

IV ESPERIENZA

DETERMINAZIONE DELLA K_m DELL'ENZIMA ADENOSINA DEAMINASI (ADA)

L'adenosina deaminasi o ADA è un enzima coinvolto nel metabolismo delle purine, in particolare nella deaminazione dell'**adenosina**, che viene convertita in **inosina**. L'ADA è necessaria per la scissione dell'adenosina dal cibo e per il ricambio degli acidi nucleici nei tessuti.

Per determinare sperimentalmente questa trasformazione si sfruttano le proprietà spettroscopiche dell'adenosina, la quale presenta uno spettro di assorbimento con un massimo a **260 nm** (spettro UV). Anche l'inosina presenta uno spettro di assorbimento a 260 nm che va ad interferire con lo spettro dell'adenosina, ma non dà interferenza a 265 nm. Per eliminare l'interferenza dell'inosina, si esegue la lettura a **265 nm**, che consente di misurare la V_0 dell'ADA, ovvero l'estinzione a tempo iniziale dell'adenosina per effetto della trasformazione enzimatica in inosina.

Si determina la V_0 a varie concentrazioni di adenosina, comprese tra 5 80 μM , in modo che si trovino al di sopra e al di sotto della K_m attesa, che è di circa 40 μM .

Come soluzioni si utilizzano:

- Adenosina 300 μM (S)
- Tampone fosfato 0,1M pH=7,0
- Adenosina deaminasi (E)

Mettere in cuvette da 3 ml concentrazioni variabili di tampone e di adenosina, per un totale di 4 campioni, coprire con parafilm e capovolgere, per poi leggere l'assorbanza a 260nm, in modo tale da eliminare l'errore che può essere stato commesso nelle diluizioni. I valori ottenuti da questa lettura vanno divisi per il coefficiente di estinzione μM $\epsilon = 0.01368$, così da determinare la concentrazione di adenosina reale in ogni cuvetta.

Aggiungere poi in ogni cuvetta 25 μl dell'enzima ADA, poggiando la goccia sul bordo. Una volta messo l'enzima in tutte e 4 le cuvette, coprire con parafilm e capovolgere rapidamente, per poi leggere l'assorbanza a 265 nm ogni 10 secondi per 2 minuti. Per ogni cuvetta viene calcolata la $\Delta A/\text{min}$ (variazione di assorbanza al minuto) nell'intervallo di tempo in cui l'andamento è lineare.

Si calcolano poi i doppi reciproci, quindi $1/[\text{adenosina}]$ e $1/V_0$, si riportano i dati su Excel e GraphPad e si calcolano **K_m** e **V_{max}** .