

Determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE)

Principio del metodo

Il principio si basa sulla valutazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi che idrolizza il substrato acetiltiocolina. La tiocolina così prodotta riduce uno specifico reattivo che aumenta la densità ottica della soluzione. Rilevando questa densità ottica con lo spettrofotometro dopo circa 10 minuti dall'attivazione dell'enzima con il substrato si determina l'attività dell'enzima. Confrontandola con il controllo ci aspettiamo una diminuzione se l'organismo è stato sottoposto a condizioni di stress, nello specifico se nell'ambiente erano presenti elevate quantità di pesticidi (carbammati e organofosfati) o metalli pesanti.

Preparazione del campione

Da ogni pool di 6-8 organismi vengono asportate le branchie; esse sono poi omogeneizzate con tampone fosfato 0,1M pH 7,4 in rapporto ¼ w/v. L'omogenato viene centrifugato a 9000 x g a 4°C per 30 minuti, ed il supernatante conservato in ghiaccio fino al momento della misurazione biochimica. Nel frattempo viene determinata la concentrazione proteica mediante il metodo di Lowry.

Determinazione della concentrazione proteica:

Soluzioni stock:

- Soluzione A (NaK Tartrato, Na₂CO₃ NaOH) (in provetta da 50 mL)
- Soluzione B (CuSO₄ 1%) (in provetta da 15 mL)
- Soluzione di Folin (in provetta da 15 mL)
- Albumina Bovina (standard) 0.5 mg/ml (in eppendorf)
- NaOH 1M (in provetta da 15 mL)

Reagenti da preparare al momento:

- Soluzione A+B (preparata al momento 100:1 quindi 30 mL + 0.3 mL)
- Soluzione C (reattivo di Folin diluito al momento con H₂O 1:1 quindi 1.5 mL + 1.5 mL)

Procedura

- Unire 50 µL di omogenato e 200 µL di NaOH 1M in vial eppendorf
- Preparare i seguenti tubi da saggio:

	Albumina (0.5 mg/mL)	NaOH (1M)	Omogenato diluito con NaOH	H ₂ O
Bianco	-	100 µL	-	900 µL
Standard 1	50 µL	100 µL	-	850 µL
Standard 2	100 µL	100 µL	-	800 µL
Campione	-	-	100 µL	900 µL
Campione	-	-	100 µL	900 µL
Soluzione A+B (5mL per provetta)				
Attendere 10' al buio				
Soluzione C (0.5 mL per provetta)				
Attendere 30' al buio				
Leggere allo spettrofotometro a 660 nm				

Saggio enzimatico

L'attività dell'enzima è misurata con il metodo di Ellman ottimizzato per i bivalvi nel nostro laboratorio usando acetiltiocolina come substrato. L'enzima acetilcolinesterasi idrolizza l'acetiltiocolina e produce tiocolina e acetato. La tiocolina riduce il reattivo DTNB che libera nitrobenzoato. La densità ottica della soluzione viene determinata allo spettrofotometro.

Nel saggio viene utilizzata una quantità di campione tale per cui nel volume finale siano presenti 0,5 mg/mL di proteine. Ad ogni campione vengono addizionati 50 μ L di DTNB 8 mM, portati al volume finale di 1,2mL con tampone fosfato 0,1 M pH 7,4 tenuto alla temperatura di 25°C. Il substrato (5mM in acqua) viene aggiunto al saggio nel momento della lettura allo spettrofotometro (tempo zero). Trascorsi 5-10 minuti la lettura viene ripetuta per valutare l'aumento di attività dell'enzima.

Le densità ottiche vengono misurate alla lunghezza d'onda di 405 nm ed i campioni, fino al momento della lettura, sono mantenuti al buio e alla temperatura di 25 °C. La reazione enzimatica è quantificata contro un bianco che non contiene il substrato.

Inibizione dell'enzima

Per valutare l'inibizione dell'AChE da parte dei pesticidi, incubiamo preventivamente l'omogenato utilizzato per il saggio con 2 soluzioni di Carbaryl (presente nei pesticidi) a differenti concentrazioni (10^{-4} M e 10^{-6} M) per 30 minuti a 25°C. Valutiamo poi l'attività come sopra.

Soluzioni e reagenti utilizzati

Buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 se non diversamente precisato

DTNB 8mM

(4,75 mg di DTNB in 1,5mL di Buffer fosfato)

Acetiltiocolina 5 mM (34,9 ASCh in 1 mL acqua)

Carbaryl soluzione stock 10^{-2} M