

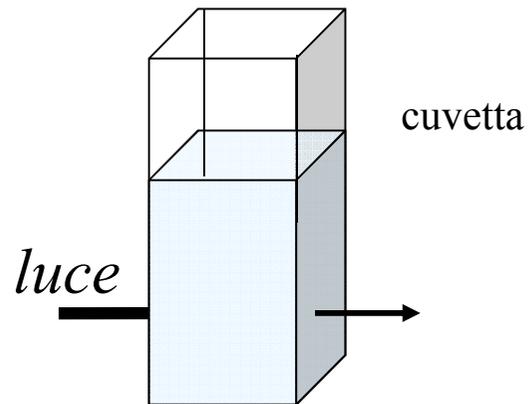
Il dosaggio enzimatico

Eseguire un dosaggio di un enzima in un campione biologico o in un diverso preparato significa misurare la concentrazione di un quell'enzima in termini di attività catalitica presente in quel campione o preparato

Oltre il 90% degli enzimi si possono dosare con il metodo spettrofotometrico.

Mescolo in una cuvetta opportune quantità di campione e substrato in un sistema tamponato e misuro l'assorbanza tramite spettrofotometro.

Si può misurare l'assorbanza del substrato che diminuisce o quella del prodotto che aumenta.



Per i calcoli mi avvalgo della legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

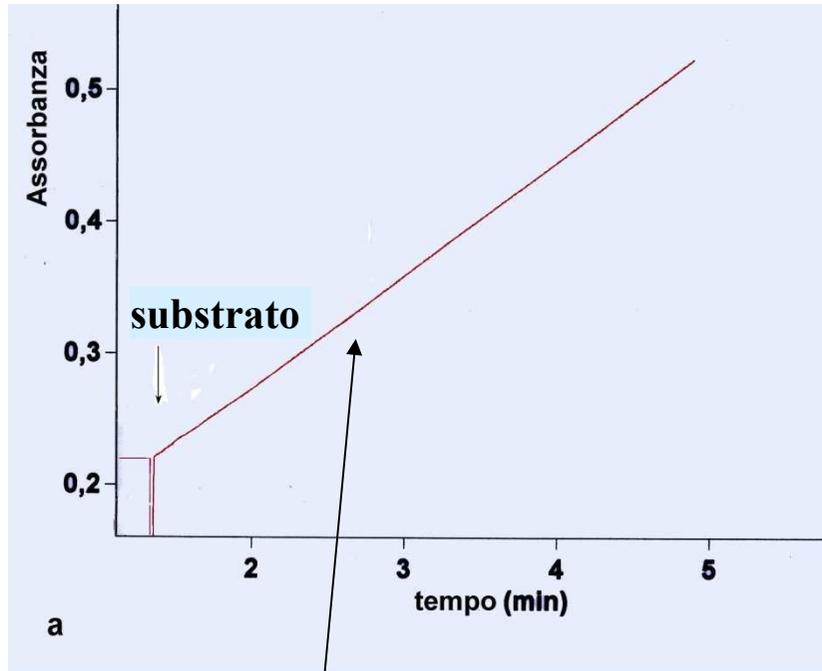
A, assorbanza

d, spessore della cuvetta, in genere 1 cm

c, concentrazione della sostanza che assorbe (mM)

ε , coefficiente di assorbanza della sostanza (mM⁻¹ cm⁻¹)

Esempio di tracciato:



Si rileva l'assorbanza del prodotto che si forma

L'assorbanza è misurata in tempo reale.

La pendenza del tracciato dipende solo dal volume di campione contenente l'enzima che è aggiunto (**pH costante, T costante, substrato saturante**)

stato stazionario:

prodotto che si forma nel tempo a velocità costante

Calcoli

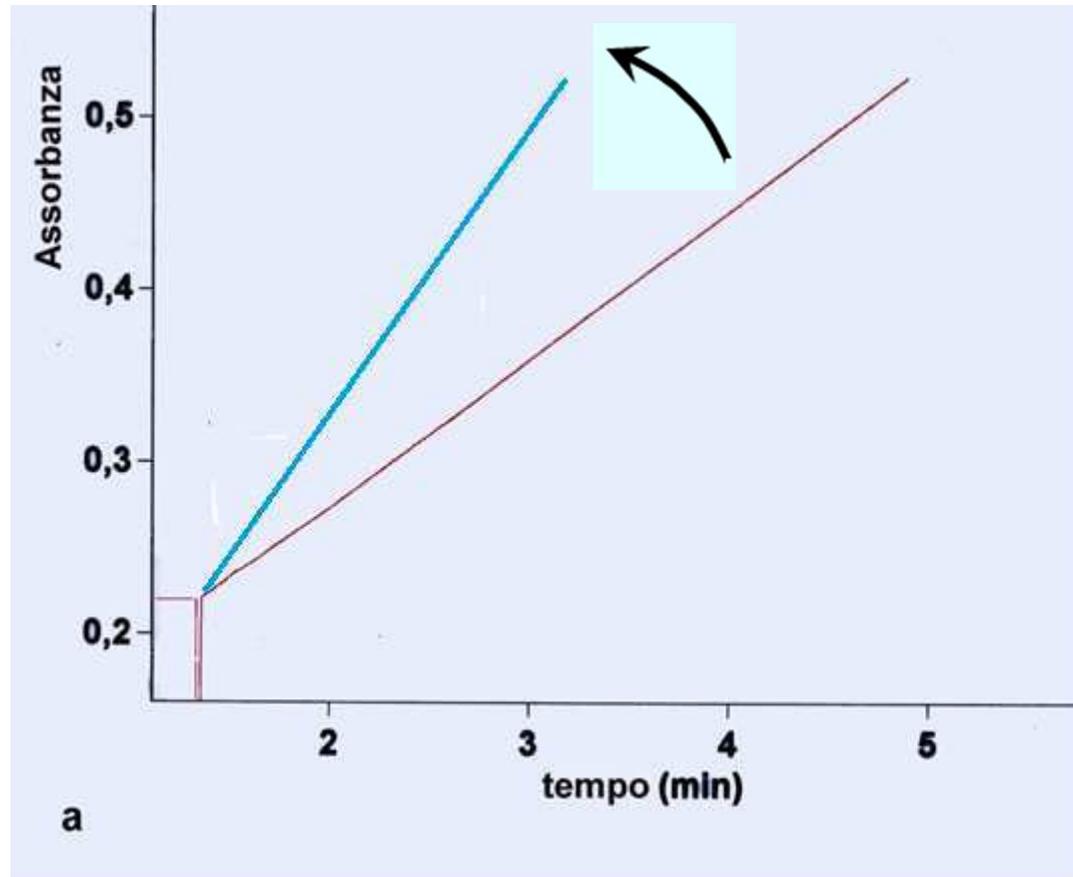
Poiché siamo allo stato stazionario e la variazione di assorbanza è lineare, vale la seguente relazione:

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

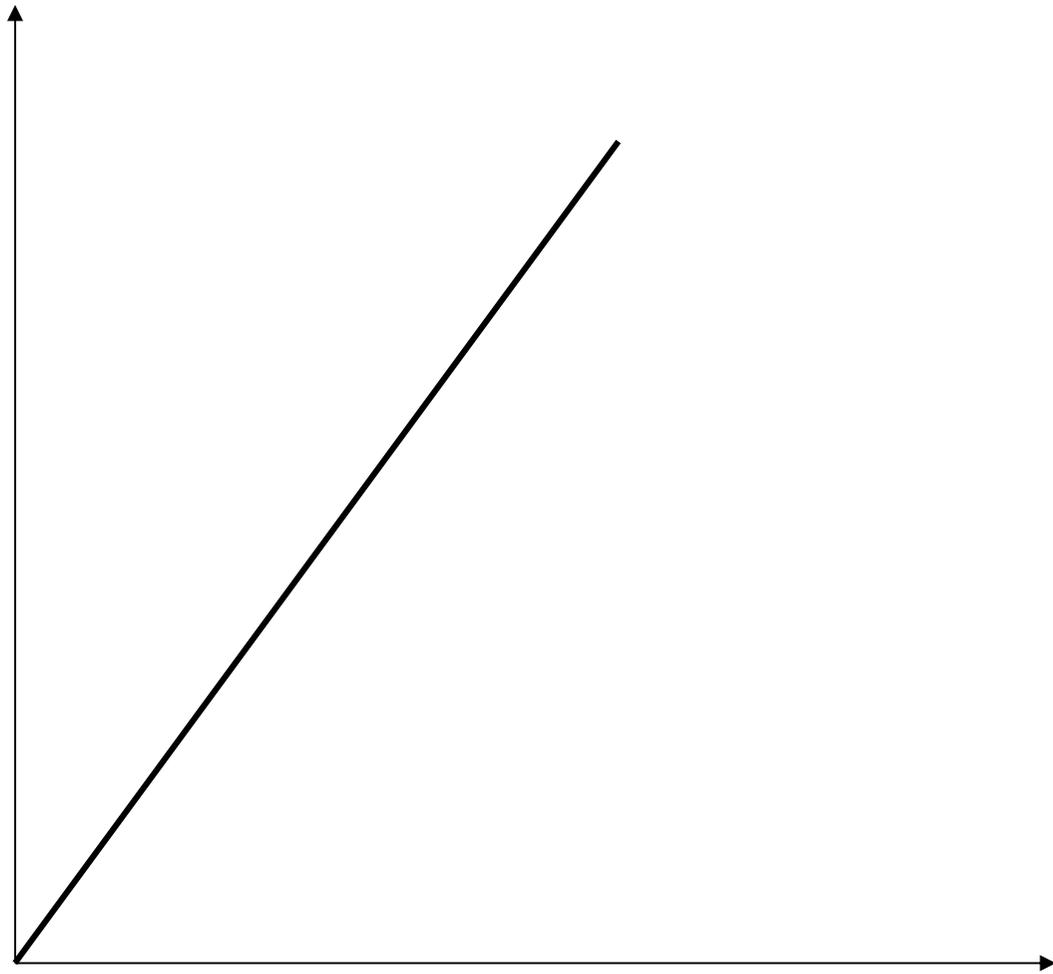
$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon \cdot d}$$

$$v_0 = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \cdot d}$$

La variazione di assorbanza dipende dal volume di enzima



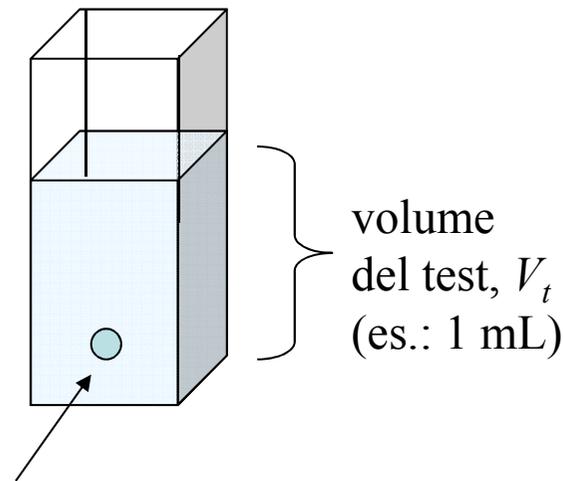
v_0



volume di enzima aggiunto

Per esprimere l'attività per mL di campione occorre tener conto della diluizione:

$$v_0 = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{V_t}{V_c}$$



volume del campione enzimatico (V_c)
(di solito 0.1-5% del volume del test)

Un semplice esempio numerico

Volume del test = 1 mL
coefficiente e spessore = 1

| volume di campione | $\Delta A/\text{min}$ | U/mL (in cuvetta) | U/mL (nel campione) |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|--|
| 10 μL | 0.1 | $\frac{0.1}{1 \cdot 1} = 0.1$ | $\frac{0.1}{1 \cdot 1} \cdot \frac{1000}{10} = 10$ |
| 20 μL | 0.2 | $\frac{0.2}{1 \cdot 1} = 0.2$ | $\frac{0.2}{1 \cdot 1} \cdot \frac{1000}{20} = 10$ |

La variabile concentrazione di substrato

Per essere sicuri di misurare tutto l'enzima presente occorre lavorare in condizioni di substrato saturante

Conoscendo la K_m è possibile impostare la condizione saturante

Ad esempio:

$$v_0 = \frac{V_{\max} 100K_m}{K_m + 100K_m} = \frac{100}{101} V_{\max} \approx V_{\max}$$

Unità di misura dell'attività enzimatica

- si esprime in **unità di attività** e si indica con **U**
- 1 U è quella quantità di enzima che trasforma 1 μ mole di substrato in 1 minuto
- Nel sistema SI si usa il *katal*:

1 katal (kat) = 1 mole/1sec (poco utilizzato: è come misurare la lunghezza di un tavolo in chilometri!)

– 1 U/mL = 16.7 nkat/mL

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta A/\text{min} \cdot V_t}{\varepsilon \cdot d \cdot V_c}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{U}{mL} / \frac{mg_{\text{proteine}}}{mL}$$



Attività specifica

Il metodo finora illustrato è anche detto **metodo cinetico** perché si basa sulla misura della velocità iniziale

Spesso, per problemi tecnici o pratici si è costretti o si preferisce misurare l'assorbanza dopo un tempo prestabilito. Il ΔA sarà in questo caso rispetto al tempo zero.

Ciò è lecito purché si sia verificato che il tempo scelto cada nella zona di linearità.

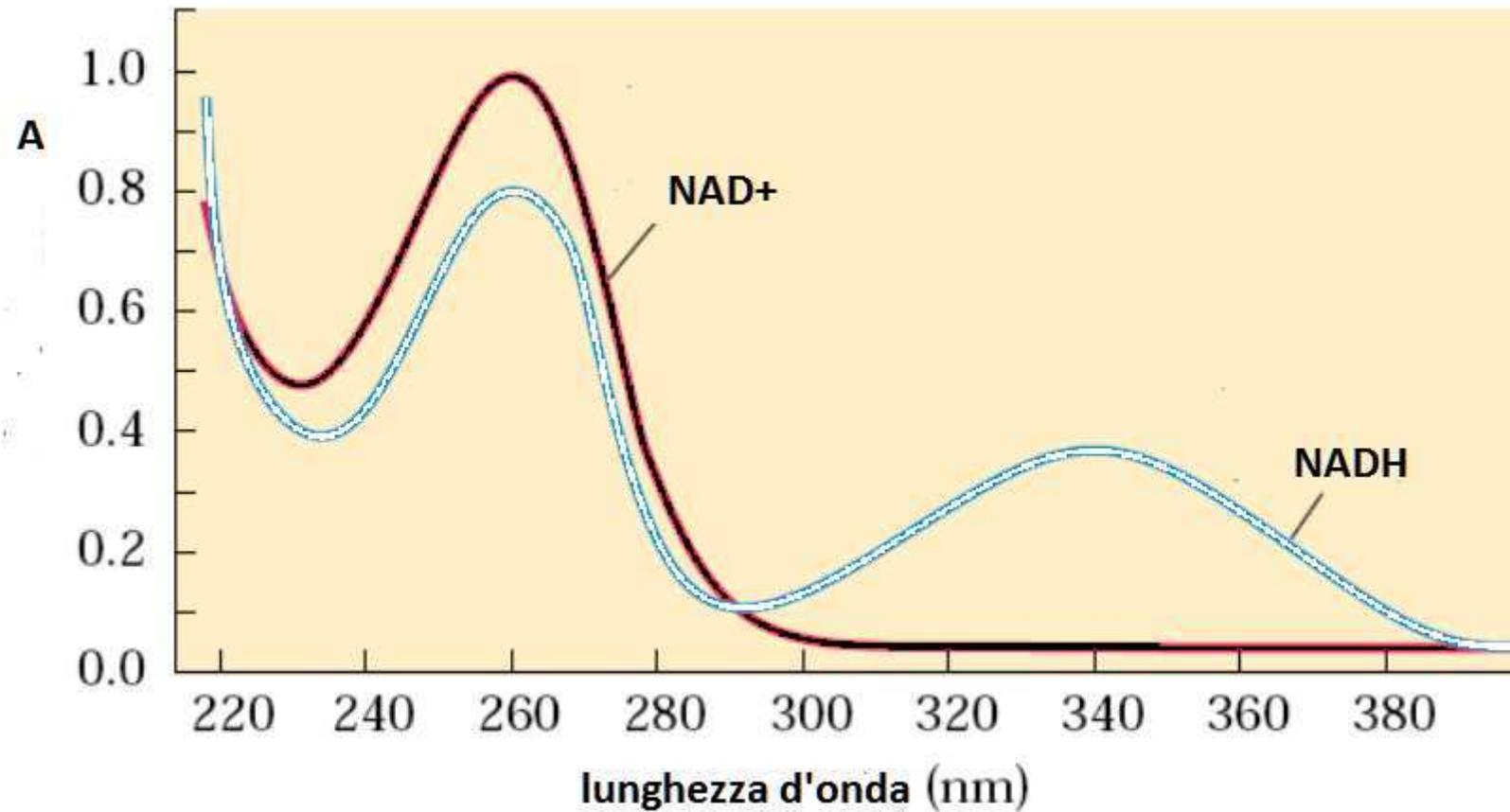
Per concludere:

Misurare l'attività enzimatica in termini di U equivale ad eseguire un dosaggio enzimatico.

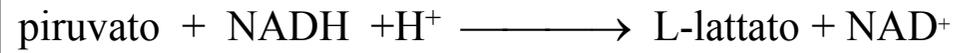
Per dosare un enzima non è necessario purificarlo,
Il dosaggio può essere eseguito in un campione eterogeneo purché si disponga di metodo specifico
ossia si utilizzi un substrato specifico

Si può utilizzare un metodo cinetico (calcolo della velocità iniziale) o un metodo a tempo fisso

Molti dosaggi enzimatici sfruttano
l'assorbimento del NADH a 340 nm

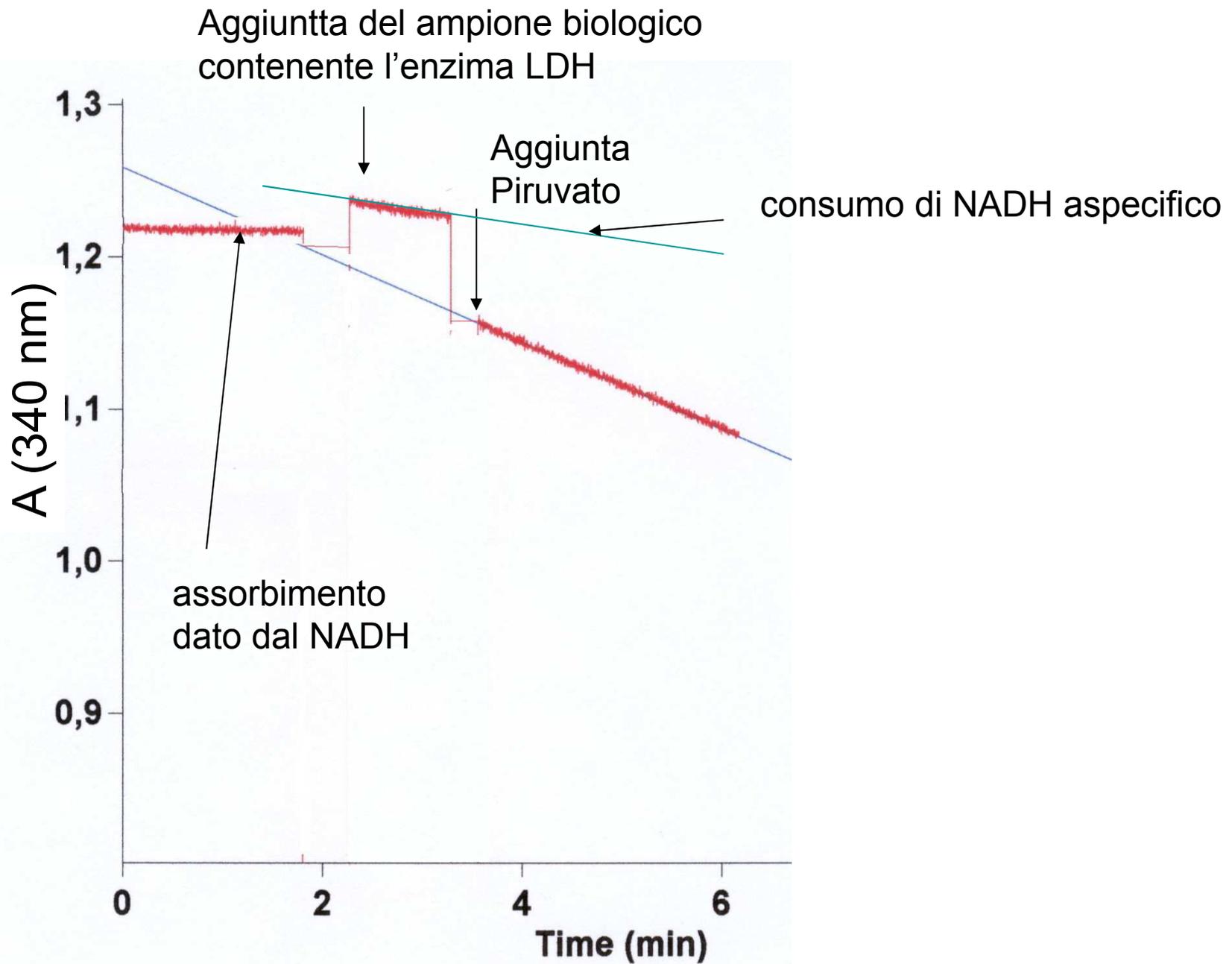


Esempio di dosaggio. Lattato deidrogenasi (LDH)



| | mM iniziale | μl | mM finale |
|--------------------|----------------|---------------|--------------|
| Tampone | | | |
| K-fosfato, pH 7 | 100 | 850 | 85 |
| NADH | 10 | 20 | 0.2 |
| Piruvato | 10 | 60 | 0.6 |
| *Campione | | x | |
| H ₂ O | | 70 - x | |
| Tot | | 1000 | |

$$\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.3 \text{ (mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}\text{)}$$



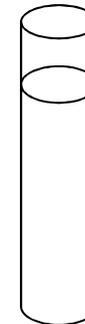
Aggiungere ad una serie di provette un volume fisso di reattivo e volumi crescenti di una proteina standard; pareggiare con acqua

Qui aggiungere un volume del campione da msurare (dosare)

qui solo acqua



bianco

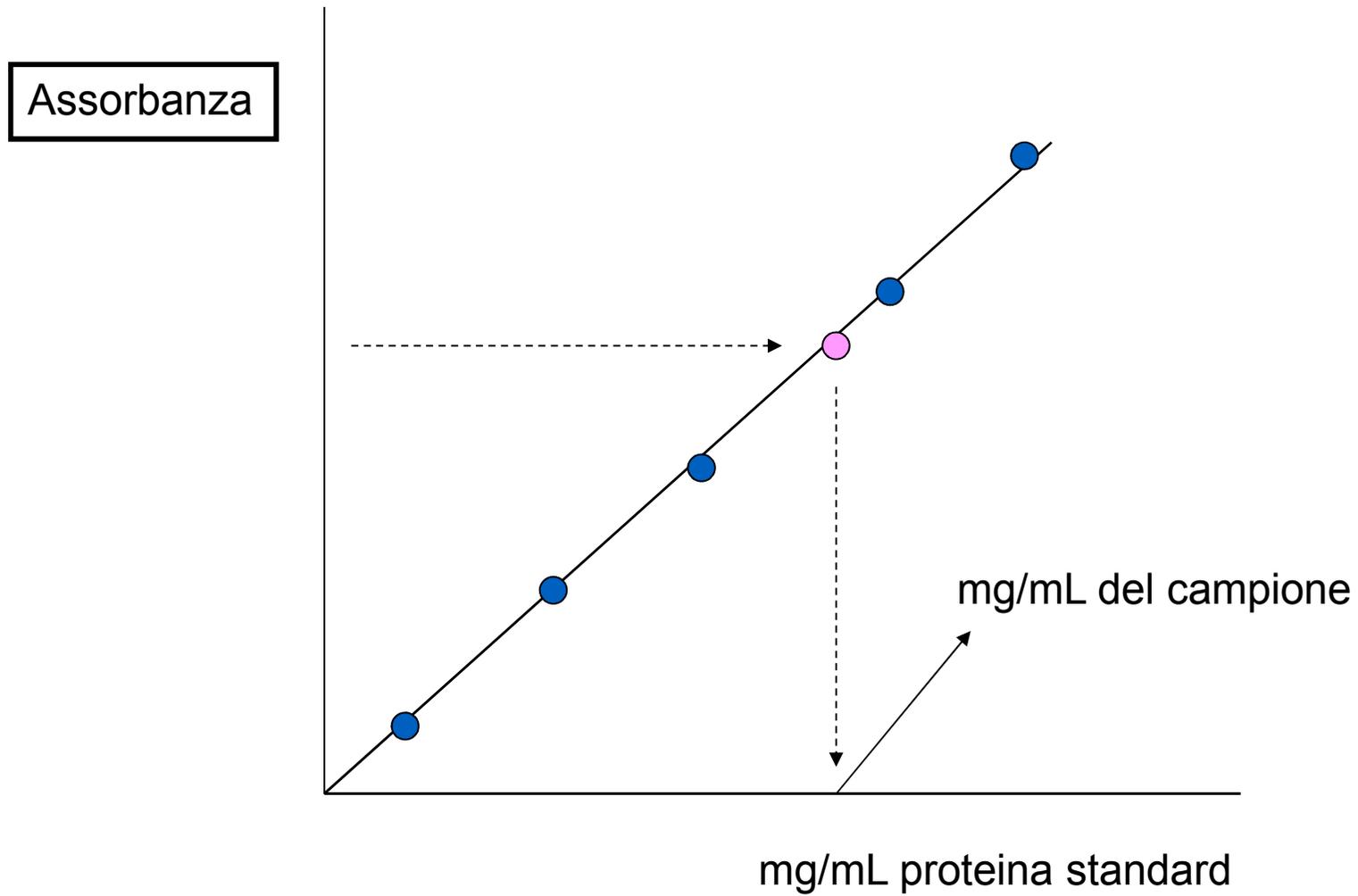


dopo un tempo stabilito (10-30 min)



Leggere le assorbamze contro bianco

Costruzione della retta di taratura



Altri metodi per dosare enzimi:

1. Con substrati che originano prodotti fluorescenti (spettrofotofluorimetria)
2. Con substrati marcati con isotopi radioattivi

Si tratta di metodi molto sensibili di solito utilizzati in procedure automatizzate