

Saggio di attività del lisozima

a cura di G. Nappo

Il lisozima è una proteina in grado di tagliare alcuni composti chimici che si trovano sulla parete dei batteri. La sua azione provoca la distruzione della parete e conseguentemente la morte del batterio. Proprio per il suo effetto battericida è impiegato come conservante in una varietà di prodotti alimentari e preparazioni farmaceutiche. Per misurarne l'attività si utilizzano dei batteri sensibili all'azione del lisozima (*Micrococcus lysodeikticus*) e si osserva la loro lisi nel tempo.

Obiettivo

Misurare l'attività del lisozima in un campione utilizzando una sospensione di batteri *Micrococcus lysodeikticus*. Seguiamo la lisi dei batteri in un intervallo di tempo di 5 minuti misurando la diminuzione di assorbanza (OD, densità ottica) a 450 nm. Infatti, per definizione, un'unità di lisozima produce in un minuto una variazione di OD₄₅₀ pari a 0.001.

Procedimento

1. In una provetta sterile allestire la diluizione 1:100 del campione da testare e del controllo positivo (lisozima commerciale): trasferire 495 µl di acqua e 5 µl di campione. Mescolare per inversione.
2. Pesare 2 mg di batterio *Micrococcus lysodeikticus*.
3. Aggiungere 20 ml di tampone di reazione per ottenere una sospensione batterica a 0.1 mg/ml.
4. Trasferire 1.5 ml di tampone in una cuvetta pulita e predisporre una cuvetta per il bianco, contenente 1.5 ml di tampone.
5. Impostare lo spettrofotometro a una lunghezza d'onda pari a 450 nm e leggerne il valore di OD.
6. Affinché il saggio fornisca risultati affidabili è necessario che la sospensione abbia un'OD compresa tra 0.6-0.7. Se l'OD della sospensione risulta superiore a 0.7, è possibile diluire il campione con il tampone di reazione, se invece l'OD è inferiore a 0.6 è necessario procedere alla preparazione di una sospensione a concentrazione maggiore.
7. Trasferire 1.5 ml di sospensione in 3 cuvette pulite.
8. Aggiungere 25 µl di campione in ciascuna cuvetta (controllo negativo, campione da testare e controllo positivo).
9. Mescolare e, utilizzando come bianco il tampone, leggere l'OD dei campioni a 450 nm.
10. Ripetere la lettura ogni 30 secondi per 5 minuti.

Esempio

- Immettere tutti i dati ottenuti in un foglio di calcolo oppure utilizzare la carta millimetrata per rappresentare i valori in un piano cartesiano.
- Per ottenere un risultato affidabile è importante che la variazione di OD₄₅₀ sia lineare nel tempo. In caso contrario è necessario ripetere il saggio utilizzando campioni più diluiti.



Tempo previsto

30 minuti

Materiale e Reagenti

- ✓ Guanti
- ✓ Provette
- ✓ Portaprovette
- ✓ Puntali
- ✓ Cuvette di plastica
- ✓ Timer
- ✓ Tampone di reazione (66 mM potassio fosfato monobasico, pH 6.24)
- ✓ Batterio *Micrococcus lysodeikticus*
- ✓ Lisozima commerciale (1 mg/ml)

Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Spettrofotometro

- Calcolare l'attività per ml (Unità/ml) utilizzando la seguente formula:

$$\text{Unità/ml} = \frac{(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min Campione} - \Delta\text{OD}_{450}/\text{min Tampone}) \times (\text{fattore di diluizione})}{0.001 \times (\text{volume campione})}$$

- Se si conosce la concentrazione del campione (vedi protocollo "Misurazione della concentrazione del lisozima") è possibile calcolare l'attività specifica con la seguente formula:

$$\text{Attività specifica (U/mg)} = \frac{\text{Unità/ml}}{\text{Concentrazione campione (mg/ml)}}$$

Esempio:

$$\Delta\text{OD}_{450}/\text{min Campione} = 0.015$$

$$\Delta\text{OD}_{450}/\text{min Tampone} = 0.001$$

$$\text{Volume campione} = 0.025 \text{ ml}$$

$$\text{Fattore di diluizione} = 100$$

$$\text{Concentrazione Campione} = 0.5 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Attività} = \frac{(0.015 - 0.001) \times 100}{0.001 \times 0.025} = \frac{1.4}{0.000025} = 56000 \text{ U/ml}$$

$$\text{Attività specifica (U/mg)} = \frac{56000 \text{ U/ml}}{0.5 \text{ mg/ml}} = 112000 \text{ U/mg}$$

Osservazioni

La prima misurazione non corrisponde quasi mai al tempo zero, perché il trasferimento del campione e l'operazione di miscelazione richiedono un certo tempo entro il quale l'enzima, se presente, inizia ad agire. In questo caso si nota che i tre diversi campioni (controllo negativo, campione da testare e controllo positivo) partono da OD differenti. Per correggere l'errore è sufficiente considerare come reale solo il valore di OD del controllo negativo e tenere gli altri valori come letture a 1 minuto, correggendo conseguentemente tutti gli altri tempi. Infatti, tipicamente, sono necessari da 30 secondi a 1 minuto per le operazioni di trasferimento e miscelazione.

