

Nanoparticelle come sensore colorimetrico

Scopo:

- Riflettere sull'interazione luce-materia alla nanoscala;
- Comprendere come le variazioni nello stato di aggregazione delle nanoparticelle (NPs) su scala nanometrica si riflettano con un cambiamento colorimetrico su scala macroscopica;
- Applicazione delle NPs in nanomedicina

Materiale necessario:

- Oro colloidale;
- Soluzione di NaCl;
- Soluzione di zucchero;
- 1 uovo fresco;
- Acqua distillata;
- Pipette Pasteur;
- 7) Bilancia;
- 8) Becker;
- 9) Eppendorf da 15 mL;

Protocollo sperimentale:

- *Preparazione dei materiali*

Distribuite 1 mL di oro colloidale in 5 eppendorf. La prima eppendorf servirà come controllo per confrontare i risultati del test con il colore originario.

Preparazione dell'oro colloidale caratterizzato da NPs aventi le seguenti dimensioni:

- 10 nm
- 20 nm
- 40 nm

Diluire la soluzione di oro colloidale in acqua considerando un rapporto 1:1. Sapendo che il volume finale è 10 mL, metterete mL di acqua e mL di oro colloidale.

- *Effetto della soluzione salina*

Preparate una soluzione 1 M di NaCl in acqua distillata. Sapendo che:

Quanti g di NaCl dovete pesare?

Nella seconda provetta, con una pipetta Pasteur, mettete pochissime gocce di soluzione di sale (indicativamente 2 gocce per ogni mL). Nella terza molte più gocce (indicativamente 6-7 gocce per ogni mL).

- *Effetto della soluzione di zucchero*

Preparate una soluzione 1 M di zucchero in acqua distillata. Sapendo che:

Quanti g di zucchero dovete pesare?

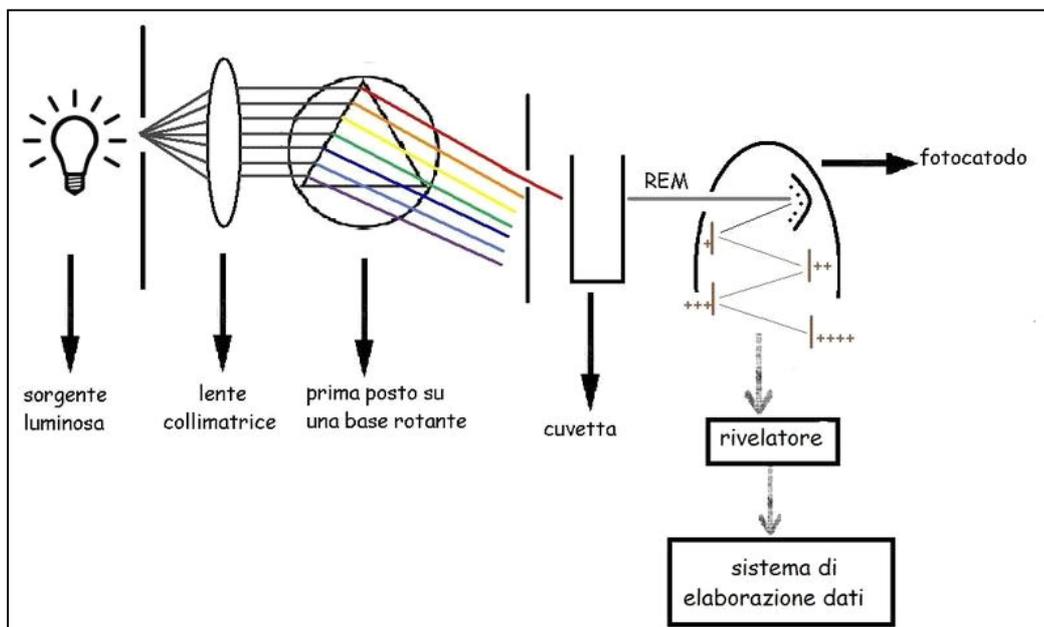
Nella quarta provetta con una pipetta Pasteur, mettete alcune gocce di soluzione (indicativamente 3-4 gocce per ogni mL). Dopo averne osservato l'effetto, potete poi aumentare il numero di gocce a piacere.

- *L'albume come inibitore*

Aprite un uovo fresco e con una pipetta Pasteur estraete un po' di albume (circa 1 mL o 2-3 pipette piene), mettetelo in una eppendorf vuota e aggiungete 3 mL di acqua distillata. Mescolate delicatamente: si formerà della schiuma, perciò lasciate tutto fermo per un minuto circa. Prendete la soluzione dal fondo per evitare la schiuma e le bolle. Aggiungete la mistura bianca di acqua e albume all'oro colloidale. Nella quinta provetta mettete un po' di albume d'uovo e acqua distillata. Dopo aver ben mescolato, aggiungete alcune gocce di soluzione NaCl (indicativamente 2 gocce per ogni mL).

Spettrofotometro:

Con lo scopo di effettuare la lettura allo spettrofotometro, trasferite 1 mL da ciascuna eppendorf in una cuvetta.



Saggio colorimetrico di nanoparticelle d'oro coniugate con DNA

Scopo:

- Funzionalizzazione di NPs per la realizzazione di biosensori in nanomedicina (es. Biosensori per testare e monitorare potenziali inibitori dell'elicasi RecQ4):

Materiale necessario:

- 1) ssDNA 1/2
- 2) Oro colloidale (20 nm)
- 3) Buffer di HCl-citrato 0.1 M pH4.3
- 4) T-OEG6 300 μ M
- 5) Acqua distillata
- 6) Buffer A (10 mM di sodio fosfato pH7 e 1 M NaCl)
- 7) Falcon da 15 mL
- 8) Eppendorf

Protocollo sperimentale:

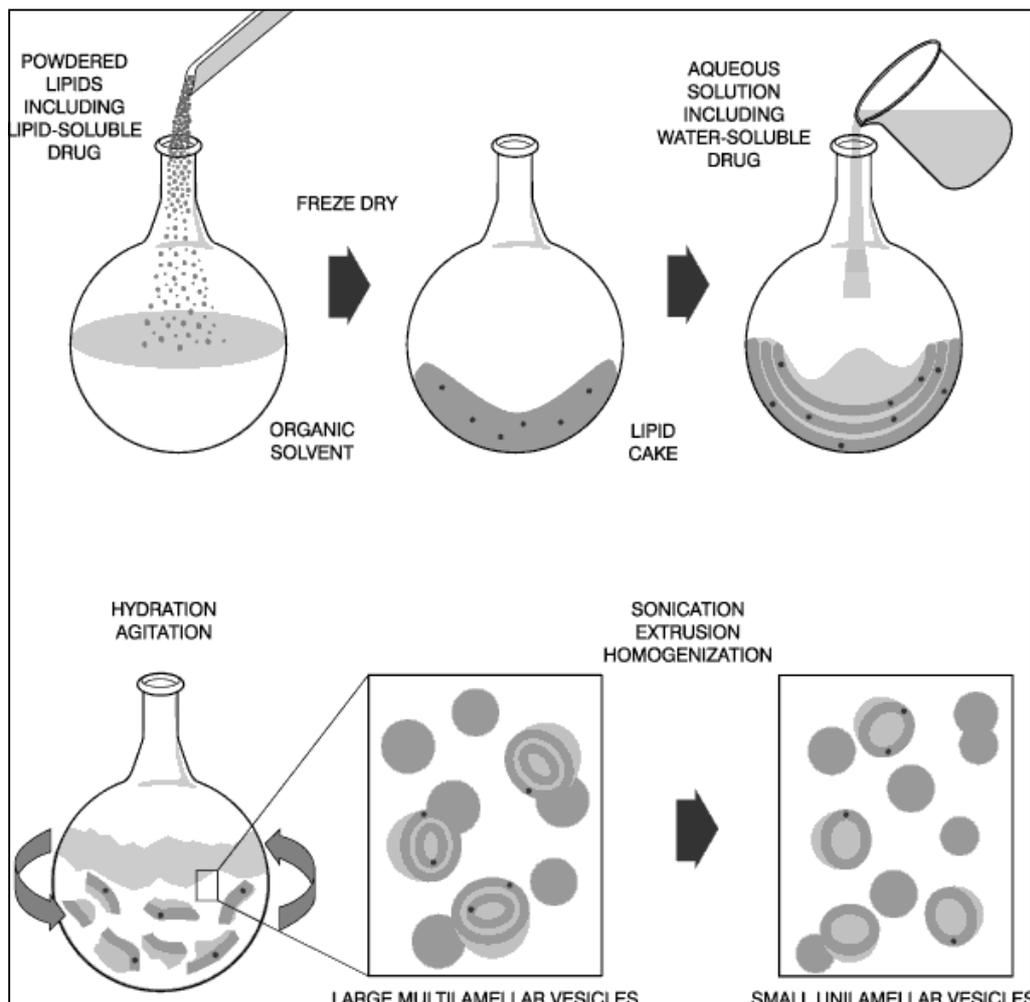
- Preparare 4 falcon da 15 mL con 750 μ L di oro colloidale; nelle falcon 1 e 2 mettere 5.22 μ L di ssDNA 1 mentre nelle falcon 3 e 4 mettere lo stesso volume di ssDNA 2. Agitare e lasciare 10 min a temperatura ambiente.
- Aggiungere 1.5 mL della soluzione HCl-citrato; agitare e lasciare 30 min a temperatura ambiente.
- Aggiungere 15 μ L di T-OEG6 e lasciare 10 min a temperatura ambiente.
- Trasferire il tutto in una eppendorf e centrifugare a 14.000 rpm per 10 min.
- Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 250 μ L di acqua; centrifugare a 14.000 rpm per 10 min (E fare 2 volte).
- Risospendere il pellet in 250 μ L di buffer A.
- Unire la eppendorf 1 con la 3 e lasciare per 12 ore a temperatura ambiente.

Le eppendorf 2 e 4 ti serviranno come controlli.

Preparazione vescicole unilamellari

Scopo:

- I liposomi (vescicole lipidiche) si formano quando le torte lipidiche sono idratate e le pile di doppi strati lipidici si gonfiano. I fogli lipidici idratati si distaccano e si chiudono da soli per formare grandi vescicole multilamellari (LMV) che impediscono l'interazione dell'acqua con gli idrocarburi del doppio strato ai bordi. Una volta che queste particelle si sono formate, la riduzione della dimensione della particella richiede energia in ingresso sotto forma di energia meccanica (estrusione).



0Protocollo sperimentale:

- lavaggi con Cloroformio ed Etanolo, in modo da pulire la superficie interna della beuta
- aggiungere le componenti lipidiche precedentemente disciolte in cloroformio pure o miste:
 - => DOPC (1mg/mL)
 - => DOPC (1mg/mL) + fluoroforo rosso
 - => DOPC (1mg/mL) in combinazione con sfingomieline (1mg/mL) (1:1)
 - => DOPC (1mg/mL) in combinazione con sfingomieline (1mg/mL) (2:1)
- asciugare delicatamente i lipidi disciolti in cloroformio tramite un flusso di azoto
- riporre la beuta nella campana a vuoto per circa 1/2 ore, in modo da esser sicuri che l'evaporazione del cloroformio sia avvenuta correttamente.
- risospendere i lipidi aggiungendo 1 mL di acqua deionizzata
- riporre la beuta in forno per 1 ora a 50°C agitando ogni 10 min. la soluzione acquosa
- procedere con l'estrusione, in modo da ottenere vescicole lipidiche delle dimensioni desiderate

DOMANDE:

Considerando che la concentrazione finale delle nostre vescicole (pure o miscelate) da analizzare

all'IR è di 1mg/mL, quanto volume di DOPC e quanto di sfingomieline dobbiamo mettere per ottenere la miscela lipidica DOPC (1mg/mL) in combinazione con sfingomieline (1mg/mL) (1:1)?

...e per ottenere DOPC (1mg/mL) in combinazione con sfingomieline (1mg/mL) (2:1)?