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

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
Facoltà di Medicina Veterinaria
Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Dott. Sergio Oddi

**Misurazione sperimentale dei parametri cinetici della FOSFATASI ALCALINA**

**Reazione chimica**

$$PNPP + H_2O \rightarrow PNP + HPO_4^{2-}$$

**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 ΔA/Δt cliccando sul tasto CURSORS.

**CALCOLO VELOCITÀ INIZIALE DELLA REAZIONE**
A = C x ε x d (legge di Lambert-Beer)
ΔA/Δt (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

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

**Tabella dei dati sperimentali**

| [S] (mM) | ΔA/Δt (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:**

# Analisi dei dati

**Tabella dei dati sperimentali**

| [S] (mM) | ΔA/Δt (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:**