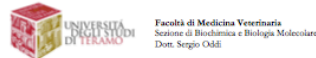


# **ESERCITAZIONE**

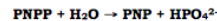
**Misurazione sperimentale dei  
parametri cinetici della fosfatasi  
alcalina**

# Misurazione sperimentale dei parametri cinetici della Fosfatasi Alcalina (ALP)



## 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  $\mu\text{L}$  con relativi puntali.  
 Parantirofenolfosfato (PNPP) PM 371.12 (+ 4°C)  
 Acqua bidistillata  
 Soluzione 100 mM di sodio borato a pH 9.0  
 Soluzione 100 mM di  $\text{MgCl}_2$   
 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  $\text{MgCl}_2$  (20 mL)

- 4. ALP working solution 200X (300  $\mu\text{L}$ )**  
1  $\mu\text{L}$  di ALP stock in 299  $\mu\text{L}$  di Dilution Buffer 2X

### Analisi cinetica della reazione

Dopo aver programmato lo strumento, aggiungere in successione in una cuvetta di plastica:  
 500  $\mu\text{L}$  di PNPP x mM  
 500  $\mu\text{L}$  di Dilution Buffer 2X

### Aggiungere

5  $\mu\text{L}$  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  
 $\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare per PNP =  $18.81 \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$   
 $d$  = cammino ottico = 1 cm

$$V_0 = \Delta A/\Delta t \cdot 0.05316 \text{ (mM/min)}$$

Tabella dei dati sperimentali

[S] (mM)	$\Delta A/\Delta t$ (Ads/min)	$V_0$	1/[S]	1/ $V_0$
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:

# Analisi dei dati

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: