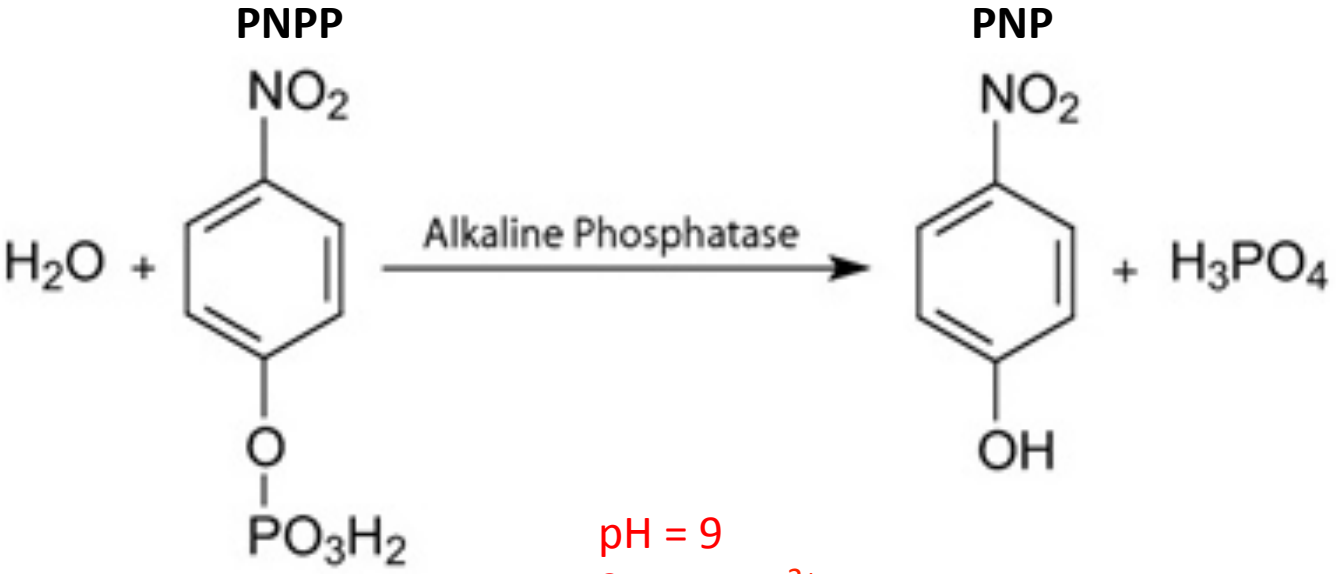
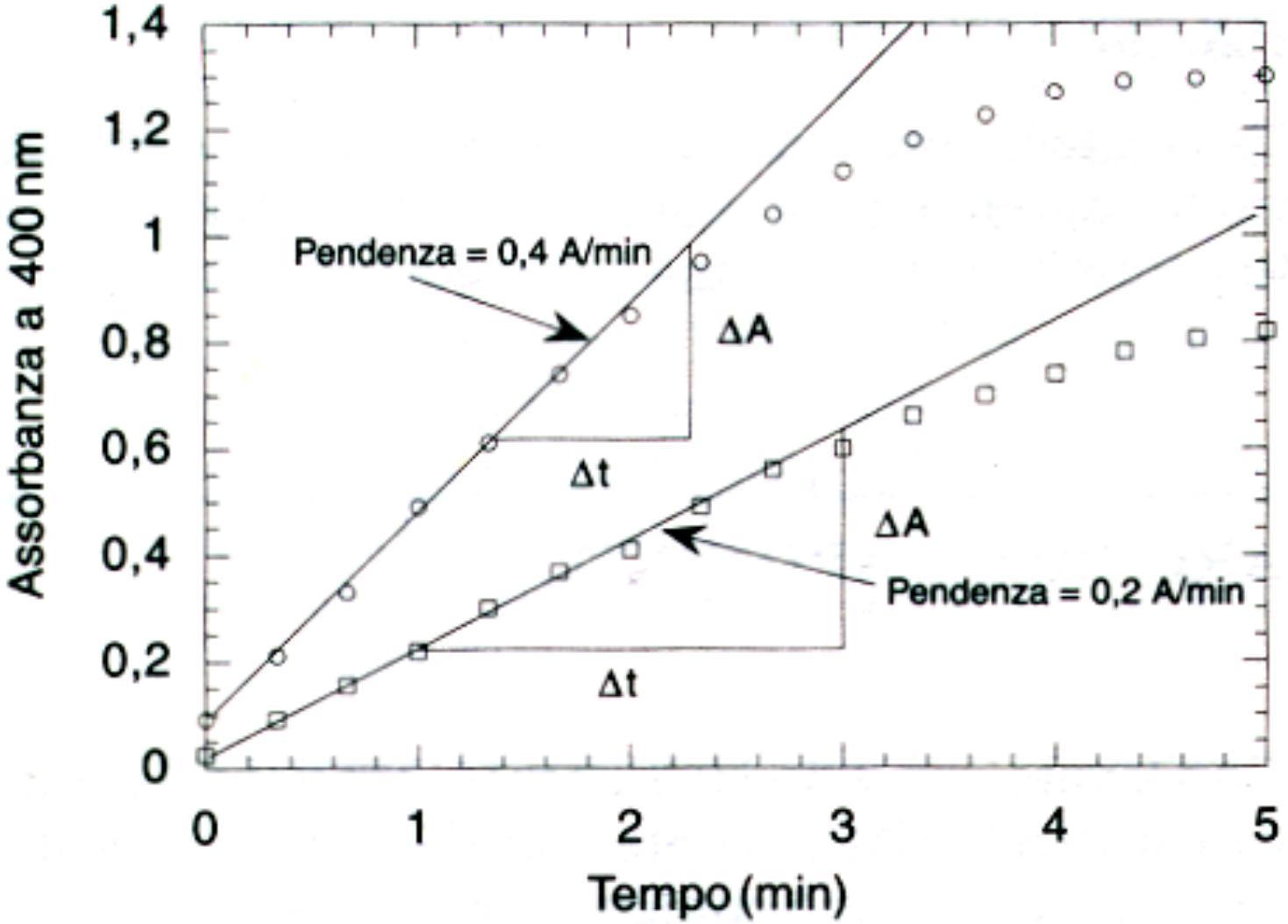
Reazione usata per la misura dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina



pH = 9
2 mM Mg^{2+}

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_i). 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].



$$A = \varepsilon d C$$

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

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

$d = 1cm$

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

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

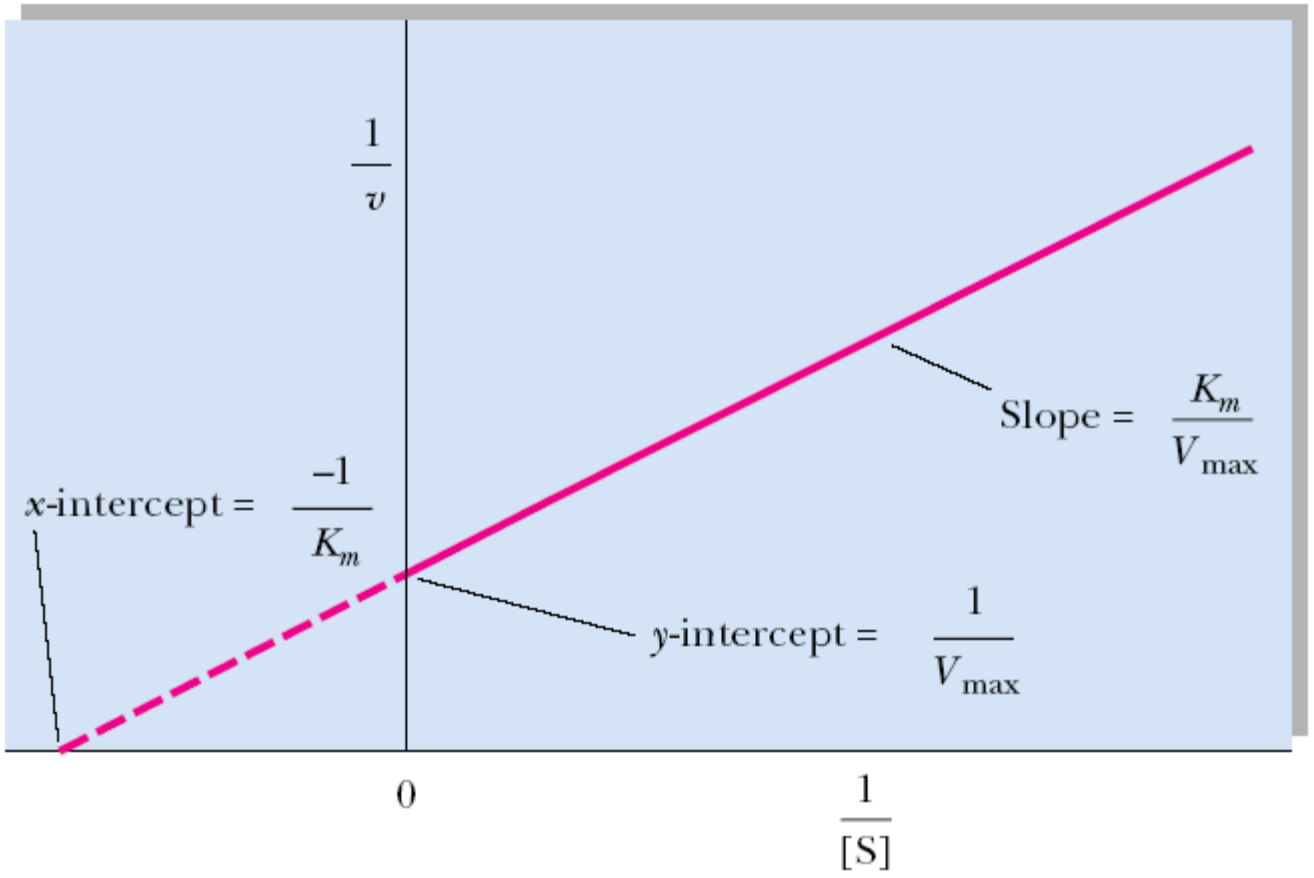
Una volta ottenuti i dati riguardo l'andamento di V in funzione di [S] come è possibile determinare K_M e k_{cat}? Comunemente viene usato il grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk che è un riarrangiamento dell'equazione di Michaelis-Menten:

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

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_{cat}, sapendo che $V_{max} = k_{cat}[E]_t$.

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 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 (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 $MgCl_2$ (20 mL)

4. ALP working solution 200X (300 μL)

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

Procedura operativa

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

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

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

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

d = cammino ottico = 1 cm

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