



**dosaggio concentrazione pp**

- preparazione curva standard-retta di taratura con valori di assorbimento in ordinata e mg di pp in ascissa, con uso di albumina da siero (BSA) a concentrazione nota
- ricevo quantità di pp nei campioni dalla curva standard
- diluzioni di BSA in più cuvette con Bradford)

determino conc. pp del campione considerandone la diluzione (letture a lambda fissa contro bianco - quindi trovo il coefficiente di assorbimento di ogni diluzione)

**DETERMINAZIONE CONCENTRAZIONE PROTEICA**

- Misura di assorbanza a 280 nm (non distruttivo) determinazione del coefficiente di estinzione molare
- Saggi colorimetrici (distruttivi):
  - Lowy
  - Biorio
  - Bradford
  - BCA (bicinonico Acido)

**DOSAGGIO PROTEICO**

- tecniche di misura**
  - spettrofotometriche
  - fluorimetriche
  - radioisotopiche
  - cromografiche
  - manometriche
  - immunochimiche
- tipologie di saggi**
  - accoppiati
  - di inibizione
  - continui
  - discontinui

**accoppiati**

- si possono utilizzare quando ne substrati ne prodotti hanno caratteristiche rilevabili e misurabili
- si utilizza una seconda reazione, abbinata alla prima, che possa dare una misura della prima
- esempio: dosaggio attività piruvato chinasi
- posso accoppiare ulteriori reazioni se le prime non mi danno risultati misurabili (enzima traslasci)

**di inibizione**

negli studi di inibizione enzimatica si varia sia la concentrazione del substrato che quella dell'inibitore

La forza dell'inibizione è data dalla  $K_i$

**continui**

- si segue attività enzimatica in continuo misurandone AE nel tempo
- S e P devono essere # per proprietà misurabili come spettrofotometria
- la conc. di S e P monitorata costantemente (la seconda aumenta esponenzialmente la prima diminuisce logaritmicamente)
- determinazione attività lattato deidrogenasi: misuro ossidazione del lattato misurando l'assorbimento di NADH a 340 nm (utilizzando reazione inversa, ma comunque mi da informazioni)
- substrati artificiali: quando ne S ne P sono misurabili allora uso S o P con proprietà misurabili, come 4-metil-embalifione: composto fluorescente che lega con legame estere, quindi usato come S artificiale

**discontinui**

- aliquote della miscela di reazione vengono prelevate ad intervalli di tempo. La reazione viene bloccata.
- dopo l'inattivazione dell'enzima ogni punto viene analizzato con la metodica scelta.
- occorre dimostrare la linearità del saggio nel tempo (velocità iniziale)
- esempio: dosaggio dell'attività RNAsica:
  - Inattivazione RNA + RNAsi
  - Precipitazione con sali di lattario
  - Lettura a 260 nm del SN

**vedi formulario:**

- MICHELIS E MENTEN
- POTESI HALDANE
- LINEARIZZAZIONE
- LINEARIZZAZIONE
- UNITA ENZIMATICA
- INIBIZIONI

**saggi enzimatici condotti in:**

- eccesso di S (10 volte  $K_m$ )
- misurando la velocità iniziale
- pH e T costanti
- con retta di controllo
- eseguendo preincubazione a T di reazione
- analizzando diversi Vol di enzima

analizzando volumi diversi di enzima

l'attività deve variare proporzionalmente, quindi raddoppiando enzima raddoppia anche pendenza della curva