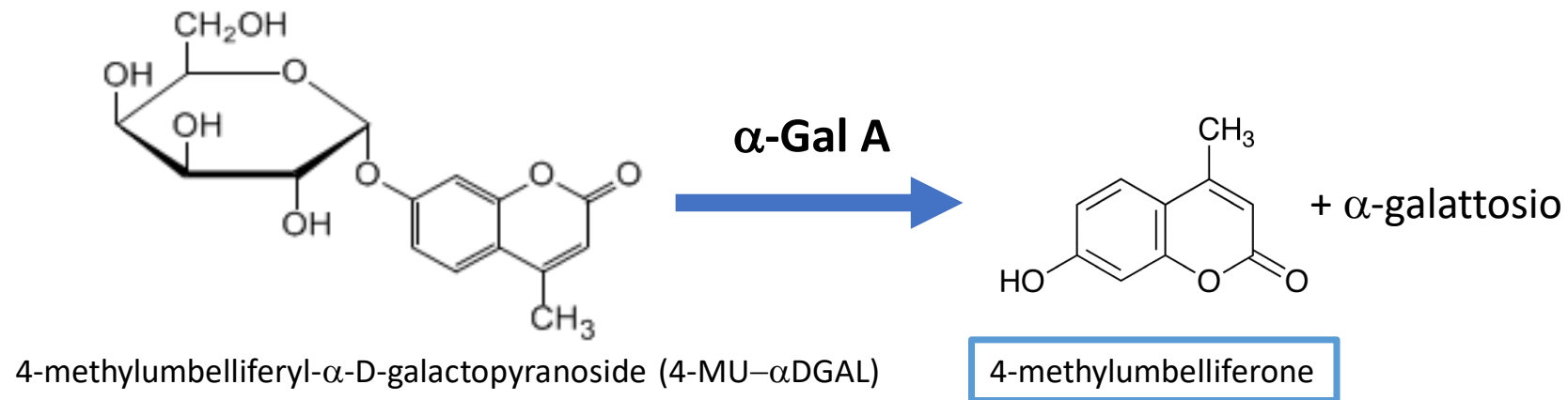


Dosaggio Enzimi Lisosomiali

Principio del metodo

Dosaggio di attività enzimatica effettuato in fluorescenza: l'idrolisi del substrato sintetico (MUGAL) causa la formazione di un prodotto fluorescente (4-metilumbelliferone o MUMB).



Però....l'indagine biochimica dell'attività dell' α -Gal A in individui normali ed affetti da malattia di Fabry hanno evidenziato la presenza di due isoenzimi: α -Gal A ed α -Gal B.

Entrambi hanno attività catalitica verso il substrato sintetico!!!

Come distinguerli?

α -Galattosidasi A

- Termolabile.
- Rappresenta la maggior attività nei tessuti ed è carente nei pazienti malati

α -Galattosidasi B

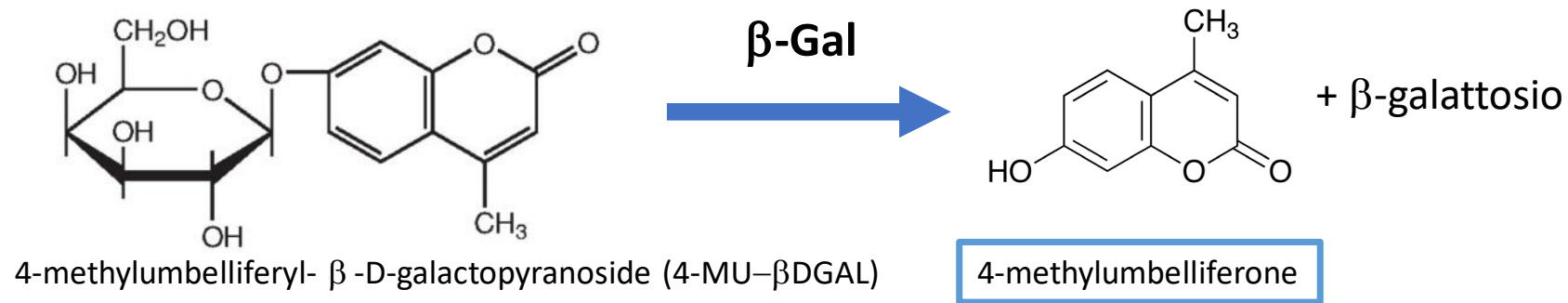
- Stabile al calore.
- Rappresenta la maggior parte dell'attività residua nei pazienti malati

- Gli enzimi purificati hanno proprietà chimico fisiche simili, ma possono essere separati per IEF.
- Anticorpi contro un enzima non riconoscono l'altra isoforma: questo suggerisce che sono geneticamente differenti.
- α -Gal B è una α -N-acetilgalattosaminidasi che agisce su substrati con residui di α -N-acetilgalattosamina terminale.
- Usando un inibitore, la α -N-acetilgalattosamina possiamo inibire la α -Gal B e dosare la sola attività della α -Gal A → questo è il modo per distinguerli.
- Perciò, nella mix di reazione sono presenti sia il substrato (MUGAL) della α -Gal A, che l'inibitore (α -N-acetilgalattosamina) della α -Gal B.

Dosaggio della β -galattosidasi?

Oltre al dosaggio dell'attività della α -Gal A , viene anche dosata la B-Galattosidasi. Per quale motivo?

Perchè è buona norma saggiare anche l'attività di almeno un'altro enzima lisosomiale nello stesso estratto → indica l'utilizzabilità del campione (stato di degradazione).



Entrambi gli enzimi formano lo stesso prodotto , che è il 4-methylumbelliferone (4-MUMB) , quindi può essere fatta una retta di taratura unica per entrambi i dosaggi enzimatici.

Dosaggio α -Gal A in laboratorio

Materiale utilizzato:

- Tampone di reazione: tampone acetato pH 4,5
- Tampone di blocco della reazione: tampone bicarbonato pH 10,7 + Triton X-100
- substrato: α -MUGAL in tampone acetato pH 4,5
- prodotto: 4-MUMB in tampone bicarbonato pH 10,7

- **IMP**: i campioni di **leucociti**, in particolare i PBMC (cellule mononucleate), che devono essere dosati sono sottoposti a sonicazione per rompere le membrane e centrifugati, per eliminare le membrane. Dopo la separazione dal pellet viene dosato il supernatante, precedentemente sottoposto a dosaggio delle proteine totali

Poniamo che la concentrazione proteica sia **2,5 mg/ml**

per il dosaggio dell' α -Gal A avete bisogno, complessivamente, di **40 μ l di campione 1 mg/ml**

$$FD = \frac{2,5 \text{ mg/ml}}{1 \text{ mg/ml}} = 2,5 \times \quad Vi = \frac{Vf}{FD} = \frac{40 \mu\text{l}}{2,5} = 16 \mu\text{l} \Rightarrow 16 \mu\text{l campione } 2,5 \text{ mg/ml} + 24 \mu\text{l di BSA } 0,2\%$$

Protocollo utilizzato:

BIANCO: 10 μ l di BSA allo 0,2%

CAMPIONE: 10 μ l di leucociti diluiti alla conc. proteica pari a 1 mg/ml con BSA allo 0,2%

Il campione ed il bianco vengono dosati in triplo in micropiastra nera da 96 pozzetti

PRIMA di mettere il campione ed il bianco viene dispensata in ogni pozzetto la MIX di reazione data da:

➤ **20 μ l di substrato+inibitore (S+I)** (10 μ l di substrato + 10 μ l di Inibitore)

➤ All'interno della gocciolina data dalla MIX viene dispensato il campione o il bianco

☐ Incubare la piastra sigillata in bagnetto termostato 1 h a 37°C

☐ Alla fine dell'incubazione mettere la piastra in ghiaccio e bloccare la reazione con **200 μ l di tampone di blocco**

☐ Aggiungere la retta di taratura IN DOPPIO

☐ Leggere la fluorescenza in un spettrofluorimetro per micropiastre.

La fluorescenza è determinata a: $\lambda_{ecc} = 365 \text{ nm}$ e $\lambda_{emiss} = 435 \text{ nm}$

✓ **Retta di taratura:** data da 200 µl di 7 diluizioni diverse di MUMB, in DOPPIO, in tampone di blocco.

1) 0,003 nmol

2) 0,009 nmol

3) 0,036 nmol

4) 0,072 nmol

5) 0,144 nmol

6) 0,45 nmol

7) 0,9 nmol

8) Bianco MUMB: 200 µl di tampone di blocco

✓ Leggere allo spettrofluorimetro la fluorescenza emessa, come RFU (unità arbitrarie di fluorescenza) dal campione e dal bianco (dosati in triplo) e della retta di taratura (dosata in doppio):

✓ Determinare i valori medi di RFU di ogni punto di MUMB e del bianco

✓ Determinare le medie nette di ogni punto: $MUMB_{media} - BIANCO_{media}$

Calcolo dell'attività enzimatica in nmol/mg/h:
$$attività = \frac{nmol * 1000}{10 * [campione]}$$
 } 10 µl campione
[campione] = 1 mg/ml

Determinare la retta di taratura del tipo $y=mx$ ponendo y = RFU nette di ogni punto della retta di taratura sull'asse delle ordinate e le corrispondenti nmol di MUMB dosate sull'asse delle ascisse

1) Scrivere l'equazione della retta e il coeff. angolare

2) Calcolare nmol/h (il dosaggio è di 1 h a 37°C) del campione dosato dalla formula inversa: $x = \frac{y (RFU\ nette)}{m}$

3) Calcolare nmol/h/mg proteina

Dosaggio β -Gal in laboratorio

Per il dosaggio della β -Gal si utilizzano lo stesso tampone di reazione e di blocco dall' α -Gal A
substrato: β -MUGAL in tampone acetato pH 4,5

per il dosaggio dell' β -Gal avete bisogno, complessivamente di **40 μ l di campione 0,3 mg/ml**

$$FD = \frac{2,5 \text{ mg/ml}}{0,3 \text{ mg/ml}} = 8,3 \times \quad Vi = \frac{Vf}{FD} = \frac{40 \mu\text{l}}{8,3} = 4,8 \mu\text{l} \Rightarrow 4,8 \mu\text{l campione } 2,5 \text{ mg/ml} + 35,2 \mu\text{l di BSA } 0,2\%$$

BIANCO: 10 μ l di BSA allo 0,2%

CAMPIONE: 10 μ l di leucociti diluiti alla conc proteica pari a 0,3 mg/ml con BSA allo 0,2%

MIX di reazione data da 20 μ l di substrato dil 1:1 in tampone di reazione

Il protocollo del dosaggio è identico a quello utilizzato per α -Gal A.

Anche i calcoli per determinare l'attività enzimatica sono uguali, perché si utilizza la stessa retta di taratura.

Nel calcolo dell'attività finale, però, si deve tener conto del fatto che la concentrazione proteica di partenza NON è pari a 1 mg/ml ma 0,3 mg/ml

Dosaggio α -Gal A e dosaggio β -Gal

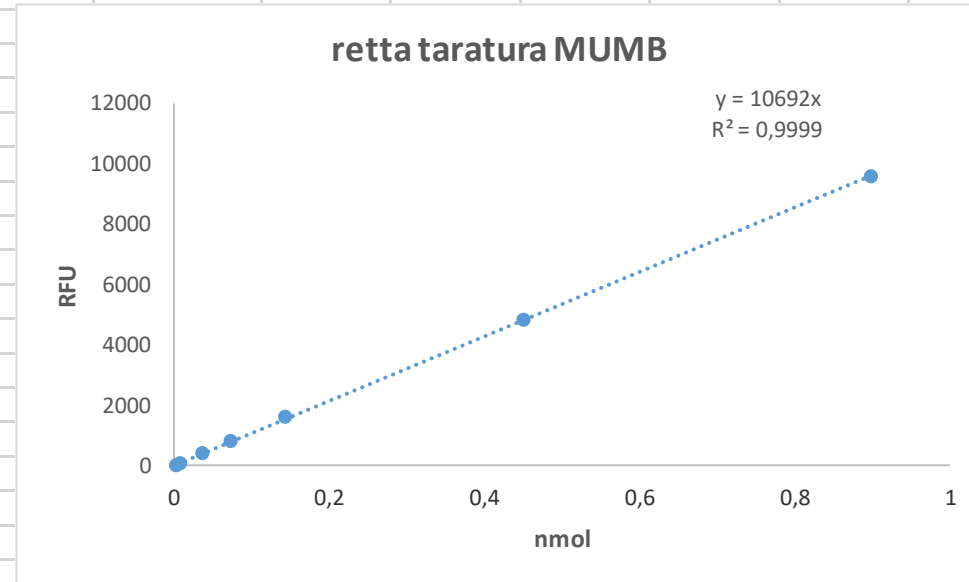
SCOPO:

determinare attività
enzimatica dei due
enzimi lisosomiali per
interpolazione con la
curva standard

Valori normali
 α -Gal A: 20-65
nmol/mg/h

β -Gal: 90-300
nmol/mg/h

nmol MUMB	Rfu		media	netti			
0	74	79	76,5				
0,003	116	118	117	40,5			
0,009	179	178	178,5	102			
0,036	468	483	475,5	399			
0,072	874	882	878	801,5			
0,144	1656	1686	1671	1594,5			
0,45	4913	4912	4912,5	4836			
0,9	9674	9675	9674,5	9598			



Mix nuova	RFU			media	netti	nmol/h	a-Gal A nmol/mg/h
B+I	169	155	159	161			
C1	3041	3028	3015	3028	2867	0,268144	26,814441
C2	2870	2840	2838	2849,333	2688,333	0,251434	25,143409
C3	5995	5865	6113	5991	5830	0,545267	54,526749
beta gal	RFU			media	netti	nmol/h	b-Gal nmol/mg/h
B	98	116	106	106,6667			
C1	6230	6295	6257	6260,667	6154	0,575571	191,85684
C2	5577	5545	5839	5653,667	5547	0,518799	172,93303
C3	9416	9598	9219	9411	9304,333	0,870214	290,0715

Corso di laurea in Scienze Biologiche
Corso di laurea magistrale in Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione

Materiale didattico di supporto

Tutto il materiale fornito a supporto delle lezioni e reperibile nel minisito dell'insegnamento o sulla piattaforma online UniFE deve essere inteso come traccia degli argomenti svolti e non sostituisce il libro di testo.

Raccomandazione importante: questo materiale didattico è per uso personale dello studente, ed è coperto da copyright. Ne è severamente vietata la riproduzione, la diffusione o il riutilizzo, anche parziale, ai sensi e per gli effetti della legge sul diritto d'autore.