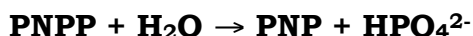




Misurazione sperimentale dei parametri cinetici della FOSFATASI ALCALINA

Reazione chimica



Strumentazione e reagenti

Spettrofotometro UV/Vis; cuvette di plastica monouso; pipette da 1000, 200, 20 μL con relativi puntali.

Paranitrofenolfosfato (PNPP) PM 371.12 (+ 4°C)

Acqua bidistillata

Soluzione **100 mM** di sodio borato a pH 9.0

Soluzione **100 mM** di MgCl_2

Sospensione di fosfatasi alcalina (ALP) (4°C)

Soluzioni da preparare

1. PNPP Stock solution

PNPP 50 mM (5 mL)

2. PNPP working solutions 2X

1. PNPP 50 mM (2 mL)

2. PNPP 25 mM (2 mL)

3. PNPP 5 mM (2 mL)

4. PNPP 2 mM (2 mL)

5. PNPP 1 mM (2 mL)

3. Dilution Buffer 2X (20 mL)

100 mM sodio borato pH 9, 4 mM MgCl_2 (20 mL)

4. ALP working solution 200X (300 μL)

1 μL di ALP stock in 299 μL di Dilution Buffer 2X

Analisi cinetica della reazione

Dopo aver programmato lo strumento, aggiungere in successione in una cuvetta di plastica:

500 μL di PNPP x mM

500 μL di Dilution Buffer 2X

Aggiungere

5 μL di ALP working solution 200X

Invertire un paio di volte la cuvetta chiudendola con un pezzetto di parafilm. Mettere la cuvetta nell'apposito alloggiamento dello spettrofotometro.

Settare il bianco premendo il tasto **BLANK**.

Premere il tasto **START** per leggere l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 405 nm ogni 5 secondi per 1 minuto. Leggere il valore di $\Delta A/\Delta t$ cliccando sul tasto **CURSORS**.

CALCOLO VELOCITÀ INIZIALE DELLA REAZIONE

$A = C \times \epsilon \times d$ (legge di Lambert-Beer)

$\Delta A/\Delta t$ (assorbanza/min) = variazione di assorbanza al minuto

ϵ = coefficiente di estinzione molare per PNP = $18.81 \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d = cammino ottico = 1 cm

$$V_o = \Delta A/\Delta t * 0.05316 \text{ (mM/min)}$$

Tabella dei dati sperimentali

[S] (mM)	$\Delta A/\Delta t$ (Ads/min)			V_o			1/[S]	1/ V_o
25								
12.5								
2.5								
1								
0.5								

Ricavare la curva standard graficando i dati con Excel. Verificare la linearità della curva mediante il parametro di correlazione lineare (R). Spazi grigi riservati ai dati cinetici in presenza di inibitore.

Nome e Cognome:

Data: