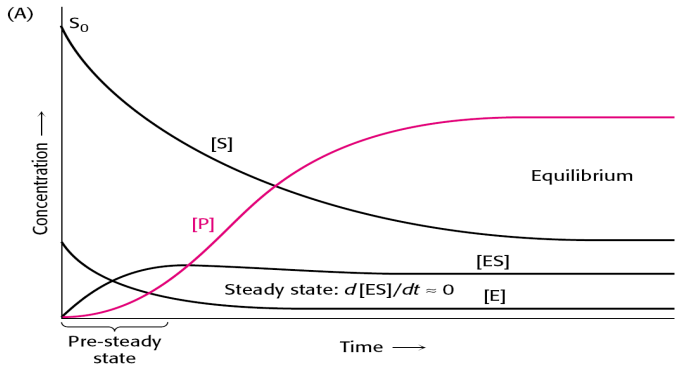
ESERCITAZIONE:
Misurazione sperimentale dei parametri cinetici della fosfatasi alcalina

Misure sperimentali e analisi dei dati cinetici

Per misurare la velocità di reazione abbiamo bisogno di un sistema per seguire la formazione del prodotto o il consumo di substrato.

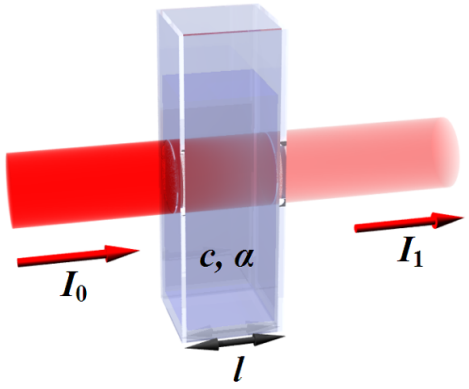
Via via che il substrato viene consumato la velocità diminuisce fino a quando alla fine viene raggiunto l'equilibrio.



Di regola, si preferisce predisporre una serie di esperimenti tutti alla stessa concentrazione di enzima, ma a diverse concentrazioni di substrato e misurare la velocità iniziale (V_0).

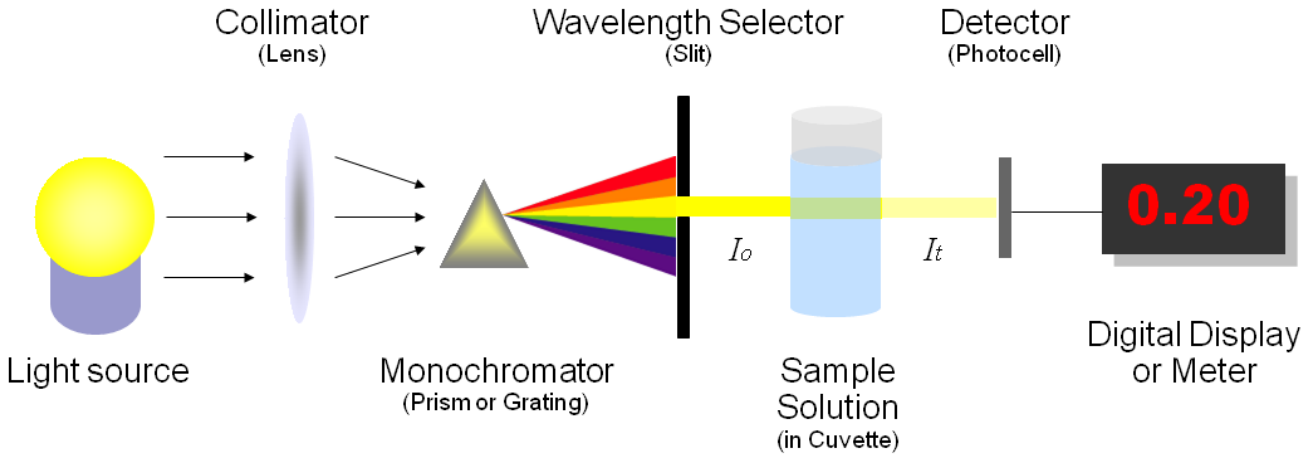
Saggio Spettrofotometrico

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 della spettrofotometria.

$$A = \varepsilon d C$$

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

ε=Coefficiente di estinzione molare ($mM^{-1}xcm^{-1}$); 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)