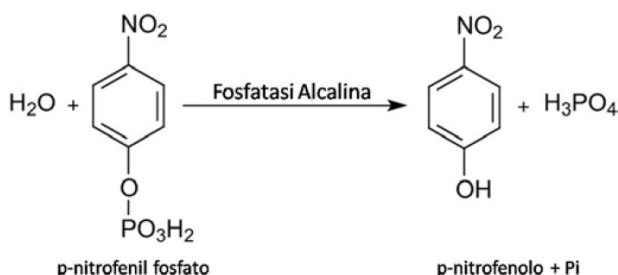
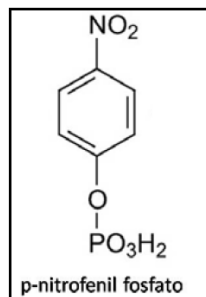


Cinetica enzimatica – Determinazione K_m e V_{max} della Fosfatasi Alcalina

La fosfatasi alcalina è un enzima che appartiene alla classe delle idrolasi ed è responsabile della rimozione di gruppi fosfato da diversi tipi di molecole. Come indica il nome, la massima efficienza di questo enzima si ottiene a pH basici (pH 8-10). Per la sua attività catalitica necessita della presenza di tre ioni metallici a livello di ogni sito attivo, due ioni Zn^{2+} e uno ione Mg^{2+} . Idrolizza monoesteri fosfato producendo fosfato inorganico (Pi) e un alcol (R-OH).

Noi useremo la fosfatasi per convertire il para-nitrofenil fosfato in para-nitrofenolo, un composto colorato.



Materiali: Fosfatasi alcalina 250 $\mu\text{g/mL}$; Tris 500 mM pH 9.1 + $MgCl_2$ 5mM; p-nitrofenil-fosfato(PNPP)4 mM; acqua deionizzata; $ZnCl_2$ 0,25 M; NaOH 2 M.

- 1) Prelevare 10 ml del vostro tampone (Tris) e metterli in un tubo da 15 ml. Aggiungervi poi un quantitativo di $ZnCl_2$ tale che la concentrazione finale di $ZnCl_2$ sia 0,5 mM. Da ora in poi usare solo il tampone cui si è aggiunto lo zinco.
- 2) Preparare in provetta 2 mL delle seguenti miscele di reazione, calcolando i volumi di ciascun reagente da trasferire partendo dalle soluzioni concentrate a vostra disposizione. Mescolare!

	Campioni								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Bianco1
Substrato (PNPP)	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM	80 μM	160 μM	320 μM	640 μM	0 μM
	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	0 μL
Tampone 100 mM	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL
H₂O (a Vf 2 mL))	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL	 μL

- 3) Partendo da ciascuno dei campioni appena preparati al punto 2), trasferire 1 mL delle miscele di reazione in una provetta da 1,5 mL marcata con lo stesso nome della miscela di partenza.
- 4) Aggiungere a tutti i campioni un volume di fosfatasi alcalina tale che la sua concentrazione finale sia 5 $\mu\text{g/mL}$ tranne che nel Bianco, cui si aggiunga al posto della fosfatasi un pari volume di tampone.
Attenzione: aggiungere rapidamente l'enzima in tutti i campioni e mescolare!!
- 5) Incubare i campioni a 37°C per 10 min.
- 6) Finita l'incubazione, aggiungere rapidamente 100 μL di NaOH 2M in ciascun campione per fermare la reazione, mescolare e trasferire 1 mL di ciascun campione in cuvette.
- 7) Leggere l'assorbanza dei campioni a 405 nm.
- 8) Calcolare la concentrazione di paranitrofenolo ottenuto dalla reazione dei vari campioni sfruttando la legge di Lambert-Beer, sapendo che il suo coefficiente di estinzione molare (ϵ) a 405 nm è 18500.
- 9) Note le concentrazioni, dividere questi valori per il tempo trascorso in incubazione per calcolare la velocità di reazione dell'enzima (v) in $\mu\text{mol/min}$.

- 10) Mettere in grafico in ascissa i valori di concentrazione di substrato usati $[s]$ ed i valori di velocità di reazione v ottenuti in ordinata. Verificare se si ottiene una curva parabolica.
 - 11) Passare poi al tipo di grafico di Lineweaver-Burk dei doppi reciproci, riportando su un altro grafico i reciproci dei vostri valori, ponendo quindi in ascissa $1/[s]$ ed in ordinata $1/v$.
 - 12) Calcolare l'equazione della retta di tendenza ottenuta sulla base dei vostri punti. L'intersezione di tale retta con l'asse y indica $1/V_{\max}$ mentre l'intersezione con l'asse x indica $-1/K_m$.
 - 13) Calcolare di conseguenza $V_{\max}$ e K_m . Riportare i risultati.
-

OPZIONALE:

- 14) Partendo dal residuo delle miscele di reazione già preparate, ripetere il protocollo dal punto 4) in poi, ma modificando le condizioni di incubazione.
- 15) Dopo aver ricavato assorbanze, concentrazioni, $V_{\max}$ e K_m , valutare se la modifica ha avuto effetto sulla reazione. Se sì quale? E perchè?