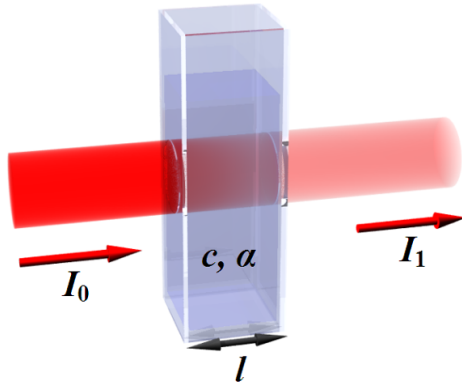


# **Spettrofotometria**

Esercitazione di biochimica clinica

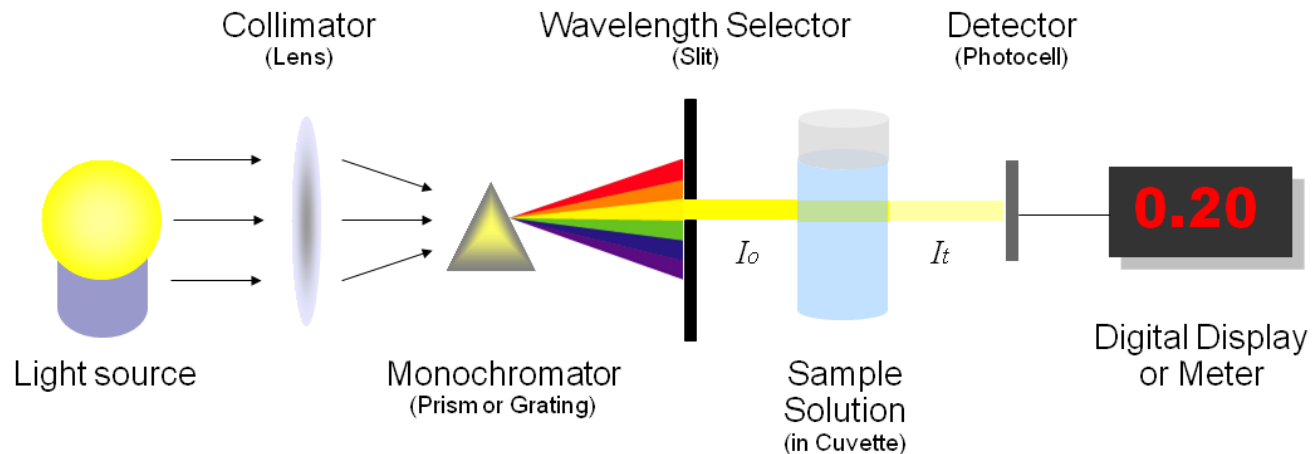
# Saggio Spettrofotometrico

Spesso si usano metodi spettrofotometrici per monitorare le reazioni enzimatiche. Questi possono essere molto convenienti se il substrato o il prodotto contengono un gruppo cromoforo (o fluoroforo) distinto.



Assorbimento della radiazione UV/visibile dovuto a transizioni energetiche degli elettroni degli strati esterni delle molecole. Quando la luce colpisce una molecola essa può essere trasmessa (nessuna interazione) o assorbita.

Il livello di assorbimento della radiazione che attraversa un campione di sostanza in soluzione viene misurato da uno strumento noto come spettrofotometro.



# Legge di Lambert e Beer

L'assorbimento di radiazione luminosa da parte di una sostanza in soluzione viene descritto quantitativamente con la legge di Lambert e Beer, l'equazione fondamentale delle analisi spettrofotometriche.

A= Assorbanza (o densità ottica); è un numero adimensionale, il cui valore varia linearmente con la concentrazione della soluzione.

$$A = \epsilon d C$$

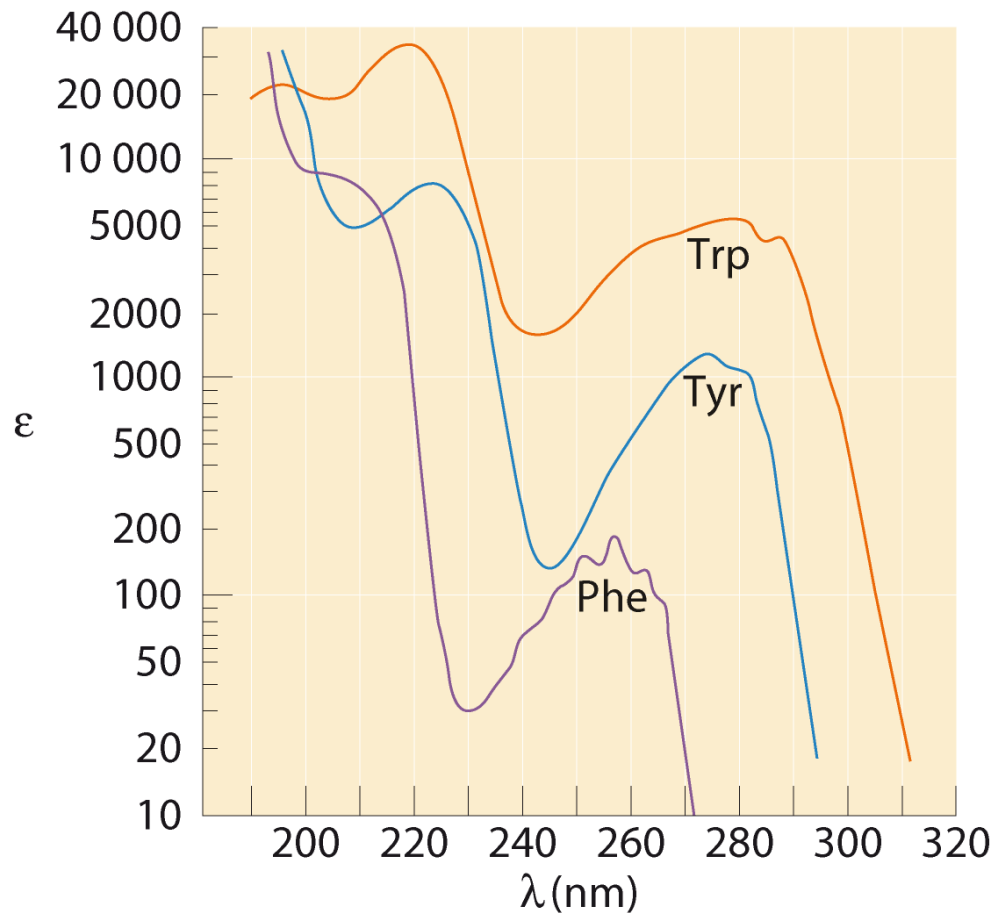
$\epsilon$ =Coefficiente di estinzione molare ( $\text{mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ); la densità ottica di una soluzione a concentrazione unitaria e misurata in un cammino ottico lungo 1 cm. È una costante specifica di ogni sostanza a una data lunghezza d'onda.

d=Cammino ottico della soluzione (cm).

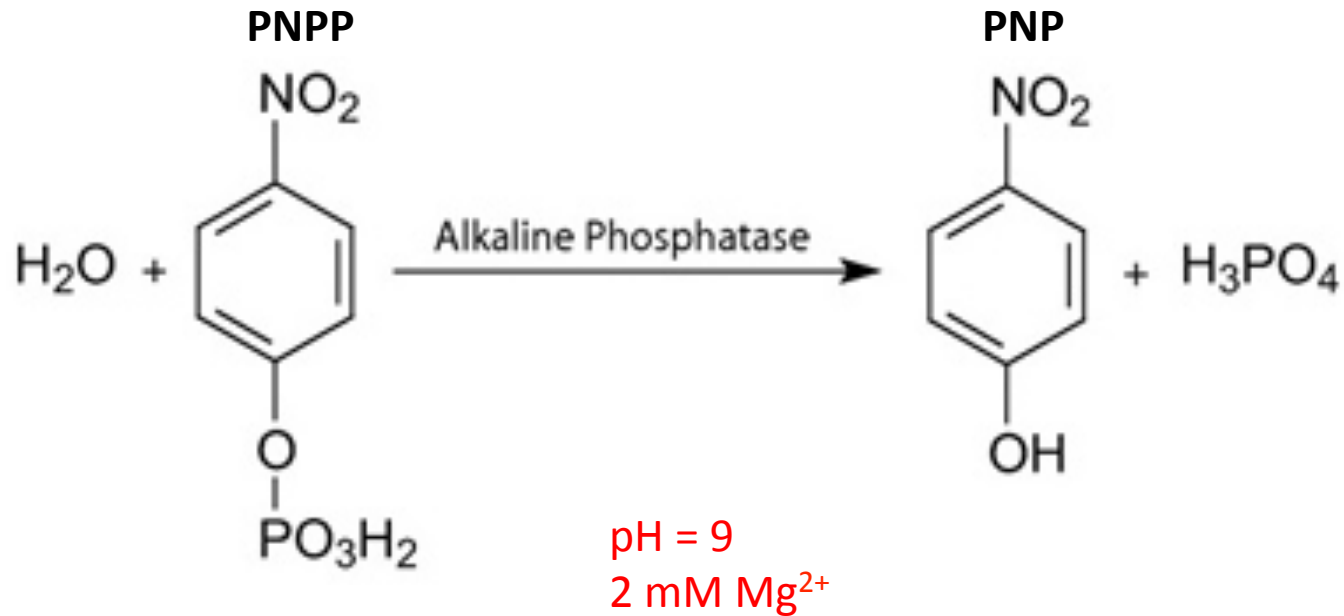
C=Concentrazione della soluzione della sostanza (mM)

# Analisi delle proteine – Spettrofotometria

## Spettro di assorbimento degli amminoacidi aromatici

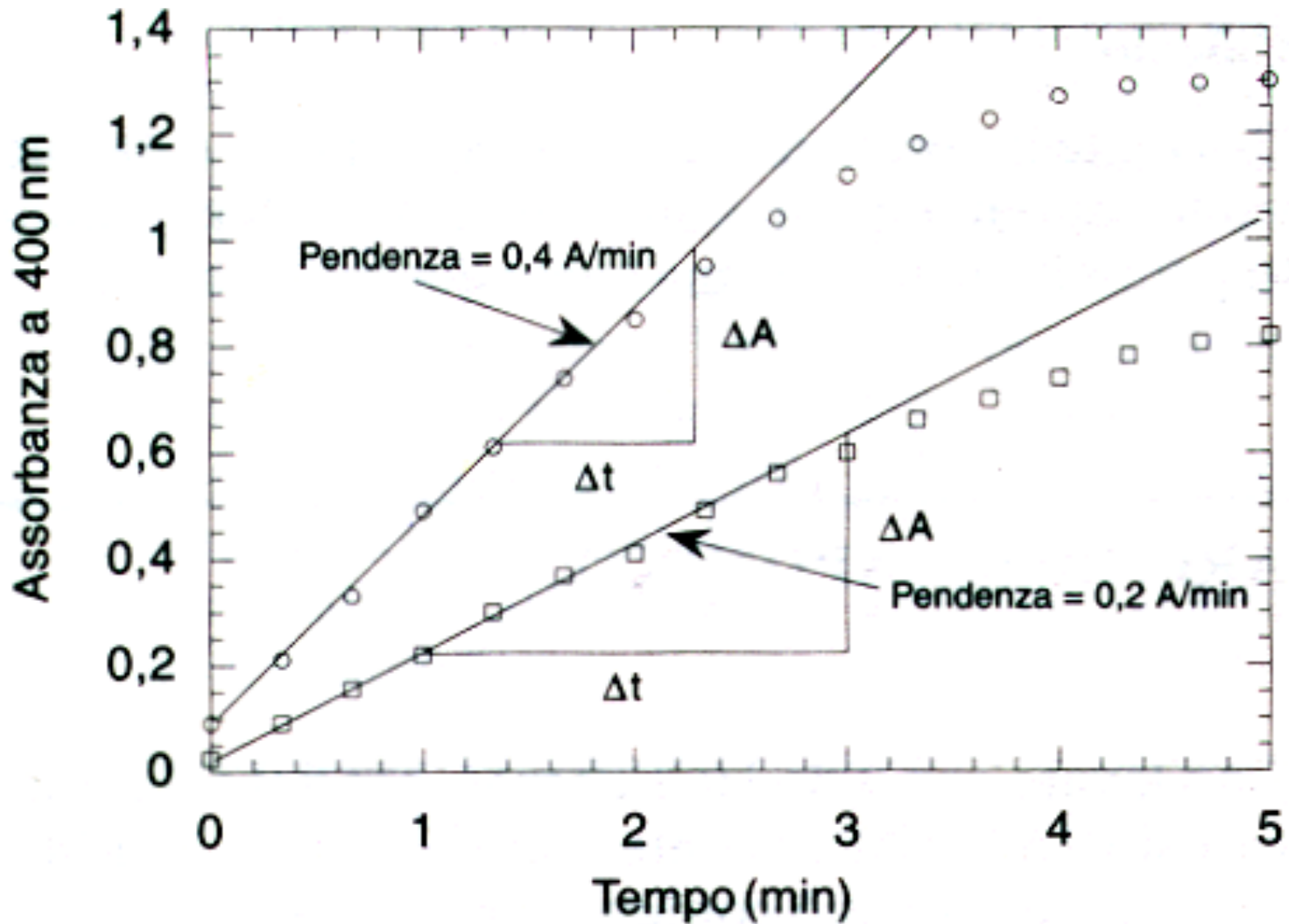


# Reazione usata per la misura dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina



La fosfatasi alcalina è un enzima Mg-dipendente che catalizza l'idrolisi di tutti i fosfomonoesteri. Si esegue il saggio enzimatico con un composto non naturale sintetizzato chimicamente: il p-nitrofenilfosfato (PNPP) che viene idrolizzato a p-nitrofenolo (PNP) e fosfato (P<sub>i</sub>). La forma ionica del PNP è colorata (massimo di assorbimento a 405 nm) quindi la reazione può essere misurata spettrofotometricamente.

Poiché la variazione di  $[S]$  rispetto a  $t$  è pressoché lineare nelle fasi iniziali è possibile eseguire analisi accurate di  $V$  in funzione di  $[S]$ .



$$A = \varepsilon dC$$

$$\Delta C = C_2 - C_1 = \frac{A_2}{d\varepsilon} - \frac{A_1}{d\varepsilon} = \frac{\Delta A}{d\varepsilon}$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{d\varepsilon}$$

$$d = 1\text{cm}$$

$$\varepsilon_{405} = 18.81\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$V_0 = \frac{\Delta A}{\Delta t} 0.05316$$

Una volta ottenuti i dati riguardo l'andamento di V in funzione di [S] come è possibile determinare  $K_M$  e  $k_{cat}$ ? Comunemente viene usato il **grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk** che è un riarrangiamento dell'equazione di Michaelis-Menten:

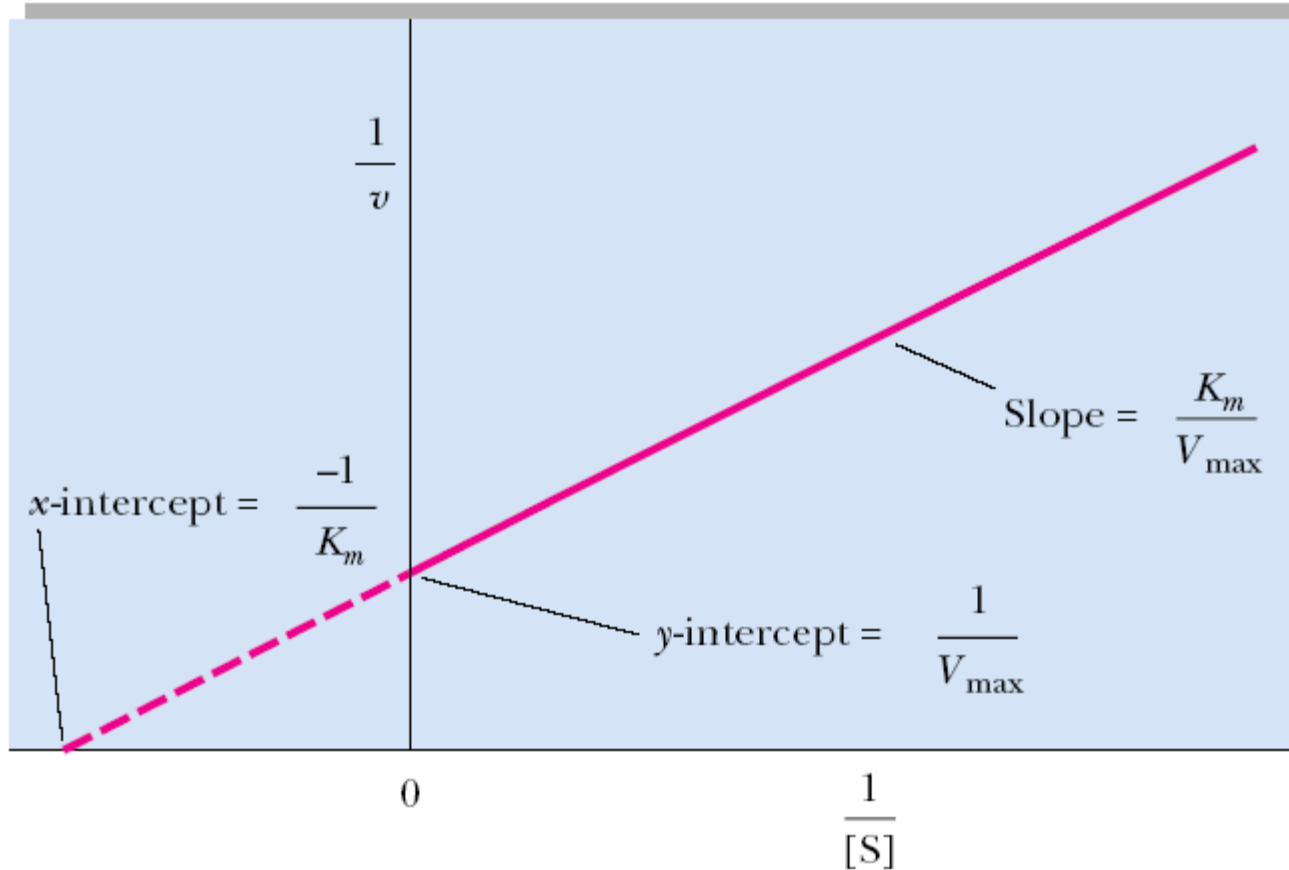
$$1/V = (K_M + [S]) / (V_{max}[S]) = K_M / (V_{max}[S]) + [S] / (V_{max}[S])$$

Ovvero:

$$1/V = K_M / (V_{max}[S]) + 1 / V_{max}$$



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



Quando  $1/[S] = 0$  significa che  $[S]$  è infinitamente grande e la velocità di reazione è al suo valore massimo. Si noti che avendo  $V_{\max}$  e  $[E]_t$  si può calcolare  $k_{\text{cat}}$ , sapendo che  $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_t$ .

Per ottenere il valore di  $K_m$  estrapoliamo il grafico di Lineweaver-Burk a un punto ipotetico in cui  $1/v=0$ .

# Strumentazione e reagenti

Spettrofotometro UV/Vis; cuvette di plastica monouso;  
pipette da 1000, 200, 20  $\mu\text{L}$  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  $\text{MgCl}_2$

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

# Soluzioni da preparare (i fattori di diluizione)

## Soluzioni da preparare

### 1. PNPP Stock solution

PNPP 50 mM (5 mL)

### 2. PNPP working solutions 2X

PNPP 50 mM (2 mL)

PNPP 25 mM (2 mL)

PNPP 5 mM (2 mL)

PNPP 2 mM (2 mL)

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

# Procedura operativa

## 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

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

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

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

$d$  = cammino ottico = 1 cm

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