**) spettrofotometro.

LABORATORIO PER LE COLTURE CELLULARI

- CAPPA A FLUSSO LAMINARE per la manipolazione di microorganismi pericolosi ed impedire la contaminazione dell'ambiente circostante, per proteggere il materiale biologico dalle contaminazioni ambientali e chimiche. Con luce UV per la sterilità delle superfici del piano di lavoro;
- Esistono di due tipi: A FLUSSO LAMINARE VERTICALE E ORIZZONTALE. Le cappe a flusso laminare verticale si dividono in tre classi secondo la manipolazioni di microrganismi riportati in tabella

Tabella 3.2 Classificazione dei microrganismi infettivi per gruppo di rischio.

Gruppo di rischio	Rischio	Misure disponibili
1	Nessun rischio, o basso rischio individuale e collettivo	Nessuna necessaria
2	Moderato rischio individuale, basso rischio collettivo	Sono (di norma) disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
3	Elevato rischio individuale, basso rischio collettivo	Sono (di norma) disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
4	Elevato rischio individuale e collettivo	Non sono disponibili (di norma) efficaci misure profilattiche o terapeutiche

ZANICHELLI

- INCUBATORI: garantiscono le condizioni ambientali ottimali per le colture cellulari attraverso il controllo di temperatura, concentrazione di CO_2 e umidità;
- AUTOCLAVE: caldaia munita di un coperchio a chiusura ermetica, di un termometro, di un manometro, di rubinetti e di valvole di sicurezza. Utilizzato per sterilizzare materiale (terreni di coltura, vetreria, soluzioni ecc) usando vapore acqueo saturo sotto pressione a T maggiori di 100 ° C (generalmente a 120- 121 ° C per 15-20 minuti);
- MICROSCOPI: ottici o elettronici; microscopio rovesciato in cui la luce è collocata sotto il campione per l'osservazione di cellule in coltura che possono essere contate con la camera di Burker (densità cellulare);
- BAGNETTO TERMOSTATATO per mantenere la T costante necessaria al riscaldamento di tamponi, terreni di coltura e sieri ed anche per incubare reazioni enzimatiche.

ZANICHELLI

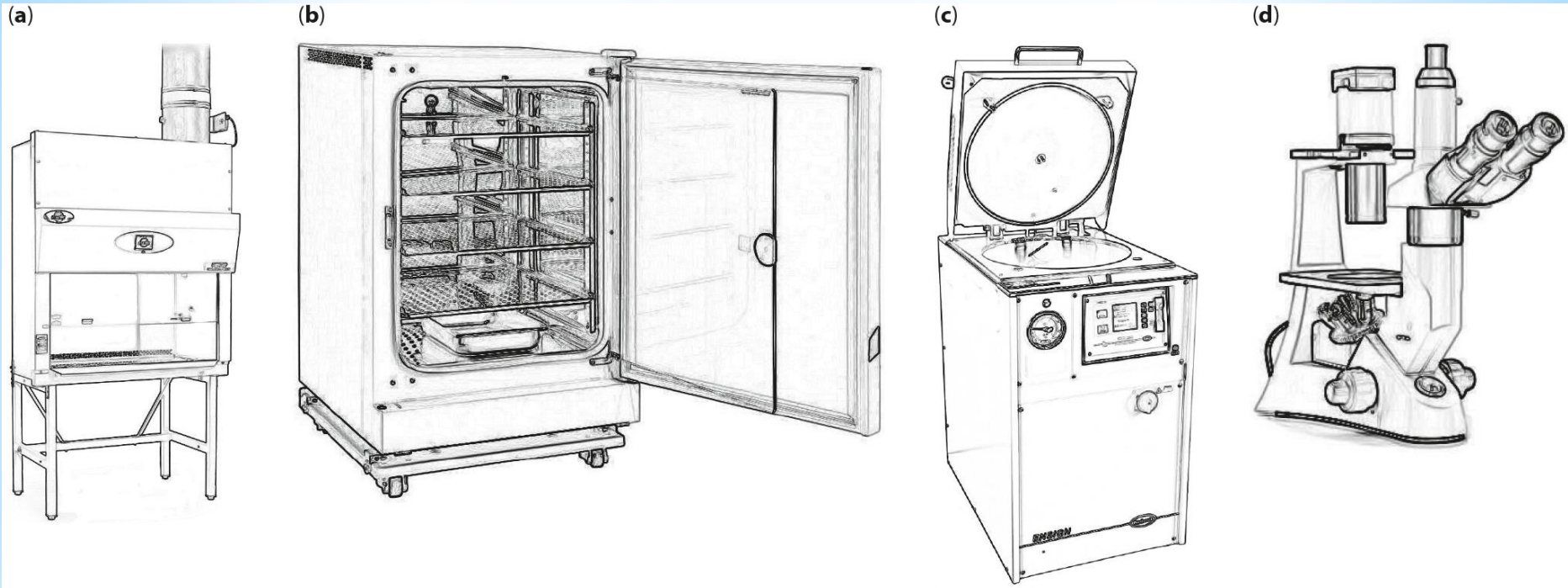


Figura 3.2
Alcune strumentazioni specifiche per un laboratorio di biologia cellulare: (**a**) cappa biologica; (**b**) incubatore a CO_2; (**c**) autoclave; (**d**) microscopio rovesciato.

PRINCIPI DI SICUREZZA

- La tipologia di rischio nei laboratori dipende dal lavoro svolto nei laboratori (materiale chimico, materiale radioattivo, raggi X, laser, sperimentazione animale ecc);
- In un laboratorio biomolecolare, tra i principali rischi vi sono quello chimico e quello biologico;
- La sicurezza in ambito biologico (BIOSICUREZZA) comporta la distinzione dei laboratori in base alle attività che vi si devono svolgere:

Tabella 3.3 Gruppi di rischio per livello di biosicurezza.

Gruppo	Livello di biosicurezza	Pratiche	Strumentazione
1	Base Livello 1	Misure minime di protezione, buona pratica di laboratorio	Banco da lavoro, consigliata la presenza di un lavandino
2	Base Livello 2	Uso di DPI*, buona pratica di laboratorio, segnale rischio biologico	Cappe biologiche di classe I e II, banco di lavoro
3	Contenimento Livello 3	Uso di DPI* speciali, segnale rischio biologico, accesso controllato	Cappe biologiche di classe I e II, autoclave, sistema di ultrafiltrazione per l'aria emessa
4	Massimo contenimento Livello 4	Uso di DPI* speciali, segnale rischio biologico, ingresso autorizzato	Cappe biologiche di classe III, autoclave a doppia entrata, accesso attraverso zona filtro con doccia decontaminante, sistema di ultrafiltrazione per l'aria immessa ed emessa

* DPI, dispositivo di protezione individuale.

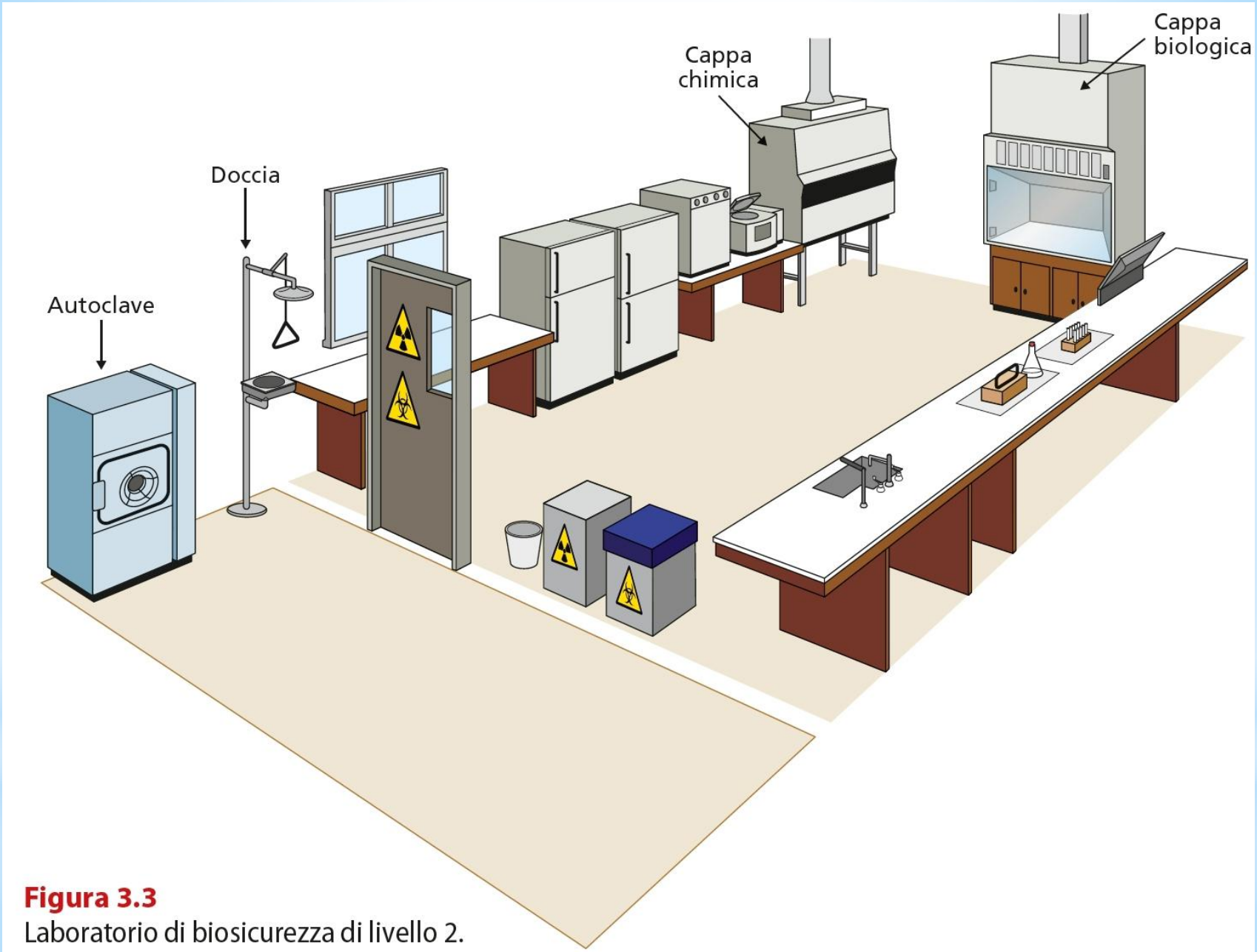


Figura 3.3
Laboratorio di biosicurezza di livello 2.

CONCETTI CHIAVE

Organizzazione del laboratorio

- **Laboratorio di biochimica**

Ambiente strutturato in aree funzionali (pesata, preparazione soluzioni, area strumenti, area colture cellulari) per eseguire in sicurezza esperimenti che coinvolgono biomolecole e campioni biologici.

- **Flusso di lavoro e materiali**

Successione ordinata di fasi (ricezione, stoccaggio, utilizzo, smaltimento di reagenti e campioni) che minimizza contaminazioni, errori sperimentali e rischi per l'operatore.

Vetreria e plasticheria

- **Vetreria di laboratorio**

Insieme di contenitori e dispositivi in vetro (becher, beute, matracci, provette, cilindri graduati, pipette, burette) usati per contenere, miscelare, riscaldare e misurare soluzioni in modo controllato.

- **Plasticheria di laboratorio**

Materiale monouso o riutilizzabile in plastica (provette coniche, puntali per micropipette, piastre, flasks per colture, pipette sterili) pensato per ridurre contaminazioni e facilitare la gestione di campioni e colture.

Strumentazione di base

- **pHmetro**

Strumento che misura il pH di una soluzione tramite un elettrodo sensibile alla concentrazione di ioni idrogeno, fondamentale per preparare tamponi e controllare condizioni sperimentali.

- **Bilancia analitica/tecnica**

Strumento per pesare con elevata precisione reagenti solidi, essenziale per preparare soluzioni a concentrazione nota e ridurre gli errori quantitativi.

- **Sistemi di refrigerazione**

Frigoriferi, congelatori e azoto liquido utilizzati per conservare reagenti, terreni, sieri e campioni biologici a temperature controllate, preservandone stabilità e attività.

- **Centrifuga**

Strumento che separa componenti di una miscela sfruttando la forza centrifuga; consente la separazione di cellule, organelli e frazioni proteiche in base a densità e dimensioni.

- **Bagnetto termostatato**

Sistema di riscaldamento a temperatura costante, impiegato per incubare reazioni enzimatiche o portare soluzioni a una temperatura definita.

- **Spettrofotometro UV–Vis**

Strumento che misura l'assorbimento della luce da parte di una soluzione a una specifica lunghezza d'onda, permettendo la determinazione di concentrazioni di biomolecole.

Laboratorio per colture cellulari

- **Cappa a flusso laminare (cappa biologica)**

Cabina che genera un flusso d'aria sterile filtrato da filtri HEPA, assicurando protezione del materiale biologico e, nelle cappe di sicurezza biologica, anche dell'operatore e dell'ambiente.

- **Flusso laminare verticale/orizzontale**

Configurazioni in cui l'aria filtrata si muove rispettivamente dall'alto verso il basso o dal fondo verso l'operatore, influenzando il grado di protezione dell'operatore e del campione.

- **Incubatore per colture cellulari**

Strumento che mantiene condizioni controllate di temperatura, CO_2 e umidità per la crescita di cellule in coltura.

- **Microscopio rovesciato**

Microscopio in cui l'illuminazione è posta sotto il campione, adatto all'osservazione di cellule vive in coltura in contenitori chiusi (flask, piastre).