

Oefeningenexamen

Geïntegreerd Practicum Fysiologie-Biochemie:

31 maart 2021

Los de opgaven op met behulp van een rekenblad (Excel, Google spreadsheet, LibreOffice Calc) of R. Je kan je oplossing doormailen tot 31 maart om 19u00.

Een volledige oplossing bevat:

- ... het bestand met je dataverwerking: om je examen te kunnen verbeteren, zijn ook de gebruikte formules nodig. Ben je niet zeker hoe je bestand door de uploadprocedure zal geraken (“maar ik had die figuur er écht wel bij staan...”), voeg dan ook een .pdf-bestand toe. In een .pdf-bestand worden geen formules weergegeven, dus een bewerkbaar bestand met je oplossing is essentieel.
- ... een beschrijving van je aanpak (tekst, formules, voorbeeldberekeningen, schema’s) en een kort besluit (1 zin kan volstaan). Handgeschreven en ingescand mág maar wat niet leesbaar is, wordt niet verbeterd.
- om alle bestanden samen te houden, begin je elke bestandsnaam met een kernwoord (mag je zelf kiezen) uit de opgave en vermeld je daarna ook je familienaam. Bijvoorbeeld: `citraatsynthase_Michiels.tex`.

Vermeld in ieder document je naam en gebruik eenduidige benamingen voor kolommen, gegevens en berekende grootheden.

Tabel 1: Standaardreeks eiwitbepaling. (formule voor a in de ijklijn $y = ax$: $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$)

μL standaardoplossing	A_{595}
0	0.071
10	0.199
20	0.291
40	0.544
60	0.626
80	0.866

Tabel 2: Eiwitbepaling konijnennierenextract.

μL extract	A_{595}
20	0,064
40	0,117
60	0,173

- Op 1 g nierweefsel van een konijn wordt een eiwitextractie gedaan. Dit levert 4 mL extract op.

(a) (3 points) Hierop wordt een eiwitbepaling uitgevoerd.

- Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden welbepaalde volumes (zie tabel 1) telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
- Vervolgens werd 3 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
- Vóór het meten van de absorptie werd nog 200 μL kleurreagens toegevoegd.
- Van elk staal wordt de absorptie bij 595 nm gemeten. De meetresultaten staan in tabel 1.
- Een deel van het extract wordt 2x verdund en daarna op dezelfde manier behandeld als de standaardoplossing. De gebruikte hoeveelheden en gemeten absorpties worden weergegeven in tabel 2.

Bereken het eiwitgehalte van het extract.

- (b) (3 points) Diacylglycerol-acyltransferase (DGAT) is een enzyme dat aan coenzyme A gebonden vetzuren bindt aan diacylglycerol en zo de synthese verzorgt van triacylglycerol. De activiteit van het enzyme wordt gemeten via radioactieve tracers (^{14}C -gelabeld oleoyl-CoA wordt gekoppeld aan 1,2-diacylglycerol tot 14C-trioleoylglycerol). Hiervoor mengen we 35 μL ^{14}C -oleoyl-CoA, (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 56 mCi/mmol) met een overmaat aan 1,2-dioleoylglycerol (opgelost in 175 mM Tris HCl buffer met pH 8,0) en een aantal μL van bovenstaand eiwitextract (eindvolume 250 μL). De reactie wordt gestopt na 30 minuten door toevoegen van 1,5 mL van een mengsel bestaande uit 2-propanol, heptaan en water (80:20:2, v/v). Het geheel wordt geschud en er wordt nog 1 mL heptaan extra toegevoegd. De organische fase en de waterige fase ontmengen, waarbij de organische fase het gevormde trioleoylglycerol bevat en de

Tabel 3: Radio-activiteit in de organische fase i.f.v. toegevoegd volume extract.

hoeveelheid extract (μL)	radio-activiteit (μCi)
0	0
10	3,20
20	6,19
30	9,18

waterige fase de restanten van het oleoyl-CoA. 1 mL van de volledige heptaanfase wordt getransfereerd naar de scintillatieteller voor bepaling van de radioactiviteit in de fractie. De resultaten worden weergegeven in tabel 3.

Bereken de specifieke activiteit van het DGAT.

- (c) (2 points) Bereken de totale activiteit en de activiteit per gram nierweefsel.

Tabel 4: Gemeten radio-activiteit (in μCurie) na inbouwen van $^{14}\text{CO}_2$ in RuBP i.f.v. toegevoegde hoeveelheid $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (μCi)	Hoeveelheid gefixeerd ^{14}C (μCi)
0	0
10	0,040
20	0,080
40	0,115
80	0,220
160	0,410

- Rubisco is het meest abundante eiwit op aarde en zorgt voor het fixeren van CO_2 door deze molecule in te bouwen in een molecule ribulose-1,5-bisfosfaat (RuBP), dat dan via de Calvencyclus verder verwerkt wordt. De enzymatische bepaling verloopt via een radioactieve meetmethode. Hiervoor wordt 0,25 g bladpoeder gehomogeniseerd in 4 mL extractiebuffer (100 mM Tris-HCl). Dit wordt gecentrifugeerd en het supernatans wordt bijgehouden op ijs voor het bepalen van de enzymkinetiek.

Hiervoor wordt er aan 400 μL van het extract een hoeveelheid $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0,2 $\mu\text{Curie}/\mu\text{mol}$) toegevoegd, tezamen met 0,5 mM RuBP en carbonzuuranhydrase in Tris-HCl buffer (pH 8,0). De reactie wordt na 45 s gestopt door toevoeging van 6 N mierenzuur in methanol om de overmaat aan CO_2 uit de oplossing te drijven. Het resulterende eindvolume is 1 mL. Bepaling van de resterende (gefixeerde) radioactiviteit gebeurt via een scintillatieteller. De resultaten vind je in tabel 4.

- (4 points) Bereken K_m (uitgedrukt als concentratie NaHCO_3) en V_{max} (uitgedrukt als enzymactiviteit) voor Rubisco.
- (2 points) Bereken de totale activiteit bij een substraatsconcentratie overeenstemmende met 3 μCi . Bereken ook de activiteit per g bladmateriaal.