

Misurazione della concentrazione del lisozima

a cura di G. Nappo

Uno dei metodi per misurare la concentrazione di una particolare proteina in soluzione sfrutta l'assorbimento della luce ultravioletta (280 nm) da parte dei residui aromatici presenti all'interno della catena polipeptidica. Secondo la legge di Lambert e Beer, l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione della proteina e dipende dal cammino ottico (cioè lo spessore dello strato attraversato dalla luce incidente) e dal coefficiente di estinzione molare, un valore specifico per la molecola.

Obiettivo

Misurare allo spettrofotometro la concentrazione di un campione di lisozima purificato. Questa metodica è rapida ed economica e non richiede l'utilizzo di altri reagenti, ma può essere applicata solo a preparazioni di proteine purificate.

Procedimento

1. Accendere il nanodrop e impostare lo strumento a una lunghezza d'onda di 280 nm.
2. Utilizzare come bianco la soluzione in cui è stato sciolto il lisozima: trasferire 2µl di soluzione nella cameretta e leggere il valore di OD₂₈₀.
3. Pulire la cameretta con una velina, trasferire 2 µl di campione e leggere il valore di OD₂₈₀.
4. Per una maggiore affidabilità, è consigliabile effettuare tre letture del campione (replicati).
5. Nel caso l'assorbanza rilevata sia superiore a 2 è necessario ripetere la lettura utilizzando il campione diluito.
6. È possibile anche misurare l'assorbanza a 280 nm utilizzando uno spettrofotometro e una cuvetta in quarzo: in questo caso sarà necessario diluire in maniera appropriata il campione da leggere.



Tempo previsto

15 minuti

Materiale e Reagenti

- ✓ Guanti
- ✓ Puntali
- ✓ Tampone di eluizione (NaCl 0.5M)
- ✓ Campione di lisozima a concentrazione ignota
- ✓ Veline di carta

Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Nanodrop (o Spettrofotometro)

Esempio

Per calcolare la concentrazione di lisozima a partire dall'assorbanza a 280 nm si utilizza la legge di Lambert e Beer

$$A = \epsilon c l$$

dove

- A è l'assorbanza misurata a 280 nm,
- ϵ è il coefficiente di estinzione molare (per il lisozima $24.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),
- c è la concentrazione molare,
- l è la lunghezza del cammino ottico.

Qual è la concentrazione del lisozima nel campione di cui è riportata la misura di assorbanza?

$$A_{280} = 0.9$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = 24.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{PM lisozima} = 14.3 \text{ g/mol}$$

$$\text{Concentrazione molare} = A / \epsilon l = 0.9 / (24.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}) = 0.03558 \text{ M}$$

$$\text{Concentrazione} = 0.03558 \text{ mol/L} \times 14.3 \text{ g/mol} = 0.523 \text{ g/L}$$