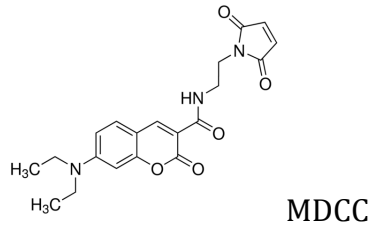


Esercizi FhuD-TonB



1. La proteina FhuD T181C ha un peso molecolare di 29.7 kDa e un coefficiente di estinzione a 280 nm ϵ_{280} 0.1% 1.649 (una soluzione 1 mg/ml ha A_{280} 1.649), la sonda MDCC ha un coefficiente di estinzione a 419 nm ϵ_{419} 50000 M⁻¹ cm⁻¹. Lo spettro ottico registrato dopo la marcatura e la dialisi per allontanare la sonda non legata fornisce i seguenti valori di assorbanza:

A_{280} 0.103

A_{419} 0.191

- Determinare la stechiometria di legame tra FhuD T181C e la sonda MDCC
- Spiegare il risultato ottenuto

2. Il saggio di legame FhuD-TonB viene eseguito misurando il quenching della fluorescenza MDCC, utilizzando le seguenti concentrazioni di FhuD T181C-MDCC e TonB:

- | | |
|------------------|----------------|
| • FhuD 50 nM | TonB 50 nM |
| • FhuD 50 nM | TonB 500 nM |
| • FhuD 50 nM | TonB 1 μ M |
| • FhuD 1 μ M | TonB 500 nM |
| • FhuD 1 μ M | TonB 1 μ M |
| • FhuD 1 μ M | TonB 5 μ M |
- Determinare la concentrazione di complesso FhuD-TonB che si forma nelle 6 miscele sapendo che K_D 500 nM
 - Quale equazione utilizzereste per determinare la concentrazione di complesso?

$$[FhuD - TonB] = \frac{[FhuD_{tot}][TonB]}{K_D + [TonB]}$$

$$[FhuD - TonB] = \frac{(K_D + [FhuD_{tot}] + [TonB_{tot}]) - \sqrt{(K_D + [FhuD_{tot}] + [TonB_{tot}])^2 - 4[FhuD_{tot}][TonB_{tot}]}}{2}$$