

## Estrazione e caratterizzazione della fosfatasi alcalina dal fegato bovino

### Preparazione

Pesare circa 0,5 – 0,8 grammi di fegato, omogeneizzare con soluzione TRIS-HCl<sup>1</sup> 50 mM a pH 7,5, secondo la proporzione 10 ml per ogni grammo di tessuto.

L'omogenato viene centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti per determinare la sedimentazione delle parti non omogeneizzate e dei nuclei cellulari. Il sedimento (pellet) viene scartato, il sovranatante rappresenta l'estratto grezzo e viene trasferito in provetta conica con pipetta Pasteur.

### Dosaggio

In una serie di 5 provette si pongono quantità crescenti della soluzione madre di substrato (p-nitrofenolfosfato 10 mM) in tampone glicina a pH 10,5. (vedi tabella).

<i>N° provetta</i>	<i>Substrato (ml)</i>	<i>Tampone glicina (ml)</i>	<i>Enzima estratto grezzo (ml)*</i>	<i>Conc. finale di substrato (mM)</i>
<b>Bianco</b>	-	7,5	0,15	-
<b>1</b>	0,3	7,2	0,15	0,39
<b>2</b>	0,6	6,9	0,15	0,78
<b>3</b>	0,9	6,6	0,15	1,18
<b>4</b>	1,2	6,3	0,15	1,56
<b>5</b>	1,5	6,0	0,15	1,96

\*Aggiungere ad 1 minuto l'una dall'altra. Agitare bene ma non violentemente!

Si pongono le provette in bagno termostatico a 37 °C segnando l'ora di partenza della reazione. Dopo 30 minuti, bloccare la reazione con l'aggiunta di 300 microlitri di NaOH 1 M. Agitare lentamente e leggere a 405 nm, dopo aver azzerato lo strumento con il bianco.

### Grafici

Per disegnare il grafico di Michaelis-Menten sarà sufficiente riportare i valori di assorbanza in ordinate come se fossero velocità iniziali mentre in ascisse andranno i valori della concentrazione di substrato.

Disegnare anche il grafico di Lineweaver-Burk e ricavare il valore di Km.

---

<sup>1</sup> Tris (idrossimetil)amminometano idrocloruro: tampone biologico zwitterionico (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>·HCl