

ESERCIZI 2

Esercizio n.1

- Trovare la concentrazione di NAD e NADH in una soluzione miscelata basandosi sui seguenti dati ottenuti in una cuvetta da 1 cm :
- I coefficienti di estinzione molare a 260 nm sono 1.5×10^4 per il NADH e 1.84×10^4 per il NAD. A 340 nm solo il NADH assorbe con ϵ di 6.22×10^3 .
- La soluzione miscelata dà assorbanze di 1,36 e 0,382 a 260 e 340 nm, rispettivamente.

$$A_{260\text{nm}} = 1.36$$

$$A_{340\text{ nm}} = 0.382$$

	$\epsilon_{260\text{ nm}}$	$\epsilon_{340\text{ nm}}$
NADH	1.5×10^4	6.22×10^3
NAD	1.84×10^4	----

$$A_{340\text{nm}} \quad A = c\epsilon\lambda \rightarrow$$

$$\rightarrow [\text{NADH}] = 0.382 : 6.22 \times 10^3 = 61.41 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$A_{260\text{ nm}} \quad A = A_{\text{NAD}} + A_{\text{NADH}}$$

$$\rightarrow 1.36 = [\text{NAD}] \times 1.84 \times 10^4 + [\text{NADH}] \times 1.5 \times 10^4$$

$$\begin{aligned} \rightarrow [\text{NAD}] &= [1.36 - (61.41 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1.5 \times 10^4)] : 1.84 \times 10^4 = \\ &= [1.36 - 0.92] : 1.84 \times 10^4 = 2.4 \times 10^{-5} \text{ M} \end{aligned}$$

Esercizio n.2

Il citocromo c è caratterizzato dai seguenti coefficienti di estinzione molare:

$$\epsilon_{280} = 28500 \text{ e } \epsilon_{415} = 96300 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

Una soluzione di citocromo c in una cuvetta da 1 ml assorbe 0.17 a 280 nm e 0.4 a 415 nm.

1. Calcolare la concentrazione della proteina
2. Perché i valori ottenuti utilizzando i due coefficienti non sono uguali?
3. Se il citocromo c pesa 12300 dalton, quanti mg di proteina sono presenti in 1 ml?

Il citocromo c è caratterizzato dai seguenti coefficienti di estinzione molare:

$$\epsilon_{280} = 28500 \text{ e } \epsilon_{415} = 96300 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

Una soluzione di citocromo c in una cuvetta da 1 ml assorbe 0.17 a 280 nm e 0.4 a 415 nm.

1. Calcolare la concentrazione della proteina

$$A = c\epsilon\lambda$$

$$c_1 = 0,17 : 2,85 \times 10^4 = 5,96 \times 10^{-6} \text{ M}$$

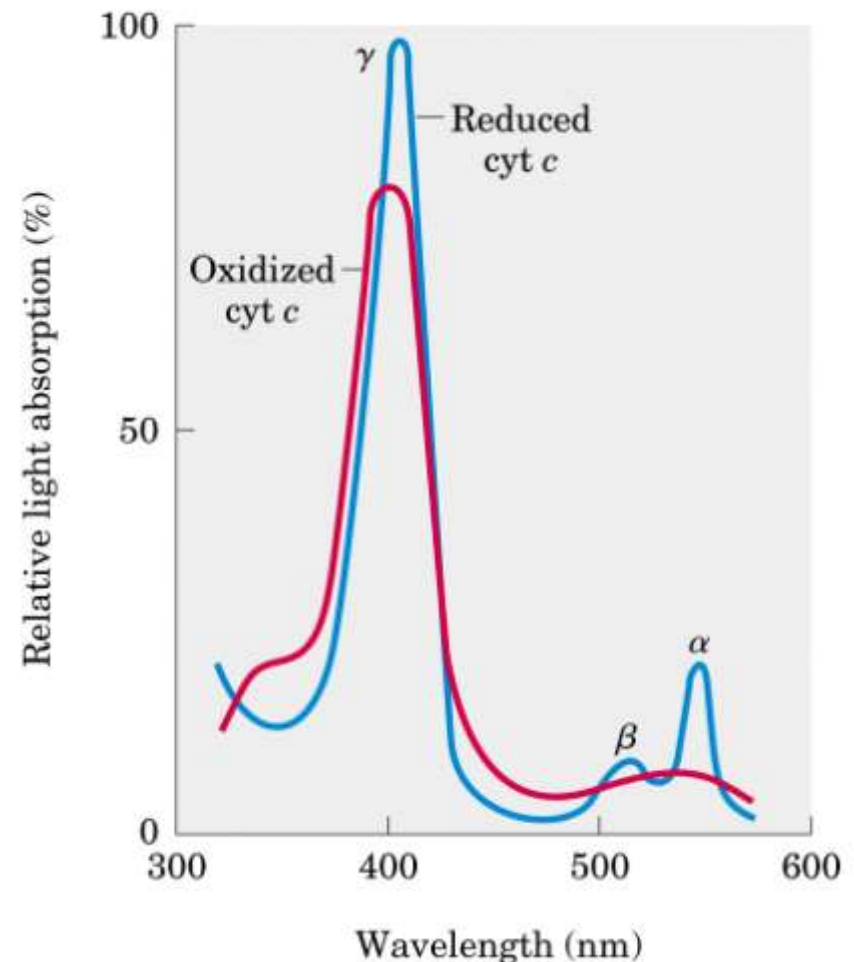
$$c_2 = 0,40 : 9,63 \times 10^4 = 4,15 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_1 = 0,17 : 2,85 \times 10^4 = 5,96 \times 10^{-6} \text{ M (280nm)}$$

$$c_2 = 0,40 : 9,63 \times 10^4 = 4,15 \times 10^{-6} \text{ M (415 nm)}$$

2. Perché i valori ottenuti utilizzando i due coefficienti non sono uguali?

Perché A_{415} dipende dalla concentrazione dell'eme. Evidentemente una parte del citocromo nella miscela è apo



3. Se il citocromo c pesa 12300 dalton, quanti mg di proteina sono presenti in 1 ml?

$$c_1 = 5,96 \times 10^{-6} \text{ M (280nm)}$$

$$1 \text{ M} = 1,23 \times 10^4 \text{ g/l} = 1,23 \times 10^4 \text{ mg/ml}$$

$$\rightarrow 5,96 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1,23 \times 10^4 \text{ mg/ml} = 7,331 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

Esercizio n.3

Rappresentare i seguenti dati sperimentali con un istogramma dei valori medi e deviazioni standard delle serie di misure.

	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Misura 4
Controllo	1.31	1.47	1.20	0.95
Trattamento B	0.83	1.27	1.13	1.38
Trattamento C	1.52	1.48	1.04	1.35

Come potreste valutare se i tre trattamenti differiscono rispetto ai valori di controllo ?

Media aritmetica : $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

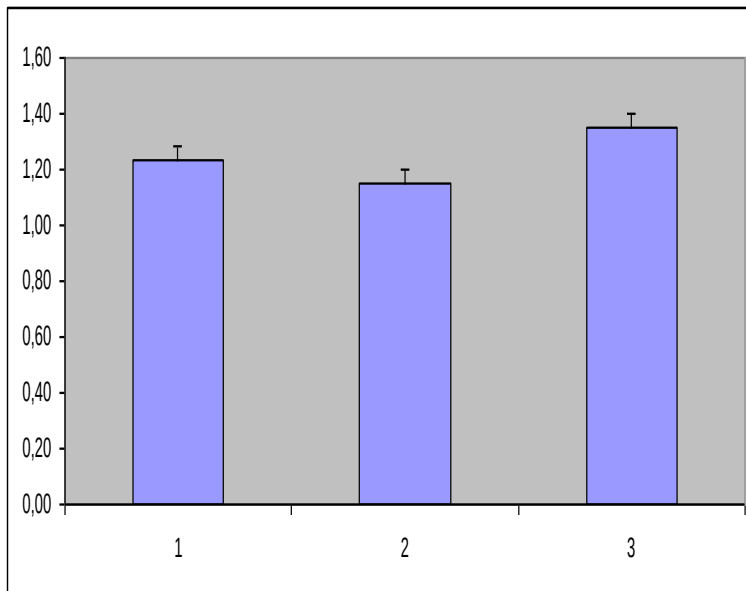
Deviazione standard : σ

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

		1	2	3	4	media	DS	Chi test
Serie 1	Controllo	1,31	1,47	1,20	0,95	1,23	0,22	
Serie 2	Trattamento B	0,83	1,27	1,13	1,38	1,15	0,24	0,94
Serie 3	Trattamento C	1,52	1,48	1,04	1,35	1,35	0,22	0,97

Più grande è il valore di χ^2 , più grande è la discrepanza tra le frequenze osservate e quelle teoriche.

	0,01	0,025	0,05	0,95	0,975	0,99
1	0,00016	0,00098	0,00393	3,84146	5,02390	6,63489
2	0,02010	0,05064	0,10259	5,99148	7,37778	9,21035
3	0,11483	0,21579	0,35185	7,81472	9,34840	11,34488
4	0,29711	0,48442	0,71072	9,48773	11,14326	13,27670
5	0,55430	0,83121	1,14548	11,07048	12,83249	15,08632



Le tre grandezze
NON differiscono
significativamente

Esercizio n.4

Dai seguenti dati sperimentali ottenuti con il metodo di Lowry usando uno standard di BSA determinare la concentrazione molare di una proteina X di PM 10000 Da.

	5 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	60 μ l
BSA 1 mg/ml		0.072	0.143	0.268	0.395
Proteina X diluito 1:10	0.175	0.370			

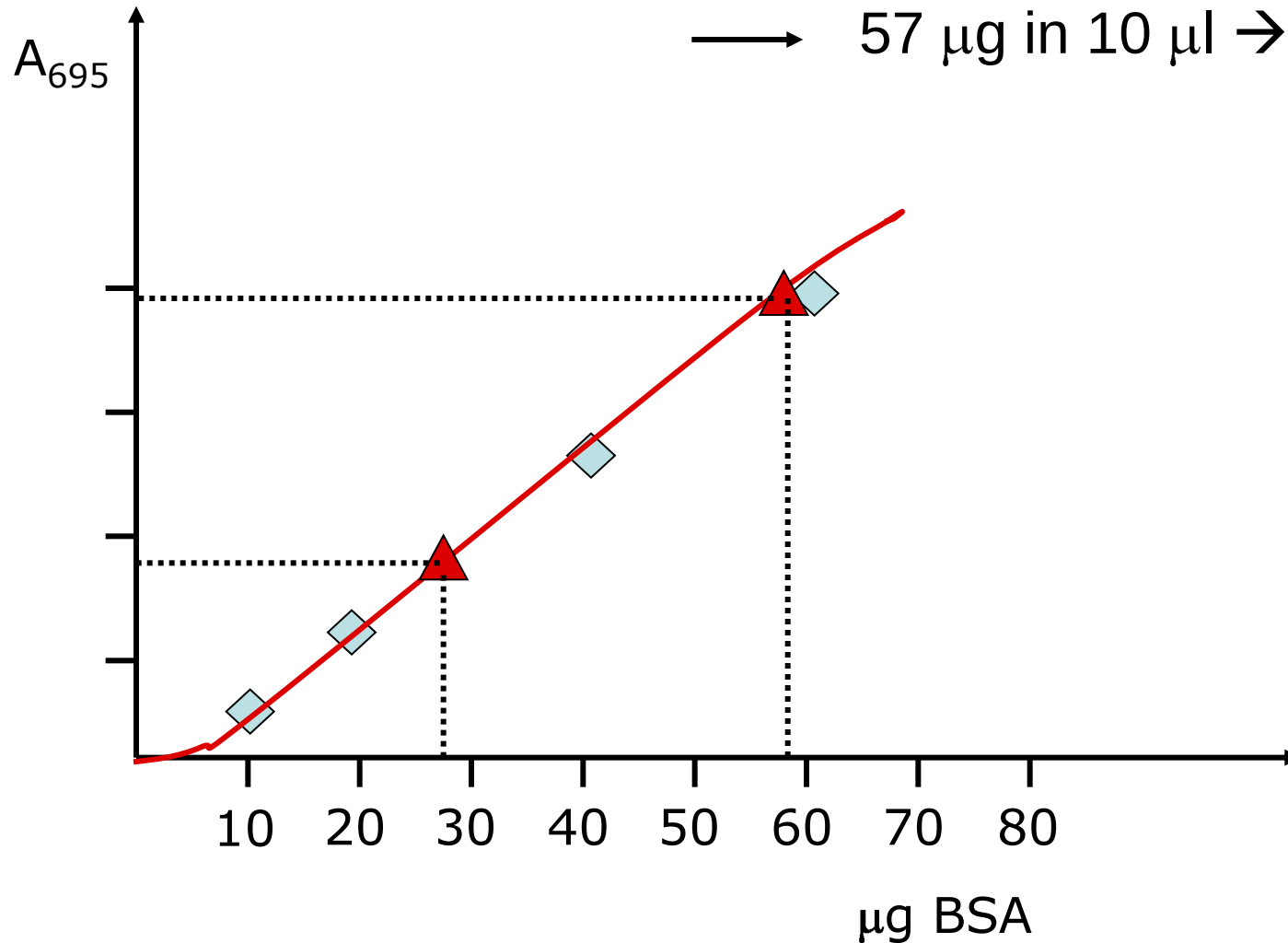
1. Costruzione del grafico

Standard BSA 

Campione x 

→ $27\text{ }\mu\text{g}$ in $5\text{ }\mu\text{l}$ → $5,4\text{ mg/ml}$

→ $57\text{ }\mu\text{g}$ in $10\text{ }\mu\text{l}$ → $5,7\text{ mg/ml}$



2. Determinazione concentrazione molare (PM 10000 Da)

→ 27 μg in 5 μl → 5,4 mg/ml

→ 57 μg in 10 μl → 5,7 mg/ml

$$(5,4 + 5,7) : 2 = 5,55 \text{ g/L}$$

Poichè era diluito 1:10

→ 55,5 g/L

$$1 \text{ M} = 10^4 \text{ g/L}$$

$$\rightarrow c = 5,55 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Esercizio n°5

Supponete di analizzare tramite SDS-PAGE una proteina altamente purificata il cui **peso molecolare** determinato tramite gel filtrazione sia pari a circa 60000 Dalton.

L'analisi elettroforetica, dopo **denaturazione** del campione in presenza di **ditiotreitolo**, evidenzia la presenza di **tre** catene polipeptidiche di massa molecolare pari a circa 27000, 13000 e 10000 Da, rispettivamente. Lo stesso campione analizzato in seguito a denaturazione **in assenza di agenti riducenti** evidenzia **due** bande di peso pari a circa 40000 e 10000 Da, rispettivamente.

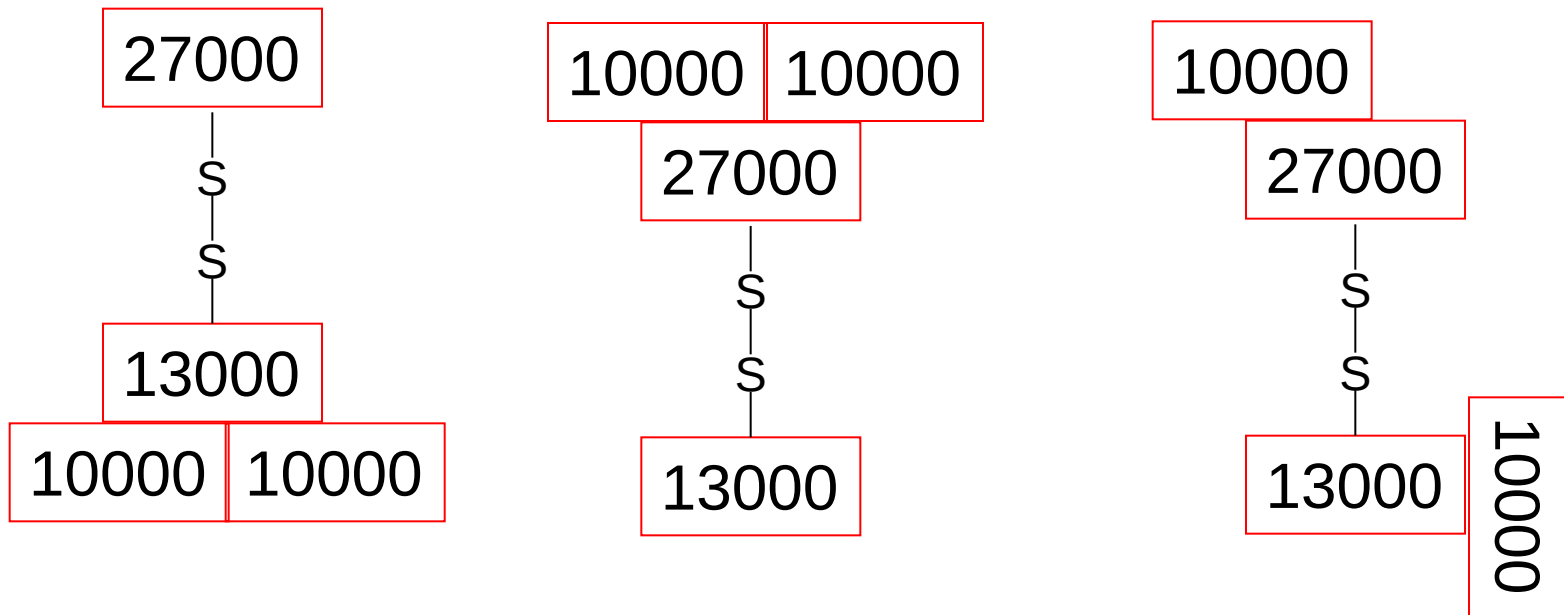
Quale potrebbe essere la struttura quaternaria della proteina e come sono unite tra loro le diverse subunità?

PM totale 60000 Da.

denaturazione + DTT $\rightarrow$ 27000, 13000, 10000 Da

denaturazione - DTT $\rightarrow$ 40000, 10000 Da

Quale potrebbe essere la struttura quaternaria della proteina e come sono unite tra loro le diverse subunità?



Esercizio n°6

E' stata misurata la velocità iniziale di una reazione enzimatica in funzione della concentrazione di substrato ed in presenza o assenza di un inibitore, ottenendo i seguenti dati sperimentali:

[S]	V_0	
	- Inibitore	+ Inibitore
0.001	30,30	17,24
0.01	37,03	22,22
0.1	55,5	29,41
1	71,4	45,45

- Determinare la $V_{\max}$ e la K_m in assenza dell'inibitore
- Di che tipo di inibitore si tratta? Perché?

1. Costruire grafico doppi reciproci

$1/V_0$

$1/[S]$

$1/V_0$

- Inibitore

+ Inibitore

1000

0,033

0,058

100

0,027

0,045

10

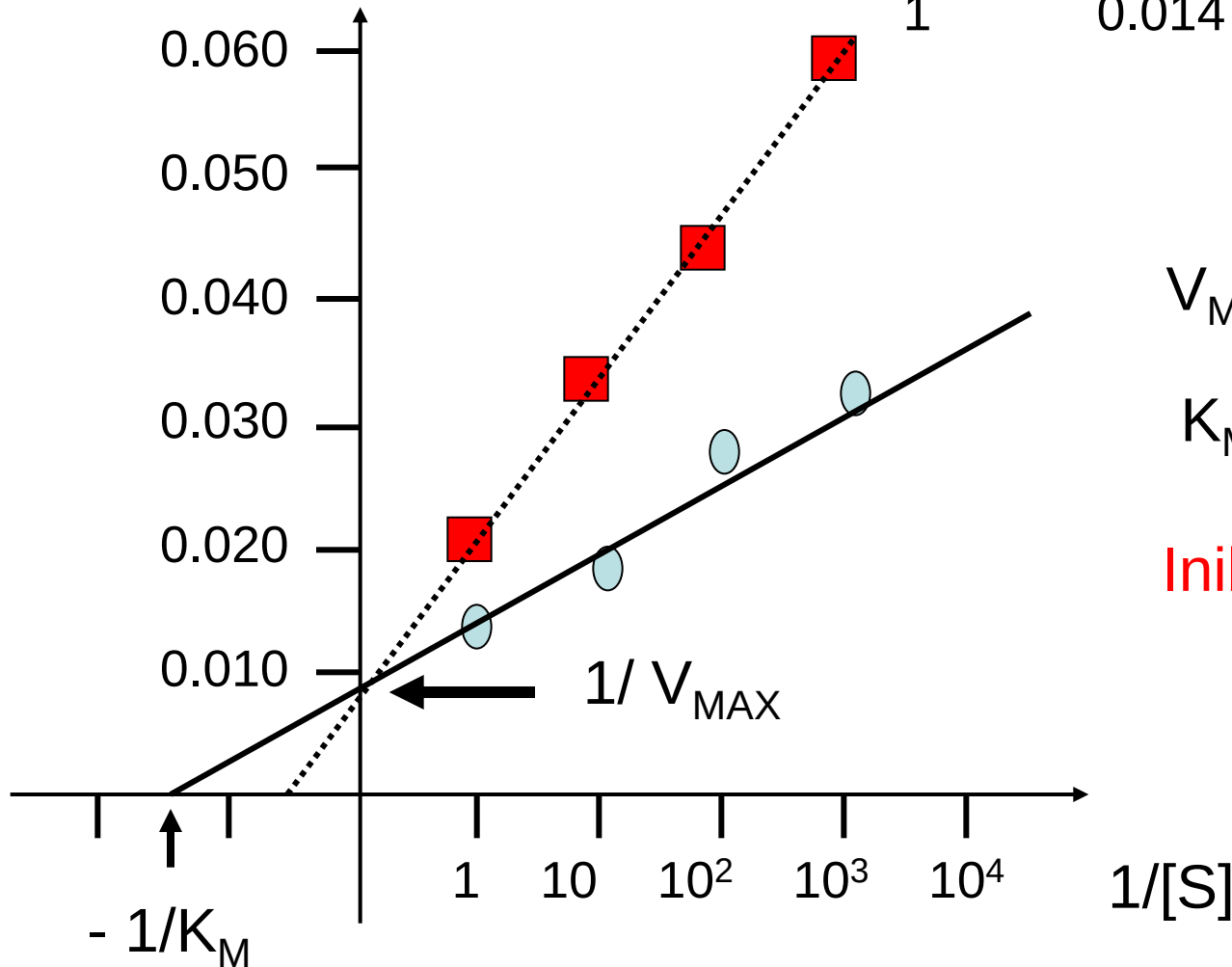
0.018

0,034

1

0.014

0,022



$$V_{MAX} = 1/0,009 = 111$$

$$K_M = 1/3 = 0,33 \text{ mol/L}$$

Inibitore competitivo

Esercizio n°7

Completare la seguente tabella, che riassume i dati del procedimento di una purificazione di un enzima ricombinante X

Step	Proteina totale (mg)	Attività X (Unità)	Attività specifica (Unità/mg prot)	Resa %	Purificazione
Estratto grezzo	10000	10^6		100	1
Precipitazione Solf.ammonio	4000	8×10^5			
Cromatografia Gel filtrazione	140	7×10^5			
FPLC Scambio ionico	60	6×10^5			

Calcolare dopo ogni tappa della procedura di purificazione:

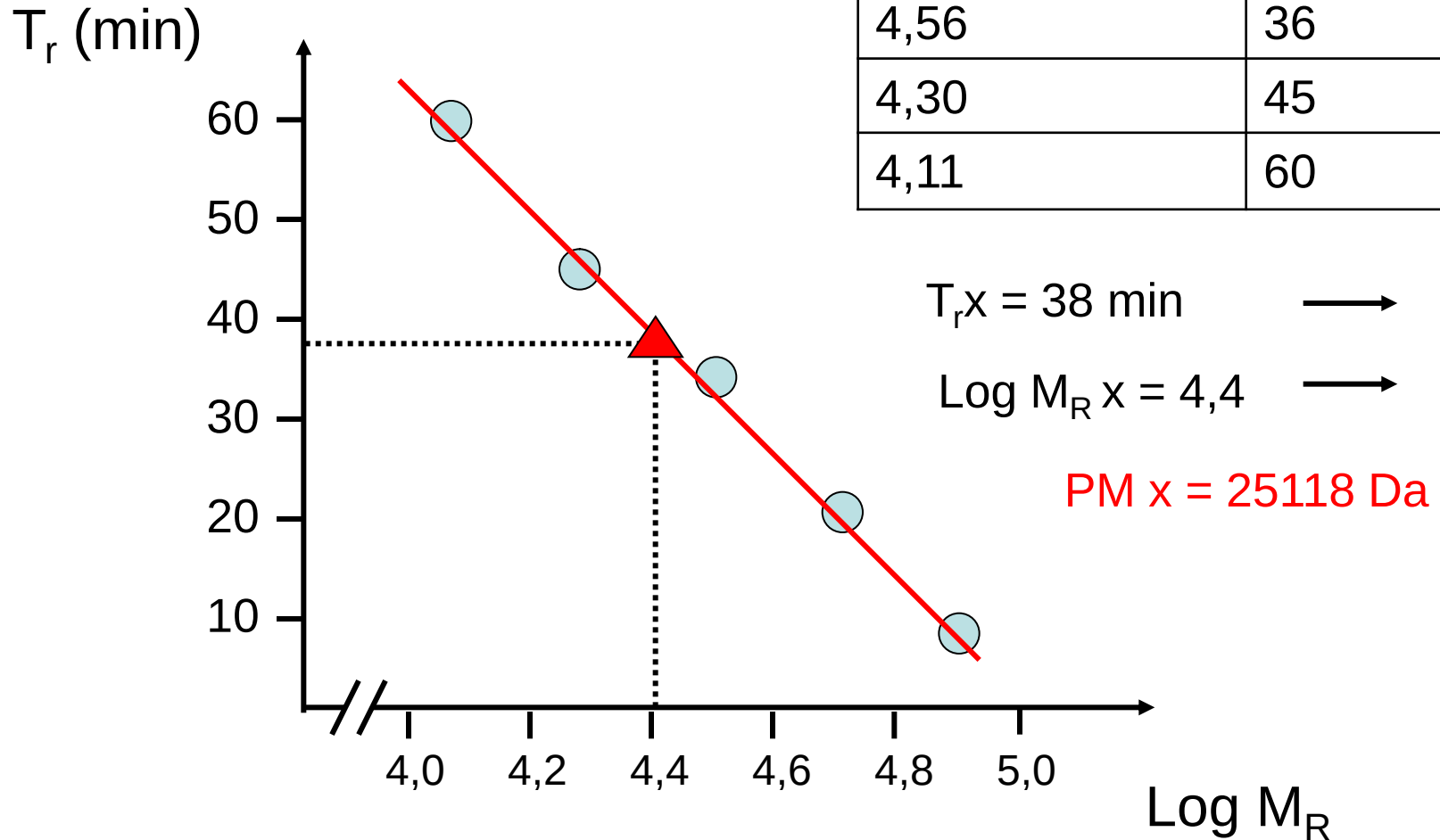
- l'attività specifica (unità/mg) della soluzione enzimatica;
- la resa dell'enzima;
- il livello di purificazione dell'enzima (è una misura di quanto aumenta l'attività specifica nei vari passaggi).

Esercizio n°8

Determinare il peso molecolare approssimativo di una proteina che eluisce da una colonna cromatografica per gel filtrazione (eluata a flusso costante) con tempo di ritenzione $t_R = 38$ min, sulla base dei seguenti dati sperimentali su proteine utilizzate come standard:

PM proteina (Da)	t_R (min)
78000	10
54000	22
37000	36
20000	45
13000	60

Log PM proteina	t_R (min)
4,89	10
4,73	22
4,56	36
4,30	45
4,11	60



Esercizio n°9

Quali proprietà molecolari delle proteine vengono sfruttate dalle seguenti tecniche di separazione :

Elettroforesi non denaturante

- ☐ Carica
- ☐ Peso molecolare
- ☐ Punto isoelettrico
- ☐ Specificità
- ☐ Altro (specificare)

Esercizio n°10

Spiegate brevemente il principio della spettroscopia di risonanza di spin (ESR). Che tipo di proteine sono analizzabili mediante questa tecnica ? Che informazioni fornisce ?

3 risposte da dare :

1. Principio fisico
2. Tipo di proteine analizzabili
3. Informazioni fornite

Principio fisico

La spettroscopia ESR si basa sulla capacità di un campo magnetico di fare risuonare elettroni spaiati....gli elettroni possono esistere in due stati....

Si irradia il campione con microonde a frequenza fissa e si fa variare il campo magnetico, fino ad ottenere il fenomeno della risonanza degli elettroni spaiati...si registrano picchi di assorbimento caratteristici...

Tipo di proteine analizzabili

E' una tecnica utile per analizzare metalli di transizione e i loro complessi, radicali liberi o stati eccitati delle molecole. E' pertanto utile per studiare metalloproteine che leghino metalli come Cu, Fe che possiedono un elettrone spaiato....

Informazioni fornite

L'ESR fornisce informazioni qualitative, quantitative, dinamiche sull'intorno geometrico del metallo...

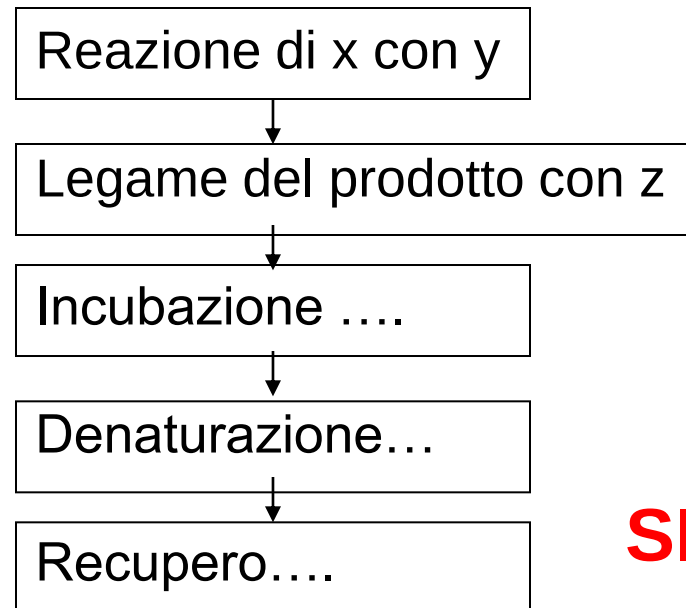
Esercizio n°11

Descrivere **schematicamente** il procedimento per fare X a Y....

La tecnica X si usa per... Pertanto per analizzare Y.... Bla bla bla
bla
bla
bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla bla.... **NO !**

1. Reazione di x con y
2. Legame del prodotto con z
3. Incubazione
4. Denaturazione...
5. Recupero....

SI



SI