

ESERCITAZIONE 3 _Dosaggio dell'attività della glucosio-6-fosfatasi

SCOPO DELL'ESERCITAZIONE

1. acquisire conoscenze di base della fotometria come metodo di analisi in biologia
2. acquisire conoscenze di base sui metodi di dosaggio enzimatico
3. Riflessione sul ruolo della glucosio-6-fosfatasi nell'organismo.

TIPI DI SAGGI:

1. Saggio discontinuo (stop and sample): la reazione viene fermata a tempi diversi (ad es: a tempo t_0 , t_1 , t_2 , t_3 ... t_n vengono prelevate delle aliquote e misurate le concentrazioni di prodotto o reagente)
2. Saggio con misura in continuo: la reazione enzimatica può essere seguita per via spettroscopica: si segue l'aumento o la diminuzione, in continuo, di un'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda. Se non ci sono composti con cromofori che possono essere rilevati spettroscopicamente, si accoppia la reazione ad una che può essere seguita spettroscopicamente

Si calcola la velocità della reazione enzimatica sulla base della quantità di prodotto ottenuto nel tempo. Ci sono diversi ordini di misura

Attività enzimatica: viene di solito espressa in unità che indicano le μmoli di substrato trasformate in un minuto in determinate condizioni di dosaggio

Unità di attività enzimatica (U.E.): È l'attività che catalizza la trasformazione di una μmole di substrato in un minuto

Attività specifica: Attività totale dell'enzima diviso il contenuto proteico totale del campione biologico (μmoli di substrato trasformate/ minuto \times mg proteine)

Katal (Kat): È l'attività enzimatica che catalizza la trasformazione di una mole di substrato in un secondo

DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' DELLA GLUCOSIO-6-FOSFATASI



A disposizione:

- omogenato di fegato (**F**) e cuore (**C**) di ratto in tampone citrato (1 g / 40 ml)
- tampone citrato 0,01 M pH 6,5 (**TAMPONE CITRATO**)
- glucosio-6-fosfato 0,08 M in tampone citrato (**G-6-P**)
- acido tricloroacetico (**TCA**) 10 %
- soluzione standard di fosfato di potassio KH_2PO_4 0,15 mM (**St**)
- **REATTIVO** per il dosaggio del fosforo
- provette per **incubazione** (siglate in rosso) :

CF controllo fegato
CC controllo cuore
SF saggio fegato
SC saggio cuore

- provette per **dosaggio** del fosfato (siglate in blu): B bianco
St standard
CF controllo fegato
CC controllo cuore
SF saggio fegato
SC saggio cuore

INCUBAZIONE (provette siglate in rosso)

CONTROLLO fegato (CF)	CONTROLLO cuore (CC)	SAGGIO fegato (SF)	SAGGIO cuore (SC)
0,1 ml omog feg 0,1 ml tampone	0,1 ml omog cuore 0,1 ml tampone	0,1 ml omog feg 0,1 ml G6P	0,1 ml omog cuore 0,1 ml G6P

INCUBARE a 37°C per 20 min

BLOCCARE la reazione aggiungendo 2 ml TCA 10%

CENTRIFUGARE a 3000 rpm per 10 min

**VERSARE il supernatante (circa 2 ml) nelle provette corrispondenti
per il dosaggio del fosfato**

DOSAGGIO DEL FOSFATO (provette siglate in blu)

	SUPERNATANTE	Standard Pi	TCA	REATTIVO
Bianco	-	-	2 ml	2 ml
Standard Pi	-	2 ml	-	2 ml
Controllo fegato	2 ml	-	-	2 ml
Controllo cuore	2 ml	-	-	2 ml
Saggio fegato	2 ml	-	-	2 ml
Saggio cuore	2 ml	-	-	2 ml

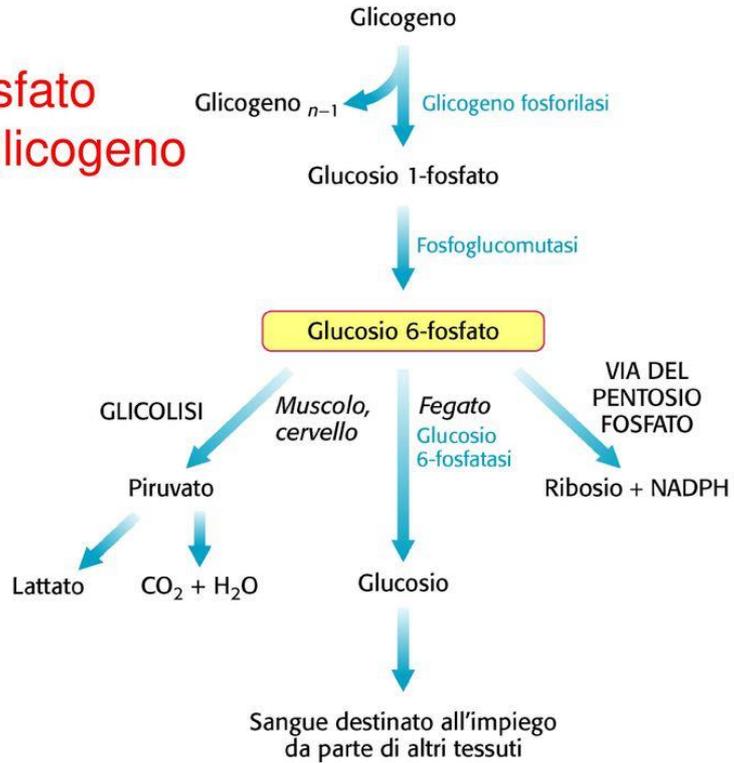
VERSARE il contenuto delle provette in apposite cuvette, mettere le cuvette nello spettrofotometro e LEGGERE la densità ottica (D.O.) a 700 nm azzerando l'apparecchio contro il Bianco.

Calcolare la quantità di fosfato corrispondente alla densità ottica :

$$\text{D.O. standard} : \mu\text{Moli Pi Standard} = \text{D.O. campione} : \mu\text{Moli campione}$$

Calcolare l'attività dell'enzima per grammo di tessuto dei diversi campioni

Destini del glucosio-6-fosfato derivato dal glicogeno



Glicogenolisi

