Università degli Studi di Teramo

Corso di Laurea in Biotecnologie

Metodologie Biochimiche – II Anno

ESERCITAZIONE 1 – Preparazione di soluzioni: NaCl, Tampone TE e Saccarosio

Data: 20/10/2026

In questa esercitazione preparerete le soluzioni che vi serviranno nelle esercitazioni successive: una soluzione di cloruro di sodio (NaCl), un tampone di lavoro contenente Tris-HCl, EDTA e BSA, e cinque soluzioni di saccarosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$) a concentrazione crescente. Imparerete a calcolare le quantità di soluto necessarie, a pesarle, a scioglierle correttamente, a portare a volume e a ricavare una soluzione diluita da una soluzione madre. Queste operazioni sono la base di quasi tutte le procedure di laboratorio.

⚠ Norme di sicurezza da rispettare sempre

- Indossate sempre camice e guanti.
- NaCl e saccarosio sono sostanze di uso comune e a bassa pericolosità, ma vanno comunque maneggiati con cura.
- In caso di contatto accidentale con occhi o mucose, sciacquare abbondantemente con acqua.
- Mantenete il banco pulito.
- Il Tris e l'EDTA in soluzione concentrata sono irritanti per occhi e cute: manipolate le soluzioni madri con i guanti.
- La BSA è una polvere molto leggera: pesatela senza correnti d'aria, evitando di inalarla.

Richiami Teorici

Prima di iniziare, rispondete alle domande seguenti. Questo vi aiuterà a capire meglio cosa state facendo e perché.

Domanda: *Cosa si intende per molarità (M) di una soluzione? Scrivete la formula e le unità di misura.*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Come si calcola la concentrazione percentuale peso/volume (% p/v)? Fate un esempio pratico.*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Che cos'è il fattore di diluizione e come si usa per preparare una soluzione diluita a partire da una soluzione madre?*

Risposta:

_____

_____

Materiali e Strumenti

Reagenti:

- Cloruro di sodio (NaCl)
- Saccarosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Acqua distillata
- Tris-HCl, (soluzione madre 1 M)
- Na_2EDTA (soluzione madre 1 M)
- Albumina di siero bovino (BSA) in polvere

Vetreria e strumentazione:

- Bilancia analitica
- Cilindri
- Becher
- Micropipetta
- Spatola
- Barchetta
- Micropipette e puntali

1. Soluzione di NaCl

Soluzione madre: NaCl 0,1 M in 50 mL

Dobbiamo preparare **50 mL di una soluzione di NaCl a concentrazione 0,1 M** sciogliendo direttamente il soluto in acqua.

Calcolo della massa di NaCl da pesare

Quanti g di NaCl (MM = 58,44 g/mol) devo pesare?

Procedura – NaCl 0,1 M

1. Mettete un foglio di carta da pesata sulla bilancia e azzeratela (tara).
2. Pesate esattamente ___ g di NaCl e trasferiteli in un becher da 50 mL.
3. Aggiungete circa 30 mL di acqua distillata e mescolate fino a completo scioglimento.
4. Trasferite quantitativamente la soluzione nel cilindro da 50 mL.
5. Portate a volume aggiungendo acqua distillata fino alla tacca da 50 mL.

Soluzione diluita: NaCl 1 mM in 50 mL

Partendo dalla soluzione madre di NaCl 0,1 M appena preparata, prepariamo una soluzione diluita: **NaCl 1 mM in 50 mL**. Per questo tipo di calcolo quale formula si usa? Qual'è il fattore di diluizione (FD)?

Calcolo del volume di soluzione madre da prelevare:

Devo prelevare _____ **mL** di soluzione madre per avere 1 mM di NaCl in 50 mL.

Procedura – NaCl 1 mM

1. Con una micropipetta da 1000 µL, prelevate _____ dalla soluzione madre NaCl 0,1 M.
2. Trasferite i _____ nel secondo cilindro.
3. Portate a volume fino alla tacca da 50 mL con acqua distillata.
4. Etichettare

2. Tampone Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e BSA

Fino a qui avete sciolto i soluti in acqua distillata. Quando però una soluzione deve venire a contatto con materiale biologico (cellule, organelli, proteine) l'acqua distillata non va più bene: non ha un pH definito, non è in grado di mantenerlo e non protegge in alcun modo le strutture che vogliamo isolare. Per questo le soluzioni di Saccarosio della prossima sezione non si preparano in acqua, ma in un tampone composto da tre ingredienti, ciascuno con un compito preciso:

- Tris-HCl 10 mM – mantiene il pH costante durante tutta la procedura.
- EDTA 1 mM – è l'agente chelante: sottrae alla soluzione gli ioni metallici bivalenti.
- BSA 0,1–0,5% – è una proteina «sacrificale» che protegge le membrane.

Di Tris-HCl e di EDTA avrete le soluzioni madri rispettivamente 1 M e 160 mM: sarete voi a calcolare quanto prelevarne. La BSA, invece, va pesata come avete fatto con il NaCl. Preparerete 100 mL di tampone, quantità sufficiente per tutte le soluzioni di saccarosio.

… Perché serve un tampone e non basta l'acqua distillata?

Un tampone è una soluzione che contiene contemporaneamente un acido debole e la sua base coniugata. Grazie a questa coppia, quando si aggiunge un po' di acido o di base il pH si sposta pochissimo: l'acido aggiunto viene «assorbito» dalla base coniugata e viceversa. La capacità di assorbire queste variazioni si chiama **capacità tampone** ed è tanto maggiore quanto più il tampone è concentrato.
Il pH conta perché la struttura tridimensionale delle proteine, e quindi la loro attività, dipende dallo stato di carica dei gruppi acidi e basici che le compongono: se il pH cambia, le cariche cambiano, la proteina si denatura e l'enzima smette di funzionare. L'acqua distillata ha un pH vicino alla neutralità, ma non ha alcuna capacità tampone: basta la CO_2 dell'aria che vi si scioglie formando acido carbonico per farla scendere a pH 5,5–6. Per questo non può essere usata quando il pH deve restare controllato.

Quindi …

Domanda: Che cos'è un tampone? Da quali componenti è formato e che cosa si intende per capacità tampone?
Risposta:
_____
_____

Domanda: L'acqua distillata ha un pH vicino a 7. Perché allora non può sostituire un tampone? Che cosa le manca?
Risposta:
_____
_____

Tris-HCl 10 mM a partire dalla soluzione madre 1 M

Il Tris (tris-idrossimetil-amminometano) è il tampone più usato in biochimica nell'intervallo di pH compreso fra 7 e 9. La soluzione madre è 1 M ed è già stata portata al pH voluto aggiungendo acido cloridrico: per questo si chiama Tris-HCl e non semplicemente Tris. Voi dovete ricavarne 100 mL a concentrazione 10 mM, quindi dovete fare una diluizione, esattamente come avete fatto per il NaCl 1 mM.

Calcolo del volume di Tris-HCl 1 M da prelevare
Devo preparare 100 mL di Tris-HCl 10 mM partendo da una soluzione madre 1 M.
Formula da usare: _____

Fattore di diluizione (FD) = _____

Da sapere – il Tris cambia pH con la temperatura
Il pKa del Tris è 8,06 a 25 °C e diminuisce di circa 0,03 unità per ogni grado di aumento della temperatura. Questo significa che un tampone Tris portato a pH 7,4 sul banco, a temperatura ambiente, si trova a circa pH 8,0 quando lo mettete in frigorifero a 4 °C.

Poiché le procedure di frazionamento cellulare si eseguono sempre al freddo, il pH va misurato alla temperatura alla quale il tampone verrà realmente usato. È uno degli errori più comuni nei laboratori di biochimica.

Domanda: Il pKa del Tris è 8,06 e un tampone lavora bene nell'intervallo pKa ± 1. Il Tris è adatto a lavorare a pH 7,4? E a pH 6,0? Motivate la risposta.
Risposta:

Domanda: Perché un tampone Tris preparato a 25 °C non ha più lo stesso pH quando viene usato a 4 °C? Quali conseguenze può avere su un esperimento con organelli?
Risposta:

Domanda: Diluendo 100 volte la soluzione madre, il pH del tampone cambia? Motivate pensando a che cosa succede al rapporto fra acido debole e base coniugata quando si aggiunge solvente.
Risposta:

EDTA 1 mM: l'agente chelante

Un agente chelante è una molecola capace di legare uno ione metallico in più punti contemporaneamente, come farebbe una pinza: il nome viene dal greco chelé, che significa appunto chela. Il legame multiplo rende il complesso molto più stabile di quanto sarebbe un legame singolo, e lo ione resta di fatto sequestrato, non più disponibile a partecipare alle reazioni.
L'EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) è il chelante più usato in biochimica: possiede sei punti di aggancio, due atomi di azoto e quattro gruppi carbossilici, con cui avvolge lo ione metallico. Il rapporto è 1:1, cioè una molecola di EDTA blocca un solo ione, indipendentemente dalla sua carica.
A che cosa serve nel nostro tampone? Nelle cellule e nei tessuti sono presenti ioni bivalenti, soprattutto Ca^{2+} e Mg^{2+}. Nel momento in cui le cellule vengono rotte per ottenere l'omogenato, questi ioni si liberano nel mezzo e attivano enzimi che danneggiano proprio ciò che vogliamo isolare: le nucleasi, che degradano DNA e RNA, hanno bisogno di Mg^{2+} per funzionare; le fosfolipasi e alcune proteasi hanno bisogno di Ca^{2+}; e un eccesso di Ca^{2+} nei mitocondri ne provoca il rigonfiamento e la perdita di funzionalità. Sottraendo gli ioni, l'EDTA spegne tutte queste reazioni in un colpo solo.

Lo sapevi che …
La soluzione madre di EDTA è a pH 8,0 e non a pH neutro per un motivo pratico: l'EDTA in forma acida è praticamente insolubile in acqua e passa in soluzione solo quando il pH viene portato intorno a 8 con NaOH. È anche la forma deprotonata quella che lega efficacemente i metalli.
È lo stesso principio per cui le provette per l'emocromo contengono EDTA: chelando il Ca^{2+} blocca la cascata della coagulazione e il sangue resta fluido.

Calcolo del volume di EDTA 160 mM da prelevare
Devo preparare 100 mL di tampone contenente EDTA 1 mM partendo da una madre 160 mM.

Fattore di diluizione (FD) = _____

Domanda: Che cos'è un agente chelante? Spiegate con parole vostre perché l'aggiunta di EDTA protegge il materiale biologico.
Risposta:

Domanda: Quali enzimi vengono messi fuori gioco dall'EDTA e per quale motivo? Che cosa potrebbe succedere se preparaste il tampone dimenticando l'EDTA?
Risposta:

Domanda: Perché la soluzione madre di EDTA è a pH 8,0 e non a pH neutro?
Risposta:

Domanda: L'EDTA lega gli ioni in rapporto 1:1. Quante micromoli di ioni bivalenti potete al massimo sequestrare con i 100 mL di tampone che avete preparato?
Risposta:

Il tampone unico: Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM

Le due diluizioni non si eseguono separatamente: si prelevano i due volumi che avete calcolato e si portano insieme a volume nello stesso recipiente, ottenendo un'unica soluzione che contiene entrambi i componenti alle concentrazioni volute. Il tampone che otterrete (Tris-HCl 10 mM ed EDTA 1 mM) si chiama **tampone TE**, dalle iniziali dei suoi due componenti.

Componente	Concentrazione della madre	Concentrazione finale	Volume da prelevare per 100 mL
Tris-HCl	1 M	10 mM	
Na_2EDTA	160 mM	1 mM	
Acqua distillata	–	–	a volume fino a 100 mL
Volume finale	–	–	100 mL

Procedura – Tampone TE

1. Etichettate il cilindro da 100 mL: «Tampone TE – Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM – pH ___ – data – gruppo».
2. Mettete nel cilindro circa 60–70 mL di acqua distillata (cioè meno del volume finale).
3. Prelevate con la micropipetta il volume di Tris-HCl 1 M che avete calcolato e trasferitelo nel cilindro.
4. Cambiate il puntale e prelevate il volume di EDTA 160 mM che avete calcolato; trasferitelo nello stesso cilindro.
5. Mescolate agitando delicatamente.
6. Portate a volume con acqua distillata fino alla tacca da 100 mL, tappate e capovolgete 10–15 volte.
7. Conservate il tampone a 4 °C.

Domanda: Perché si mette prima una parte dell'acqua nel cilindro e solo dopo si aggiungono le soluzioni madri, invece di versare le madri nel cilindro vuoto?
Risposta:

Domanda: Perché è necessario cambiare il puntale fra il prelievo del Tris-HCl e quello dell'EDTA? Che cosa si rischia non facendolo?
Risposta:

BSA 0,1–0,5%: la proteina che protegge

BSA è la sigla di Bovine Serum Albumin, cioè albumina di siero bovino: una proteina molto abbondante, economica e priva di attività enzimatica, che viene aggiunta ai tamponi con una funzione di “danneggiamento” al posto delle molecole che ci interessano.
Nel nostro tampone svolge due compiti:

- lega gli acidi grassi liberi che si formano quando i tessuti vengono omogeneizzati. Questi acidi grassi si inserirebbero nelle membrane dei mitocondri alterandone la permeabilità e facendo perdere l'accoppiamento della respirazione: la BSA li cattura e li tiene lontani dalle membrane;
- ricopre le superfici di vetro e di plastica di provette e puntali. Le proteine del campione sono presenti in quantità piccolissime e tenderebbero ad aderire alle pareti, andando perdute: la BSA occupa quei siti al posto loro.

La concentrazione della BSA si esprime in percentuale peso/volume; % p/V indica quanti g di BSA sono presenti in 100 mL di soluzione. Di norma si lavora fra lo 0,1 e lo 0,5%, a seconda di quanto tessuto si deve trattare. Noi lavoreremo con lo 0,1%p/V.

Calcolo della massa di BSA da pesare
La BSA va aggiunta a 100 mL di tampone TE.
Formula da usare: _____

0,1 % p/V →

Procedura – Aggiunta della BSA

1. Trasferite 100 mL del tampone TE appena preparato in un becher pulito.
2. Pesate sulla bilancia analitica la massa di BSA che avete calcolato, usando una barchetta.
3. Versate la BSA sulla superficie del tampone, poco per volta, e lasciatela idratare per qualche minuto senza mescolare: la polvere deve bagnarsi da sola.
4. Mescolate molto lentamente finché la soluzione non diventa limpida. Non agitate energicamente e non usate il vortex.
5. Etichettate «Tampone TE + BSA ___% – data – gruppo».
6. Conservate a 4 °C (la BSA va aggiunta il giorno stesso in cui il tampone verrà usato).

3. Soluzioni di Saccarosio

Preparerete 5 soluzioni di saccarosio a concentrazione crescente espressa in **percentuale peso/volume (% p/v)**. La percentuale p/v indica i grammi di soluto presenti in 100 mL di soluzione.

Attenzione a un punto importante: queste quattro soluzioni non si preparano in acqua distillata, ma nel tampone TE + BSA che avete appena preparato. Ciascun componente ha il suo ruolo: il saccarosio fornisce la densità necessaria a costruire il gradiente, il Tris-HCl mantiene il pH, l'EDTA blocca gli enzimi che si liberano quando le cellule vengono rotte e la BSA protegge le membrane. L'insieme di saccarosio, Tris-HCl, EDTA e BSA è il mezzo classico impiegato per isolare i mitocondri, ed è esattamente quello che userete nella prossima esercitazione.

Formula: _____ → g da pesare = _____

Calcolo delle masse di saccarosio per 5 mL a varie concentrazioni (MM = 342,30 g/mol**)**

15 % p/v:

23 % p/v:

31 % p/v:

40 % p/v:

55 % p/v:

Procedura – Soluzioni di saccarosio

Ripetete la procedura seguente per ciascuna delle cinque concentrazioni (15%, 23%, 31%, 40%, 55%). Lavorate in ordine crescente di concentrazione.

Da sapere – qual è il solvente di queste soluzioni
Il solvente non è l'acqua distillata ma il tampone TE + BSA: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e BSA alla percentuale assegnata al vostro gruppo.
Di conseguenza, sia l'aggiunta iniziale di liquido sia la portata a volume vanno fatte con il tampone e non con l'acqua. Tenete presente che per 5 soluzioni da 5 mL servono in tutto 25 mL di tampone: calcolate di averne a sufficienza prima di cominciare.

Domanda: Perché le soluzioni di saccarosio del gradiente vanno preparate nel tampone e non in acqua distillata? Che cosa accadrebbe a mitocondri sospesi in saccarosio sciolto in sola acqua distillata?
Risposta:
_____
_____

1. Tarate la bilancia con la barchetta.
2. Pesate la quantità di saccarosio calcolata per la concentrazione da preparare.
3. Trasferite il saccarosio in un becher e aggiungete il tampone TE + BSA, senza superare la metà del volume finale (circa 3 mL per il 15%, il 23%, il 31%, il 40% e il 55%: più la soluzione è concentrata, meno liquido potete mettere all'inizio).
4. Mescolate fino a completa dissoluzione. Se la soluzione è torbida, aspettate qualche secondo (il saccarosio si scioglie più lentamente a concentrazioni elevate)
5. Portate a volume aggiungendo i restanti 2 mL di tampone TE + BSA.

Domanda: *Qual è la differenza tra concentrazione molare (M) e concentrazione % p/v? In quali situazioni conviene usare l'una o l'altra?*

Risposta:

_____

_____