

Esercitazione dosaggio del lisozima

Scopo della esercitazione: Determinare la concentrazione di una proteina (lisozima) attraverso due metodi differenti: uno diretto ed uno indiretto e confrontare i risultati raggiunti.

Molecola analizzata: lisozima, da tuorlo d'uovo (massa molecolare 14,307 kDa)

Metodi utilizzati :

I Metodo : misura diretta dell'assorbanza a $\lambda=280$ nm

II Metodo (BCA): metodo indiretto dell'acido Bicinconinico (BCA)

A) Preparazione del campione e sua analisi spettrofotometrica:

• *Materiali:*

Lisozima a concentrazione sconosciuta

Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml, e da 2 ml,

Pipette da 20, 200 e 1000 μ l

Cuvette di quarzo da 2ml

Tampone fosfato di sodio 0,2M pH 8.0

Poiché i metodi che andremo ad utilizzare permettono di determinare la concentrazione del campione solo in una certa gamma di concentrazioni, e noi la ignoriamo, ci prepariamo delle diluizioni del campione da 1 ml, utilizzando lo schema qui sotto, per aumentare la probabilità che almeno una diluizione del campione rientri nell'intervallo utile per la determinazione della sua concentrazione.

nome	Lisozima	Vol. tampone (μ L)	Vol lisozima (μ L)	Vol. finale (mL)
Lis 1	Non diluito	0	2000	2
Lis 2	1:10			1
Lis 3	1:50			1

(Mescola bene)

(Mescola bene)

Registra uno spettro della proteina -con il campione non diluito (Lis 1) tra $\lambda=200$ nm e $\lambda=500$ nm

Riempi una cuvette (di quarzo) con 2 ml di campione e registra lo spettro come indicato. Allo spettro andrà

sottratto quello del solo tampone (metodo usato a seconda dello strumento, da -stabilirsi al sul posto).

Verifica in quale regione dello spettro la proteina è in grado di assorbire la luce.

B) Calcola la concentrazione del lisozima da valori di assorbanza a $\lambda=280$ nm (I metodo)

Materiali:

- *Provette di tipo eppendorf da 1 ml, Pipette da 20, 200 e 1000 μ l*
- *Cuvette di plastica trasparenti alle radiazioni UV (280 nm) da 1 ml*

- 1) Metodo: calcola il coefficiente di estinzione molare di lisozima a 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$) stimato dalla sequenza della proteina (in basso) utilizzando la seguente formula che tiene conto dei coefficienti di estinzione molare dei singoli amminoacidi che la compongono:

$$\epsilon_{280} = 5500 (\text{n. di Trp}) + 1490 (\text{n. di Tyr}) + 125 (\text{n. di Cys}) \quad \epsilon_{280} = \underline{\hspace{2cm}}$$

Protein names

Submitted name:

Lysozyme [EMBL ACL81761.1](#)

Gene names

Name: **LYZ** [EMBL ACL81761.1](#)

Organism

[Gallus gallus \(Chicken\)](#)

Sequence

B8YK79 [[UniParc](#)].

[FASTA](#)

Length

147

Mass (Da)

MW 14,300 Da

KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGGSTDYGILQINSRVWC
NDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNMNAWVAVWRNRCKGTDVQAWIRGCRL

Formattato: Nessun elenco puntato o numerato

Codice campo modificato

- 2) Predisponi lo strumento per la lettura a 280 nm e azzeri il valore di assorbanza con 1 ml di tampone.
- 3) Trasferisci tutto il volume (1 ml) in una cuvette (di plastica) e leggi i valori di assorbanza dei campioni LIS 1, 2 e 3 (non eliminare i campioni, ti serviranno per la prova 2 !).
- 4) Tenendo conto delle diluizioni effettuate, calcola i valori di concentrazione molare del lisozima dei campioni che hanno mostrato una assorbanza compresa tra $0,01 < A < 1$. Se più di una diluizione ha consentito di determinare una concentrazione fai una media aritmetica dei valori ottenuti.
- 5) Il valore di concentrazione trovato è: _____

C) Determina la concentrazione del lisozima con il metodo indiretto, BCA (II metodo)

Per questo metodo è necessaria una retta di calibrazione, costruita con una serie di campioni a concentrazione nota. Per la retta di calibrazione utilizziamo la siero albumina bovina (BSA) (2 mg/ml) come proteina di riferimento

◆ **Materiali:**

1 soluzione di BSA (massa molecolare 66,463 kDa) alla concentrazione di 2 mg/ml (soluzione madre).
 Tampone fosfato di sodio 0,2M -pH 8.0
 Kit BCA (Soluzione A) e (Soluzione B)
 Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml, Pipette da 20, 200 e 1000 µl, Pipetta da 10 ml
 Cuvette di plastica trasparenti alle radiazioni UV (280 nm) da 1 ml
 Incubatore a 37°C.

Formatto: Nessun elenco puntato o numerato

- 1) Metodo: prepara la serie di campioni di BSA a diversa concentrazione in un volume finale di 200 µL diluendo il campione da 2 mg/ml secondo lo schema sottostante (MESCOLA BENE !),

	Conc finale BSA (mg/mL)	Vol. tampone (µL)	Vol BSA 2 mg/ml (µL)
BSA 1(bianco)	0	200	0
BSA 2	0,05		
BSA 3	0,1		
BSA 4	0,2		
BSA 5	0,5		
BSA 6	1		

- 2) Prepara 10 ml di una soluzione di lavoro working reagent (WR) unendo la soluzione A e la soluzione B del kit BCA in un rapporto di 50:1 (49 parti di A e 1 di B) (MESCOLA BENE).
- 3) Prepara una serie di 9 provette numerate, contrassegnale per distinguerne il contenuto (esempio: BSA 1-6, LIS 1-3) e trasferisci in ognuna 50 µL di uno dei 6 campioni di BSA o di ognuno dei 3 campioni di lisozima preparati in precedenza (esempio: BSA 1-6, LIS 1-3).
- 4) Aggiungi 1 ml della WR ad ognuna delle 9 provette contenenti le proteine e mescola bene.
- 5) Metti ad incubare i campioni per 30 minuti a 37°C.
- 6) Leggi le assorbanze a $\lambda = 562$ nm di tutti i campioni (azzerare lo strumento con il bianco, BSA1)
- 7) Costruisci la retta di calibrazione con le Abs ottenute in funzione delle concentrazioni di BSA.
- 8) Calcola le concentrazioni dei campioni LIS1-3 in base all'interpolazione sulla retta di calibrazione
- 9) Tenendo conto delle diluizioni effettuate calcola i valori di concentrazione del campione di lisozima di partenza. Se più di un campione di LIS ricade nei valori della retta fai la media dei valori di concentrazione ottenuti.
- 10) Trasforma il valore trovato (mg/ml) in concentrazione molare. IL valore di concentrazione trovato è:

Confronta i risultati ottenuti con i due metodi