

ESPERIENZA 1 – 12/11/2024

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA CON IL METODO DEL BIURETO.

REAGENTI:

- Soluzione di albumina di siero bovino (BSA) alla concentrazione di 5 mg/mL,
- soluzioni di BSA a concentrazioni incognite (X e Y),
- reattivo di Gornall (o di Biureto),
- H₂O.

PROCEDURA

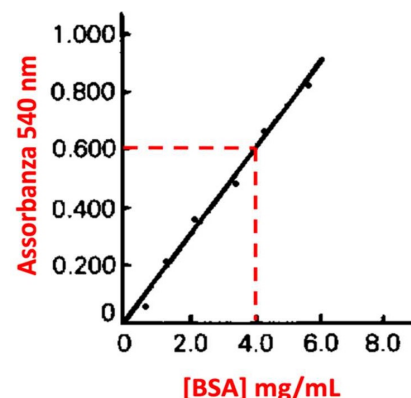
1. Preparare, in provette distinte, le soluzioni per la retta di taratura e per il saggio di determinazione seguendo il seguente schema (i valori si riferiscono a volumi espressi in **mL**, le provette dalla 1 alla 6 serviranno per la retta di taratura):

COMPONENTE	NUMERO PROVETTA/CUVETTA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA stock (ml)	-	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	-	-
H ₂ O (ml)	0.5	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	-	-
Gornall (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
BSA X (ml)	-	-	-	-	-	-	0.5	-
BSA Y (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.5

2. Mescolare le soluzioni ed attendere 15 minuti;
3. Nel mentre, ricalcolare le concentrazioni di BSA in ciascuna provetta della retta di taratura (sul totale di 0,5 mL, a cui poi si aggiungono i 1,5 mL di Gornall) e riportarle nella tabella seguente:

NUMERO PROVETTA/CUVETTA					
1	2	3	4	5	6

4. Misurare i valori di A alla λ di 540 nm, usando come *blank* la soluzione senza BSA (provetta/cuvetta numero 1);
5. Costruire la retta di taratura utilizzando Excel, mettendo in grafico i valori di A delle soluzioni da 2 a 6 in funzione delle concentrazioni di BSA ricavate nella tabella al punto 2;
6. Ricavare dalla retta le concentrazioni incognite delle soluzioni di BSA X e Y.
7. L'assorbanza ottenuta verrà correlata ad una concentrazione corrispondente, tramite la retta di taratura: l'assorbanza (y) corrisponderà ad un valore di concentrazione (x) dedotto dall'equazione della retta ($y = mx + q$).



ESPERIENZA 2 – 13/11/2023

PARTE 1

**SPETTRO DI ASSORBIMENTO DEL FLAVIN-MONONUCLEOTIDE (FMN)
NELLE FORME OSSIDATA E RIDOTTA**

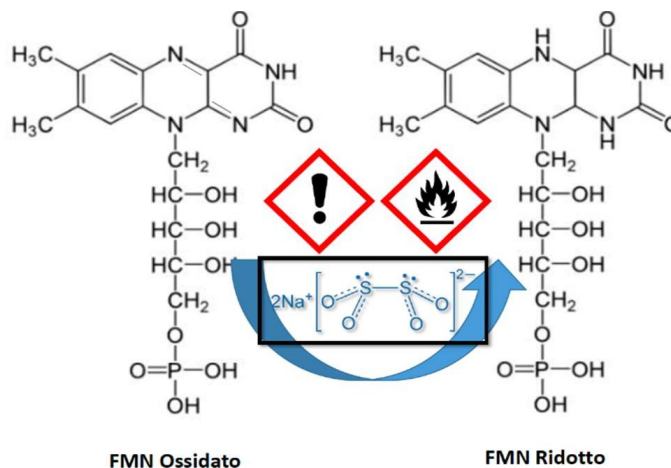
STRUMENTI:

- spettrofotometro con sorgente visibile;
- cuvette con cammino ottico di 1 cm;
- micropipette.

REAGENTI:

- soluzione di FMN ossidato in H₂O;
- PBS da usare per il bianco;
- Soluzione di ditionito di sodio (Na₂S₂O₄) in PBS

PROCEDURA:



1. Accendere lo spettrofotometro e attendere 15 minuti per fare riscaldare la lampada.
2. Riempire una cuvetta con H₂O (*Blank*) e una con la soluzione di FMN;
3. Selezionare la lunghezza d'onda (λ) tramite lo spostamento del monocromatore dello spettrofotometro (si può variare la posizione del monocromatore agendo sui pulsanti + e -); impostare la λ dello spettrofotometro a **280 nm**;
4. Inserire la cuvetta con il bianco nello strumento e premere SET REF: così facendo si azzerò lo strumento, annullando di fatto l'eventuale assorbimento del *blank* a quella specifica λ ;
5. Rimuovere il *blank* dallo strumento ed inserire la cuvetta con la soluzione di FMN, leggere sul display il valore di A (assorbanza) ed annotarla;
6. Spostare il monocromatore (quindi selezionare una nuova λ) e ripetere la procedura. Le letture di A possono essere eseguite ad intervalli di 20 nm, ma è consigliabile restringere gli intervalli nelle zone prossime ai massimi di assorbimento;
7. Misurare l'assorbanza A nelle λ comprese tra **280 e 500 nm**;
8. Ripetere l'intera procedura dal punto 3 in poi dopo aver aggiunto alla cuvetta contenente la soluzione di FMN un po' di ditionito di sodio (Na₂S₂O₄) con l'aiuto di una spatolina (operazione da condurre **sotto cappa chimica**): agitare la cuvetta (il ditionito di sodio riduce l'FMN) e misurare l'assorbanza nello stesso intervallo di λ .
9. I valori di A misurati in funzione delle diverse λ permettono di tracciare gli spettri di assorbimento delle due soluzioni

PARTE 2

IDENTIFICAZIONE DI SOSTANZE IN BASE ALLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO

REAGENTI: 4 Soluzioni con sostanze incognite, A, B, C, D, sciolte in H₂O, H₂O da usare come blank.

PROCEDURA

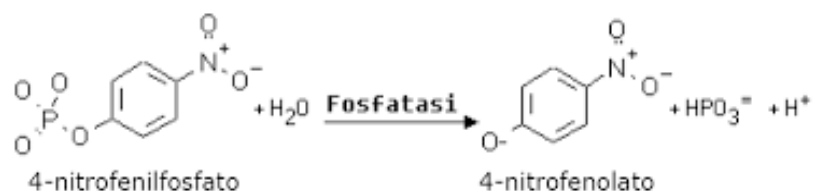
1. Accendere lo spettrofotometro ed attendere 15 minuti;
2. Riempire una cuvetta con H₂O (blank) ed una con la soluzione incognita opportunamente diluita (in base allo stock iniziale)
3. Selezionare la lunghezza d'onda (λ) tramite lo spostamento del monocromatore dello spettrofotometro (si può variare la posizione del monocromatore agendo sui pulsanti + e -); impostare la λ dello spettrofotometro a 330 nm;
4. Inserire la cuvetta con il blank e azzerare lo strumento; rimuovere il blank dallo strumento ed inserire la cuvetta con la soluzione, leggere sul display il valore di A (assorbanza);
5. Spostare il monocromatore (quindi selezionare una nuova λ) e ripetere la procedura. Le letture di A possono essere eseguite ad intervalli di 10 nm;
6. Misurare l'A nelle λ comprese tra 330 e 700 nm;
7. Preparare le soluzioni incognite: la soluzione stock per le sostanze A, B e C sono da diluire 400X, e D 20X
8. Disegnare lo spettro di assorbimento per la prima sostanza.
9. Ripetere la stessa procedura anche per le altre sostanze.
10. Confrontare gli spettri ottenuti con quelli forniti dal docente/proiettati alla lavagna e identificare le sostanze.

ESPERIENZA 3 – 14/11/2024
DETERMINAZIONE DEI VALORI DI K_M E V_{MAX} DELL'ENZIMA
FOSFATASI ACIDA

REAGENTI:

- Tampone citrato 0.1 M, pH 5.5
- Fosfatasi acida (Enzima) stock 2.5 U/ml
- Soluzione di P-nitrofenil fosfato (PNPP) 3mM
- NaOH 10N

Le FOSFATASI, o fosfomonoesterasi, appartengono alla famiglia delle IDROLASI, e catalizzano la defosforilazione dei loro substrati permettendo, quindi, la scissione degli esteri fosforici con liberazione di fosfato inorganico.



PROCEDURA

1. Preparare 8 tubi e diluire lo stock di substrato PNPP (3mM) nel tampone citrato, in modo da ottenere 2 ml alle seguenti concentrazioni: (1) 0mM, (2) 0.03mM, (3) 0.09mM, (4) 0.15mM, (5) 0.24mM, (6) 0.3mM, (7) 0.6 mM e (8) 0.9 mM.

REAGENTE	NUMERO PROVETTA/CUVETTA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampone (ml)	1.90	1.88	1.84	1.8	1.74	1.70	1.50	1.30
PNPP (ml)								

2. Con l'aiuto di un cronometro aggiungere 10ul dello STOCK di fosfatasi acida (equivalenti a 25 mU/ml) nei diversi tubi ai seguenti tempi:

- (1) t=0min al tubo 0 mM
- (2) t=1min al tubo 0.03 mM
- (3) t=2min al tubo 0.09 mM
- (4) t=3min al tubo 0.15 mM
- (5) t=4min al tubo 0.24 mM
- (6) t=5min al tubo 0.3 mM
- (7) t=6min al tubo 0.6 mM
- (8) t=7min al tubo 0.9 mM

In questa fase è molto importante la precisione sia dei volumi sia dei tempi.

3. Fermare in ogni tubo la reazione dopo **10 minuti** aggiungendo 100ul di NaOH 10N. Le reazioni devono quindi essere fermate ai seguenti tempi:

- (1) t=10min al tubo 0 mM
- (2) t=11min al tubo 0.03 mM
- (3) t=12min al tubo 0.09 mM

-

Dopo questa operazione le soluzioni prendono una colorazione gialla di intensità crescente

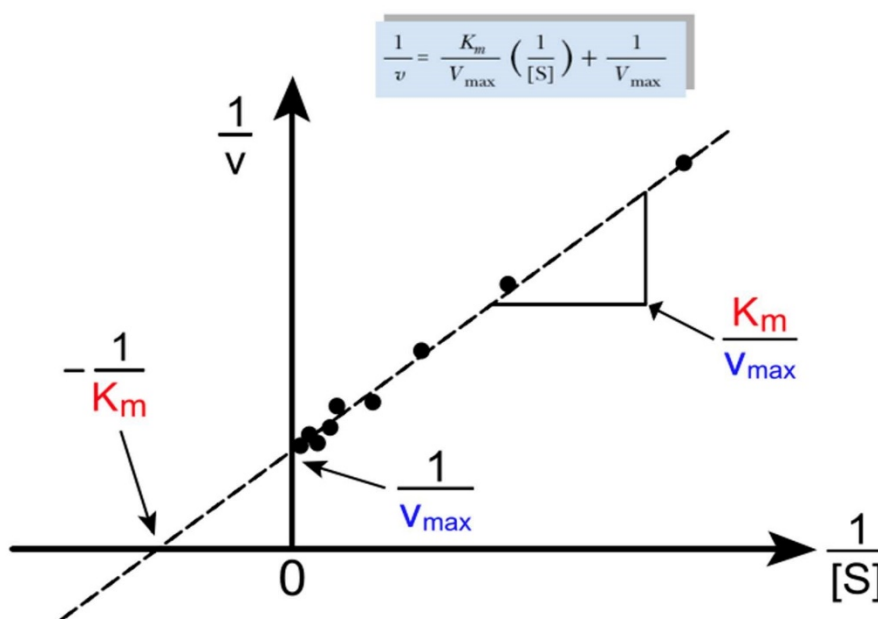
4. Accendere lo spettrofotometro ed impostare la lettura a **405 nm** (picco di assorbimento del p-nitrofenolo); azzerare lo strumento con il tampone citrato e misurare in cuvetta l'assorbanza di 1 ml di ciascuna delle 8 soluzioni.
5. Sottrarre alle assorbanze misurate il valore di assorbanza della soluzione 0 mM (al fine di avere i valori di assorbimento solo del p-nitrofenolo formatosi nel tempo di reazione).

CALCOLI

1. Ricalcolare le concentrazioni di substrato nelle miscele di reazione finali in mM ed annotarle nella tabella seguente:

NUMERO PROVETTA/CUVETTA							
1	2	3	4	5	6	7	8

2. Calcolare per ogni reazione la velocità della reazione in μM di prodotto/min sapendo che il coefficiente di estinzione molare (λ 405 nm) del prodotto p-nitrofenolo è $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
3. Graficare i valori ottenuti secondo Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $1/[S]$).
4. Determinare i valori di K_M e V_{max} .



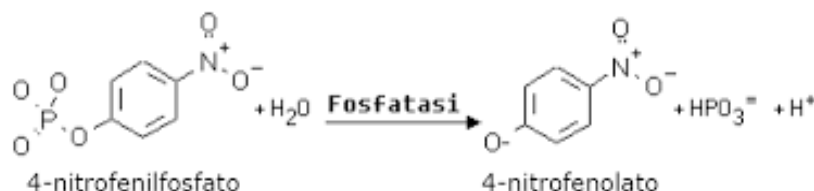
ESPERIENZA 4– 15/11/2024
DETERMINAZIONE IL TIPO DI INIBIZIONE A CUI E' SOGGETTO
L'ENZIMA FOSFATASI ACIDA

REAGENTI:

- Tampone citrato 0.1 M, pH 5.5
- Fosfatasi acida (Enzima) stock 2.5 U/ml
- Soluzione di P-nitrofenil posfato (PNPP) 0.5mM
- Sodio Fosfato (Pi) 1mM
- NaOH 10N

Ricordiamo che:

Le FOSFATASI, o fosfomonoesterasi, appartengono alla famiglia delle IDROLASI, e catalizzano la defosforilazione dei loro substrati permettendo, quindi, la scissione degli esteri fosforici con liberazione di fosfato inorganico.



La fosfatasi acida è inibita da fosfato inorganico, un prodotto della reazione. Determinerete il tipo di inibizione cinetica e la costante di inibizione K_i usando l'analisi grafica di Dixon (vedi appendice).

PROCEDURA

1. Preparare 5 soluzioni in un volume finale di 2 ml contenenti PNPP alla concentrazione 0.05mM e Pi alle seguenti concentrazioni: 0.005 mM, 0.025 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, portando a volume con tampone citrato.

REAGENTE	NUMERO PROVETTA/CUVETTA				
	1	2	3	4	5
Tampone (ml)	1.79	1.75	1.78	1.4	1.2
PNPP (ml)					
Pi (ml)					

2. Aggiungere 15 μ L di Enzima a tutte le provette **MESCOLANDO ACCURATAMENTE** e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti.
3. Bloccare la reazione aggiungendo 0.1 ml di NaOH 10 N, e mescolare rapidamente.
4. Leggere le assorbanze a 405 nm azzerando lo spettrofotometro con tampone citrato.
5. Preparare un altro sistema di saggio come sopra, usando PNPP alla concentrazione finale 0.15 mM. Tutte le altre condizioni (la concentrazione di Pi, tampone a 2 ml, enzima e NaOH) devono essere le stesse.

REAGENTE	NUMERO PROVETTA/CUVETTA				
	1	2	3	4	5
Tampone (m)	1.39	1.35	1.2	1	0.8
PNPP (ml)					
Pi (ml)					

6. Proseguire come ai punti 2, 3, 4.

CALCOLI

- Calcolare la velocità della reazione in μM di prodotto/min, ricordando che il coefficiente di estinzione molare del p-nitro fenolo è $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- Mettere in grafico il reciproco della velocità, $1/v$ contro la $[\text{Pi}]$. Questo è un grafico di Dixon. Dovete ottenere due linee rette dalle due diverse concentrazioni di PNPP utilizzate.
- Trovare il punto di intersezione di queste due linee. Da questa intersezione calcolate la costante di inibizione, K_i , e il tipo di inibizione (competitiva o non competitiva).

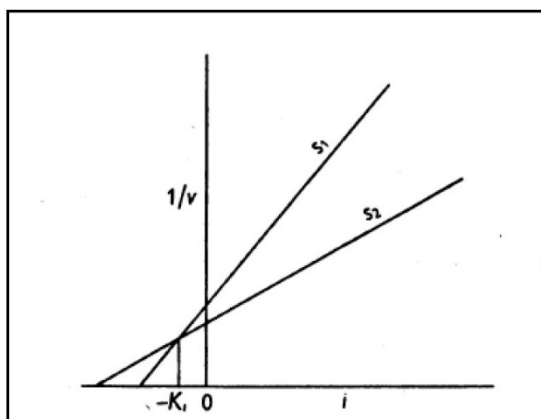
NOTA: K_i , come K_m , è una costante cinetica per l'interazione tra l'inibitore e l'enzima ed è una misura dell'affinità dell'inibitore per l'enzima.

APPENDICE:

Un modo pratico per determinare costanti di inibizione (competitiva e non competitiva) è quello di eseguire una serie di saggi a due o più concentrazioni diverse di substrato variando la concentrazione dell'inibitore (I). Per ogni concentrazione diversa di substrato è possibile tracciare un grafico di $1/v$ contro $[\text{I}]$ (grafico di Dixon, rappresentato in figura). L'intersezione delle due linee nel secondo quadrante avverrà a $-K_i$.

Sotto sono mostrati i profili dell'inibizione competitiva e non competitiva a due concentrazioni di substrato.

INIBIZIONE COMPETITIVA



INIBIZIONE NON COMPETITIVA

