

1 Opdrachten

1.1 Concentraties

1. Hoeveel g van de desbetreffende stof dient te worden afgewogen voor de aanmaak van de gevraagde oplossing?

Tabel 1: Product, molecuulair gewicht (MW), concentratie en volume nodig voor het berekenen van een af te wegen hoeveelheid.

	Product	MW	Concentratie	Volume
1.	Glucose	198,17	1 M	1 L
2.	Sucrose	342,30	2 M	100 mL
3.	NaH ₂ PO ₄	137,99	1 M	250 mL
4.	KOH	56,11	2 M	500 mL
5.	KCl	122,55	3 M	50 mL
6.	NaCl	58,44	100 mM	250 mL
7.	Na-tartraat	194,08	200 mM	100 mL
8.	Sorbitol	182,17	500 mM	250 mL
9.	EDTA	292,25	50 mM	500 mL
10.	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	10 mM	50 mL
11.	Ureum	60,06	1 mM	20 mL
12.	Na-acetaat	136,08	10 mM	100 mL
13.	Valine	117,10	10 μ M	10 mL
14.	Arginine	274,25	50 μ M	50 mL
15.	Pyruvaat	110,00	10 mM	100 mL

2. Hoeveel mL van oplossing A heb je nodig om oplossing B te maken?

1. A: 200 mM PNP; B: 10 mM PNP, 50 mL
2. A: 5 M KOH; B: 10 mM KOH, 100 mL
3. A: HCl (MW: 36,45), 37 % (v/v), $\rho=1,18 \text{ g mL}^{-1}$; B: 0,1 N HCl, 100 mL
4. A: H₃PO₄ (MW: 97,995), $\rho=1,71 \text{ g mL}^{-1}$; 50 mM fosforzuur, 100 mL

1.2 Spectrofotometrie

Opmerking: tenzij anders vermeld, wordt gebruik gemaakt van een cuvet van 1 cm diameter.

1. Een oplossing van 10^{-5} M ATP heeft een transmissie van 70,2 % bij 260 nm. Bereken: de transmissie door de oplossing in een 3 cm cuvet; de absorptie van deze oplossing; de absorptie van een $5 \cdot 10^{-5}$ M ATP oplossing.
2. Een oplossing van $5 \cdot 10^{-5}$ M NAD⁺ heeft een transmissie van 12,6 % bij 260 nm. Bereken: de transmissie door de oplossing in een 2 cm cuvet; de absorptie van de bovenstaande oplossing; de absorptie van een $2 \cdot 10^{-6}$ M NAD⁺-oplossing.
3. Een oplossing bevat 2 g L^{-1} van een lichtabsorberende stof in een 1 cm cuvet en laat 75 % van het invallende licht van een zekere golflengte door. Bereken de transmissie van een oplossing met een concentratie van: 1 g L^{-1} ; 4 g L^{-1} ; 6 g L^{-1} en $5,4 \text{ g L}^{-1}$. Gegeven een molecuulair gewicht van 250, bereken dan ϵ_m .
4. Bepaal de proteïneconcentratie van een oplossing waarvan in de onderstaande tabel de absorptiemetingen worden gegeven.

Tabel 2: Absorptiewaarden bij 215 nm, 225 nm, 260 nm en 280 nm.

oplossing	A _{280 nm}	A _{260 nm}	A _{225 nm}	A _{215 nm}
onverdund	0,35	0,20	-	-
10x verdund	-	-	0,20	0,47

Eiwitbepalingen kunnen worden gebaseerd op 2 formules:

$$\frac{mg}{mL} = 1,55 \cdot A_{280\text{ nm}} - 0,75 \cdot A_{260\text{ nm}}$$

en

$$\frac{\mu g}{mg} = 144 \cdot (A_{215\text{ nm}} - A_{225\text{ nm}})$$

5. Een suspensie van bacteriën (drooggewicht: 400 mg L⁻¹) heeft een absorptie van 1 bij 450 nm. Bereken de celdensiteit (in mg L⁻¹) van een suspensie met een transmissie van 30 % in een 3 cm kuwet.
6. Een suspensie van plantencellen (10⁵ cellen per mL) heeft een transmissie van 20 % bij 550 nm. Bereken het aantal cellen per L suspensie, gegeven een absorptie van 0,9 bij die golflengte.
7. De specifieke absorptiecoëfficiënt $\epsilon^{0,1\%}$ van een oplossing bevattende een glycogeen-jodium-complex bij 450 nm is 0,2. Bereken de concentratie van dit complex, gegeven de absorptie van 0,38 in een kuwet met diameter 3 cm.

Tabel 3: Gegevens bij vraagstuk 8, 9 en 10: ϵ_m (M⁻¹ cm⁻¹) bij 260 nm en 340 nm voor NADH, NAD⁺, NADPH en ATP.

	ϵ_m (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
	260 nm	340 nm
NADH	15000	6220
NAD ⁺	18000	0
NADPH	15000	6220
ATP	15400	0

8. Bereken de absorptie bij 260 nm en bij 340 nm van de volgende oplossingen:
 - 2,2 · 10⁻⁵ M NADH
 - 7 · 10⁻⁶ M NADH + 4,2 · 10⁻⁵ M ATP
9. Bereken de concentraties aan NADPH en ATP in oplossingen met volgende absorpties:
 - 340 nm: 0,15 - 260 nm: 0,90
 - 340 nm: 0,22 - 260 nm: 0,531
10. Een oplossing die NAD⁺ en NADH bevat heeft een OD van 0,311 bij 340 nm en 1,2 bij 360 nm. Bereken de concentraties van NAD⁺ en NADH in de oplossing.
11. Een oplossing bevat 2 componenten, A en B. Bij 260 nm bedraagt de absorptie 0,45, bij 400 nm bedraagt deze 0,225. Bereken de concentraties van A en B gegeven:

Tabel 4: ϵ_m (M⁻¹ cm⁻¹) bij 350 nm en 400 nm voor componenten A en B.

	ϵ_m (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
	350 nm	400 nm
A	15200	11250
B	13400	4500

12. Een oplossing bevat 2 componenten, C en D. In een kuwet is de absorptie bij 350 nm gelijk aan 0,36. Bij 400 nm is deze 0,225. Bereken de concentratie van C en D in de oplossing. Zie

onderstaande tabel voor de waarden van de extinctiecoëfficiënten.

Tabel 5: ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$) bij 350 nm en 400 nm voor componenten C en D.

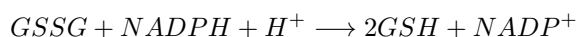
	ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$)	
	350 nm	400 nm
C	15000	3000
D	7000	6500

13. Een extract (5 mL) van 10 g bladmateriaal van *Spinacia* bevat 2 componenten, E en F. De absorptie bij 350 nm is gelijk aan 0,36. Bij 400 nm is deze 0,225. Bereken de concentraties van E en F, gegeven de moleculaire gewichten van E ($235 g mol^{-1}$) en F ($433 g mol^{-1}$), als ook het (procentuele) gehalte van deze 2 componenten per g bladmateriaal.

Tabel 6: ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$) bij 350 nm en 400 nm voor componenten E en F.

	ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$)	
	350 nm	400 nm
E	1500	3200
F	7000	600

14. Een eiwitoplossing (0,3 mL) wordt verdund met 0,9 mL gedestilleerd water. Aan 0,5 mL van dit mengsel wordt 4,5 mL kleurreagens toegevoegd. De absorptie van dit mengsel bij 540 nm bedraagt 0,18. De absorptie van een mengsel van 0,5 mL standaardoplossing (4 mg eiwit per mL) met 4,5 mL van het kleurreagens gaf 0,12 als absorptie bij dezelfde golflengte. Bereken de concentratie aan eiwit in de oorspronkelijke, onverdunde oplossing.
15. Een opgezuiverd eiwit dat een molecule molybdeen bevat per eiwitmolecule, heeft een $\epsilon^{0,1\%}$ van 1,5 bij 280 nm. Deze $\epsilon^{0,1\%}$ is de absorptie van het eiwit in een concentratie van $1 mg mL^{-1}$. Een geconcentreerde oplossing bevat $10,56 \mu g Mo$ per mL (MW: 95,94). Een 1:50 verdunning van deze oplossing heeft een absorptie bij 280 nm van 0,375. Bereken het minimale moleculaire gewicht van dit enzyme.
16. We voegen 1,5 mL van een NADPH-oplossing van $2 \cdot 10^{-4} M$ toe aan een 1,5 mL van een mengsel geoxideerd glutathion (GSSG, concentratie onbekend) en een hoeveelheid van het enzyme glutathion-reductase. De gekatalyseerde reactie is de volgende:



Na afloop van de reactie is de absorptie van de oplossing 0,25 bij 340 nm. Bereken de concentratie aan verbruikt GSSG in de oorspronkelijke 1,5 mL. $NADP^+$, GSSG en GSH absorberen niet bij deze golflengte.

17. Uit 10 g thallusweefsel van *Fucus* wordt met 25 mL ether chlorofyl a (MW: 893,6) en chlorofyl c geëtraheerd. De oplossing heeft achteraf een absorptie van 0,071 en 0,048 bij respectievelijk 430 nm en 660 nm en dit in een 0,2 cm kuvet. Bereken de concentraties van beide chlorofyllen in de etheroplossing, gebruik makend van de onderstaande extinctiecoëfficiënten. Bereken tevens het gewichtspercentage chl a in *Fucus* thallusweefsel, wetende dat de extractie verlopen is met een efficiëntie van 34 %.

Tabel 7: ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$) bij 430 nm en 660 nm voor chlorofyl a en c.

	ϵ_m ($M^{-1} cm^{-1}$)	
	430 nm	660 nm
chlorofyl a	115	90
chlorofyl c	115	0

1.3 Enzymologie

1.3.1 Specifieke activiteit

1. Een extract van plantencellen bevat 24 mg eiwit per mL. 20 μL hiervan katalyseren in een standaardvolume van 100 μL de incorporatie van $1,6 \text{ nmol min}^{-1}$ glucose in cellulose. Bereken de specifieke activiteit (SA).
2. In een bepaalde test wordt een hoeveelheid kleurloos substraat gedurende 20 min geïncubeerd met 0,3 mL van een enzymextract (eiwitgehalte 2 mg mL^{-1}), in een totaal volume van 1 mL. Het resultaat is een hoeveelheid van product C (zie §1.2, vraagstuk 12). Dit volume van 1 mL wordt aangelengd met 4 mL water en geeft een absorptie van 0,560. Bereken de SA van dit extract.
3. In een volgende test wordt een hoeveelheid kleurloos substraat gedurende 15 min geïncubeerd met 0,4 mL van een enzymextract (eiwitgehalte $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) in een totaal volume van 5 mL. Het resultaat is een hoeveelheid van product D (zie §1.2, vraagstuk 12). 2 mL hiervan wordt aangelengd met 3 mL water en geeft een absorptie van 0,430. Bereken de SA van dit extract.
4. (a) In een nog andere test wordt een hoeveelheid kleurloos substraat gedurende 20 min geïncubeerd met 0,4 mL van een enzymextract in een totaal volume van 5 mL. De reactie wordt stopgezet door toevoeging van 1 mL trichloorazijnzuur. Het resultaat is een hoeveelheid van product F (zie §1.2, vraagstuk 13). 0,5 mL hiervan wordt aangelengd met fosfaatbuffer tot 3 mL en geeft een absorptie van 1,410 bij 350 nm. Bereken de enzymactiviteit en vervolgens de SA van dit extract m.b.v. het eiwitgehalte bekomen in (b).

(b) 50 μL van een 1:10 verdunning van het extract wordt met acetaatbuffer aangelengd tot 1 mL en vervolgens gemixt met 3 mL van oplossing A, 1 u geïncubeerd en vervolgens gemixt met 1 mL van een oplossing B. De absorptie van dit mengsel wordt bepaald bij 660 nm en bedraagt 0,215.

Tegelijk wordt een concentratiereeks opgesteld m.b.v. een standaard eiwitoplossing BSA van 1 mg mL^{-1} . Verschillende volumes worden met acetaatbuffer aangelengd tot 50 μL waarna dezelfde procedure wordt gevolgd (aanlengen met buffer tot 1 mL, vervolgens wordt 3 mL oplossing A toegevoegd en na 1 u weer 1 mL oplossing B). De resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven. Bepaal het eiwitgehalte in het oorspronkelijke extract.

Tabel 8: Gebruikte volume van de standaard (μL) en bijhorende absorptiewaarden bij 660 nm. Opmerking: de waarde voor a in de ijklijn $y = ax$ wordt gegeven door $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$.

Volume standaard (μL)	absorptie bij 660 nm
5	0,043
10	0,085
20	0,160
50	0,430

1.3.2 Lineweaver-burk transformaties

1. Bereken K_m en V_{\max} voor enzyme A, uitgaande van de data in onderstaande tabel.

Tabel 9: Concentratie van het substraat in M telkens met bijhorende berekende specifieke activiteit (SA) in $\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Concentratie substraat (M)	SA ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
$8,33 \cdot 10^{-6}$	13,8
$1,00 \cdot 10^{-5}$	16,0
$1,25 \cdot 10^{-5}$	19,0
$1,67 \cdot 10^{-5}$	23,6
$2,00 \cdot 10^{-5}$	26,7
$2,50 \cdot 10^{-5}$	30,8
$3,33 \cdot 10^{-5}$	36,3
$4,00 \cdot 10^{-5}$	40,0
$5,00 \cdot 10^{-5}$	44,4
$6,00 \cdot 10^{-5}$	48,0
$8,00 \cdot 10^{-5}$	53,4
$1,00 \cdot 10^{-4}$	57,1
$2,00 \cdot 10^{-4}$	66,7

2. De substraatkinetiek werd opgesteld voor een bepaald enzyme Y. Vervolgens wordt deze bepaald in de aanwezigheid van de inhibitoren I_1 en I_2 . Gevraagd: bereken telkens K_m en V_{\max} . Wat voor inhibitoren zijn I_1 en I_2 ?

Tabel 10: Concentratie van het substraat S in mM telkens met bijhorende berekende specifieke activiteit (SA) in $\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zonder en met inhibitoren I_1 en I_2 .

S (mM)	SA ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	SA met I_1 ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	SA met I_2 ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
0	0	0	0
1	2,5	1,17	0,77
2	4,0	2,10	1,25
5	6,3	4,00	2,00
10	7,6	5,7	2,50
20	9,0	7,2	2,86

3. (a) Gegeven: de activiteit van enzymen E_1 en E_2 ($\mu\text{mol}(\text{mg}_{\text{eiwit}})^{-1} \text{ min}^{-1}$) bij verschillende concentraties van het substraat voor dit enzyme. E_1 is een enzyme uit embryonaal leverweefsel, E_2 een enzyme dat dezelfde reactie katalyseert, maar afkomstig is uit leverweefsel van een volwassen persoon. Bereken voor elk de K_m en V_{\max} .

Tabel 11: Concentratie van het substraat in M telkens met bijhorende berekende specifieke activiteit (SA) in $\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ voor enzymen E_1 en E_2 .

Concentratie (M)	SA van E_1 ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	SA van E_2 ($\text{mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
$1,67 \cdot 10^{-5}$	5,00	1,05
$2,50 \cdot 10^{-5}$	6,66	1,54
$3,33 \cdot 10^{-5}$	8,00	1,98
$5,00 \cdot 10^{-5}$	10,00	2,86
$7,00 \cdot 10^{-5}$	11,67	3,78
$1,00 \cdot 10^{-4}$	13,33	5,00
$1,5 \cdot 10^{-4}$	15,00	6,67
$1,67 \cdot 10^{-4}$	15,40	7,15
$2,0 \cdot 10^{-4}$	16,00	8,00
$3,0 \cdot 10^{-4}$	17,10	10,00

- (b) Bij de analyse van het bloed van een bepaalde patiënt vindt men de volgende data:

Tabel 12: Concentratie van het substraat in M telkens met bijhorende berekende specifieke activiteit (SA) in $\text{mmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ voor een bloedstaal met onbekend enzyme.

Concentratie (M)	SA ($\mu\text{mol (mL}_{\text{serum}})^{-1} \text{min}^{-1}$)
$5,0 \cdot 10^{-5}$	43
$7,0 \cdot 10^{-5}$	57
$1,0 \cdot 10^{-4}$	75
$1,5 \cdot 10^{-4}$	100
$2,0 \cdot 10^{-4}$	120
$3,0 \cdot 10^{-4}$	150
$6,0 \cdot 10^{-4}$	200

Het kan hier gaan om het reeds genoemde E_2 , dat bij ernstige leverschade vrijkomt in de bloedbaan, maar ook om een enzyme E_3 uit de spieren, dat dezelfde reactie katalyseert. E_3 komt echter vrij in de bloedbaan na zware inspanning, wat veel onschuldiger is. E_3 heeft een K_m van $2 \cdot 10^{-5}$ M. Lijdt de patiënt die net bewusteloos het hospitaal is binnengebracht aan een ernstige leverkwaal, of had hij net een zware inspanning geleverd?

- Op een dag merk je dat een slijmerige vlek op de vloerbekleding deze langzaam maar zeker verteert. Als een goed bioloog herken je hierin natuurlijk de actie van een bacterie. Het blijkt bij nader onderzoek dat de bacterie de unieke eigenschap heeft om nylon als voedingsbron te gebruiken. Na lang en hard werken (*cfr.* Microbiologie en Moleculaire Biologie uit de 3^{de} Ba Bio) kan je het verantwoordelijke enzyme isoleren en opzuiveren. Tot slot wil je ook de biochemie van het enzyme achterhalen en je vindt de volgende data zonder (V_1) en met inhibitor Gly-Gly (V_2). Wat voor inhibitor is Gly-Gly?

Tabel 13: Reactiesnelheden V_1 en V_2 telkens in s^{-1} respectievelijk met en zonder inhibitor voor een gegeven substraatconcentratie S (g L^{-1}).

[S] (g L^{-1})	V_1 (s^{-1})	V_2 (s^{-1})
0	0,0	0,0
1	12,0	4,0
2	17,0	8,0
3	20,0	10,4
4	21,5	12,0
5	22,8	13,4
6	23,8	14,7
7	24,6	15,7
8	25,2	15,9
9	25,8	16

- (a) Uit 5 g van *Nicotiana tabacum* halen we 10 mL extract. Eerst wordt het eiwitgehalte in dit extract bepaald. 50 μL van een 4 x verdunning wordt aangelengd tot 1 mL en vervolgens gemixt met 3 mL van oplossing A, 1 u geïncubeerd en vervolgens gemixt met 1 mL van oplossing B. De absorptie van dit mengsel bij 660 nm bedraagt 0,560, met ϵ_{660} gelijk aan $37,2 (\text{mg}_{\text{eiwit}})^{-1} \text{cm}^{-1}$. Bepaal het eiwitgehalte in het oorspronkelijke extract.

(b) 0,4 mL substraat wordt aangelengd tot 2,4 mL met acetaatbuffer. Om de reactie te starten wordt 0,1 mL van een 5 x verdunning van het oorspronkelijke extract toegevoegd. Het mengsel wordt 20 min geïncubeerd bij 30 °C. Hierna wordt 1 mL uit de reactie gehaald en toegevoegd aan 3 mL 2 M azijnzuur om de reactie te stoppen. De absorptie van het gevormde product P bij 420 nm is 0,42.

Tegelijk wordt een concentratiereeks P (MW: 250) opgesteld m.b.v. een standaardoplossing van 1 mg mL^{-1} . Verschillende volumes worden met acetaatbuffer aangelengd tot 3 mL en hiervan wordt de absorptie bij 420 nm gemeten. Bereken de SA van het extract.

Tabel 14: Gebruikte volume van de standaard (μL) en bijhorende absorptiewaarden bij 420 nm. Opmerking: de waarde voor a in de ijklijn $y = ax$ wordt gegeven door $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$.

Volume standaard (μL)	absorptie bij 420 nm
50	0,052
100	0,108
200	0,220
500	0,540

(c) Bereken tot slot de totale activiteit en de activiteit per gram versgewicht van dit extract.

2 Oplossingen

2.1 Concentraties

1. Hoeveel g van de desbetreffende stof dient te worden afgewogen voor de aanmaak van de gevraagde oplossing?

Tabel 15: Product, molecuulair gewicht (MW), concentratie, volume en af te wegen hoeveelheid.

	Product	MW	Concentratie	Volume	Af te wegen
1.	Glucose	198,17	1 M	1 L	198,2 g
2.	Sucrose	342,30	2 M	100 mL	68,5 g
3.	NaH ₂ PO ₄	137,99	1 M	250 mL	34,5 g
4.	KOH	56,11	2 M	500 mL	56,1 g
5.	KCl	122,55	3 M	50 mL	18,4 g
6.	NaCl	58,44	100 mM	250 mL	1,461 g
7.	Na-tartraat	194,08	200 mM	100 mL	3,9 g
8.	Sorbitol	182,17	500 mM	250 mL	22,8 g
9.	EDTA	292,25	50 mM	500 mL	7,3 g
10.	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	10 mM	50 mL	66 mg
11.	Ureum	60,06	1 mM	20 mL	1,2 mg
12.	Na-acetaat	136,08	10 mM	100 mL	136 mg
13.	Valine	117,10	10 µM	10 mL	11,7 µg
14.	Arginine	274,25	50 µM	50 mL	685 µg
15.	Pyruvaat	110,00	10 mM	100 mL	110 mg

2. Hoeveel mL van oplossing A heb je nodig om oplossing B te maken?

1. 2,5 mL
2. 0,2 mL
3. 0,835 mL
4. 0,287 mL

2.2 Spectrofotometrie

1. $A = \varepsilon cl$

$$A = \log \frac{1}{T} \Leftrightarrow 10^A = \frac{1}{T}$$

$$10^{-5} M ATP : T_{260 nm} = 70,2 \%$$

$$A = \log \frac{1}{70,2\%} = \varepsilon \cdot 10^{-5} M \cdot 1 cm \Leftrightarrow \varepsilon = \frac{\log \frac{1}{0,702}}{10^{-5} M \cdot cm} = 15366 \frac{1}{M \cdot cm} \longrightarrow 15400 \frac{1}{M \cdot cm}$$

$$A_{3 cm} = \varepsilon cl = 15366 \frac{1}{M \cdot cm} \cdot 10^{-5} M \cdot 3 cm = 0,461$$

$$T_{3 cm} = \frac{1}{10^A} = 0,346 \longrightarrow 34,6 \%$$

$$A = 15366 \frac{1}{M \cdot cm} \cdot 5 \cdot 10^{-5} M \cdot 1 cm = 0,768$$

2. $NAD^+ : 5 \cdot 10^{-5} M$

$$T = 12,6 \% \text{ in } 1 cm$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \varepsilon cl \Leftrightarrow 0,9 = \log \frac{1}{0,126} = \varepsilon \cdot 5 \cdot 10^{-5} M \cdot 1 cm \Leftrightarrow \varepsilon = 18000 \frac{1}{M \cdot cm}$$

$$A_{2 cm} = \varepsilon \cdot 5 \cdot 10^{-5} M \cdot 2 cm = 1,799$$

$$T_{2 cm} = \frac{1}{10^A} = 0,01588 \longrightarrow 1,6 \%$$

$$A = 2 \cdot 10^{-6} M \cdot 18000 \frac{1}{M \cdot cm} \cdot 1 cm = 0,03598 \longrightarrow 0,036$$

3. $T = 0,75 \%$

$$T = 0,75 = \frac{1}{10^A} \longrightarrow A = \log \frac{1}{0,75} = \varepsilon cl$$

$$\Leftrightarrow \varepsilon = \frac{\log \frac{1}{0,75}}{2 \frac{g}{L} \cdot 1 cm} = 0,0625 \frac{L}{g \cdot cm}$$

$$MW = 250 \frac{g}{mol} \longrightarrow 0,0625 \cdot 250 \frac{g \cdot L}{mol \cdot g \cdot cm} \longrightarrow \varepsilon = 15,6 \frac{1}{M \cdot cm}$$

$$1 \frac{g}{L} \longrightarrow A = \frac{0,1249}{2} = 0,0625 \longrightarrow T = \frac{1}{10^A} = 0,866 \longrightarrow 87 \%$$

$$4 \frac{g}{L} \longrightarrow A = 0,1249 \cdot 2 = 0,2498 \longrightarrow T = \frac{1}{10^A} = 0,5626 \longrightarrow 56,3 \%$$

$$6 \frac{g}{L} \longrightarrow A = 0,1249 \cdot 3 = 0,3747 \longrightarrow T = \frac{1}{10^A} = 0,422 \longrightarrow 42,2 \%$$

$$5,4 \frac{g}{L} \longrightarrow A = 0,0625 \frac{L}{g \cdot cm} \cdot 1 cm \cdot 5,4 \frac{g}{L} = 0,3375 \longrightarrow T = \frac{1}{10^A} = 0,4597 \longrightarrow 46 \%$$

4. 2 meetpunten: gemiddelde \pm SE

$$C(\frac{mg}{mL}) = 1,5 \cdot A_{280 nm} \cdot \frac{mg}{mL} - 0,75 \cdot A_{260 nm} \cdot \frac{mg}{mL} = 0,3925 \frac{mg}{mL}$$

$$C(\frac{\mu g}{mL}) = 114 \cdot (0,47 - 0,20) \frac{\mu g}{mL} = 38,88 \frac{\mu g}{mL} = 0,3888 \frac{mg}{mL}$$

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n}}$$

$$i=1 (0,3925 - 0,3907) \frac{mg}{mL} = 0,0018 \frac{mg}{mL} \longrightarrow 3,24 \cdot 10^{-6} (\frac{mg}{mL})^2$$

$$i=2 (0,3888 - 0,3907) \frac{mg}{mL} = -0,0019 \frac{mg}{mL} \longrightarrow 3,61 \cdot 10^{-6} (\frac{mg}{mL})^2$$

$$n=2 \sum = 6,85 \cdot 10^{-6} (\frac{mg}{mL})^2$$

$$SE = \frac{0,00261725}{1,414213562} (\frac{mg}{mL}) = 0,00185 (\frac{mg}{mL}) \longrightarrow c = 0,3907 \pm 0,0019 \frac{mg}{mL}$$

5. $A = 1 = \varepsilon cl = \varepsilon \cdot 400 \frac{mg}{L} \cdot 1 cm \Leftrightarrow \varepsilon = \frac{1}{400} \frac{L}{mg \cdot cm}$

$$T = 30 \% \longrightarrow A = \log \frac{1}{0,30} = 0,523$$

$$C_{30\%T} = \frac{A}{\varepsilon l} = \frac{0,523}{\frac{1}{400} \frac{L}{mg \cdot cm} \cdot 3 cm} = 69,73 \frac{mg}{L} \longrightarrow 70 \frac{mg}{L}$$

6. $T = 20\% \longrightarrow A = \log_{0,2} \frac{1}{0,2} = 0,69897$

$$\varepsilon = \frac{A}{cl} \Leftrightarrow c = \frac{0,7 \text{ mL}}{10^5 \text{ cellen.cm}}$$

als $A = 0,9 \longrightarrow c = \frac{0,9 \cdot 10^5 \text{ cellen}}{0,69897 \text{ mL}} = 1,29 \cdot 10^5 \frac{\text{cellen}}{\text{mL}} = 1,29 \cdot 10^8 \frac{\text{cellen}}{\text{L}}$

7. $\varepsilon\%$ concentratie in $\% \frac{w}{v} : \frac{g}{100 \text{ mL}}$

$\varepsilon^{0,1\%}$: ε voor oplossing met concentratie van $\frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$

$A = 0,38 = \varepsilon cl \Leftrightarrow c = \frac{0,38}{0,2 \cdot 3} \frac{g}{100 \text{ mL}} = 0,63\% \left(\frac{w}{v}\right)$

8. $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ M NADPH}$

$A_{260 \text{ nm}} = 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot 15000 \cdot 1 = 0,330$

$A_{340 \text{ nm}} = 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot 6220 \cdot 1 = 0,137$

$7 \cdot 10^{-6} \text{ NADH} + 4,2 \cdot 10^{-5} \text{ M ATP}$

Bij 260 nm:

$7 \cdot 10^{-6} \cdot 1 \cdot 15000 \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} = 0,105$ en $4,2 \cdot 10^{-5} \cdot 1 \cdot 15400 \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} = 0,647 \longrightarrow 0,105 + 0,647 = 0,752$

Bij 340 nm:

$7 \cdot 10^{-6} \cdot 1 \cdot 6220 \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} = 0,044$ en ATP: $0 \longrightarrow 0,044 + 0 = 0,044$

9. 340 nm: $C_{\text{NADPH}} \cdot 6220 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} = 0,15 \Leftrightarrow C_{\text{NADPH}} = \frac{0,15}{6220} \text{ M} = 24,115 \mu\text{M}$

260 nm: $0,90 = 24,115 \cdot 1 \cdot 15000 \cdot 10^{-6} \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} + C_{\text{ATP}} \cdot 15400 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} \Leftrightarrow C_{\text{ATP}} = \frac{0,90 - 24,115 \cdot 15000 \cdot 10^{-6}}{15400} \text{ M} =$

$34,952 \cdot 10^{-6} \text{ M} \longrightarrow 35 \mu\text{M}$

340 nm: $0,22 = C_{\text{NADPH}} \cdot 6220 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} \Leftrightarrow C_{\text{NADPH}} = \frac{0,22}{6220} \text{ M} = 35,369 \cdot 10^{-6} \text{ M} \longrightarrow 35 \mu\text{M}$

260 nm: $0,531 = 35 \cdot 10^{-6} \cdot 15000 \cdot 1 \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} + C_{\text{ATP}} \cdot 15400 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M}} \Leftrightarrow C_{\text{ATP}} = \frac{0,531 - 35 \cdot 15000 \cdot 10^{-6}}{15400} \text{ M} =$

$0,039 \mu\text{M}$

10. 340 nm: $0,311 = C_{\text{NAD}^+} \cdot 0,1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} + C_{\text{NADH}} \cdot 6220 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} \Leftrightarrow C_{\text{NADH}} = \frac{0,311 - 0}{6220 \cdot 1} \text{ M} = 0,00005 \text{ M} =$

$50 \mu\text{M}$

260 nm: $1,2 = 50 \cdot 10^{-6} \cdot 15000 \cdot 1 \frac{\text{M.cm}}{\text{M.cm}} + C_{\text{NAD}^+} \cdot 18000 \cdot 1 \frac{\text{cm}}{\text{M.cm}} \Leftrightarrow C_{\text{NAD}^+} = \frac{1,2 - 50 \cdot 10^{-6} \cdot 15000}{18000 \cdot 1} \text{ M} =$

$25 \mu\text{M}$

11. $0,45 = 15200 \cdot C_A \frac{1}{\text{M}} + 13400 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}} \Leftrightarrow C_A = \frac{0,45 - 13400 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}}{15200 \frac{1}{\text{M}}}$

$0,225 = 11250 \cdot C_A \frac{1}{\text{M}} + 4500 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}$

$\Leftrightarrow 0,225 = 11250 \cdot \left(\frac{0,45 - 13400 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}}{15200 \frac{1}{\text{M}}} \right) \frac{1}{\text{M}} + 4500 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}$

$\Leftrightarrow 0,225 = \frac{11250}{15200} \cdot 0,45 - \frac{11250 \cdot 13400 \cdot C_B}{15200} \frac{1}{\text{M}} + 4500 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}$

$\Leftrightarrow 0,225 = 0,333 - 5417,8 \cdot C_B \frac{1}{\text{M}}$

$\Leftrightarrow C_B = \frac{0,333 - 0,225}{5417,8} \text{ M} = 19,489 \cdot 10^{-6} \text{ M} \longrightarrow 19,5 \mu\text{M}$

du: $C_A = \frac{0,45 - 13400 \cdot 19,489 \cdot 10^{-6}}{15200} \text{ M} = 12,424 \cdot 10^{-6} \text{ M} \longrightarrow 12,4 \mu\text{M}$

12. 350 nm: $0,36 = 15000 \cdot C_c \frac{1}{\text{M}} + 7000 \cdot C_D \frac{1}{\text{M}} \Leftrightarrow C_c = \frac{0,36 - 7000 \cdot C_D \frac{1}{\text{M}}}{15000 \frac{1}{\text{M}}}$

400 nm: $0,225 = 3000 \cdot C_c \frac{1}{\text{M}} + 6500 \cdot C_D \frac{1}{\text{M}}$

$$\Leftrightarrow 0,225 = 3000 \cdot \left(\frac{0,36 - 7000 \cdot C_D \cdot \frac{1}{M}}{15000 \cdot \frac{1}{M}} \right) \cdot \frac{1}{M} + 6500 \cdot C_D \cdot \frac{1}{M}$$

$$\Leftrightarrow 0,225 = 0,20,36 - 1400 \cdot C_D \cdot \frac{1}{M} + 6500 \cdot C_D \cdot \frac{1}{M}$$

$$\Leftrightarrow C_D = \frac{0,225 - 0,072}{(6500 - 1400) \cdot \frac{1}{M}} = 0,00003 M = 30 \mu M$$

$$\text{dus: } C_c = \frac{0,36 M - 7000 \cdot 0,00003 M}{15000} = 0,00001 M = 10 \mu M$$

13. 10 g spinazie in 5 mL extract

$$320 \text{ nm: } 0,360 = 15000 \cdot C_E \cdot \frac{1}{M} + 7000 \cdot C_F \cdot \frac{1}{M} \Leftrightarrow C_E = \frac{0,36 - 7000 \cdot C_F \cdot \frac{1}{M}}{1500 \cdot \frac{1}{M}}$$

$$400 \text{ nm: } 0,225 = 3200 \cdot C_E \cdot \frac{1}{M} + 600 \cdot C_F \cdot \frac{1}{M}$$

$$\Leftrightarrow 0,225 = 3200 \cdot \left(\frac{0,36 - 7000 \cdot C_F \cdot \frac{1}{M}}{1500 \cdot \frac{1}{M}} \right) \cdot \frac{1}{M} + 600 \cdot C_F \cdot \frac{1}{M}$$

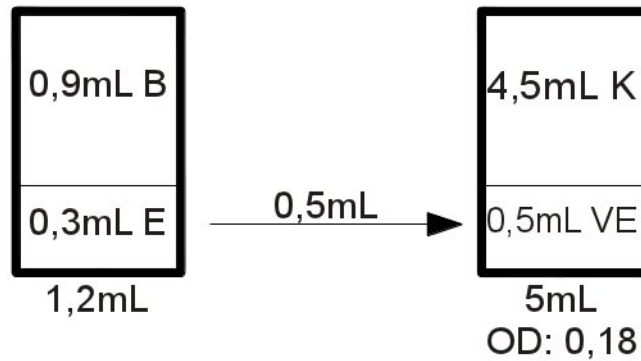
$$\Leftrightarrow C_F = \frac{0,225 - 0,768}{(600 - 14933,33) \cdot \frac{1}{M}} = 3,79 \cdot 10^{-5} M \rightarrow 38 \mu M$$

$$\text{dus: } C_E = \frac{0,36 M - 7000 \cdot 3,79 \cdot 10^{-5} M}{1500} = 6,32 \cdot 10^{-5} M \rightarrow 63 \mu M$$

E: $235 \frac{g}{mol} \cdot 6,32 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{L} = 0,01485 \frac{g}{L} \rightarrow 0,0000743 \text{ g in 5 mL extract of } 0,0000743 \text{ g in 10 g spinazie of } 0,0074 \frac{mg_{eiwit}}{g_{FW}}$

F: $433 \frac{g}{mol} \cdot 3,79 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{L} = 0,0164 \frac{g}{L} \rightarrow 0,000082 \text{ g in 5 mL extract of } 0,000082 \text{ g in 10 g spinazie of } 0,0082 \frac{mg_{eiwit}}{g_{FW}}$

14. In Figuur 1 wordt een overzicht gegeven van alle bewerkingen die met het eiwitstaal gebeuren.



Figuur 1: Schema staalbehandeling met: B: buffer; E: eiwitoplossing; K: kleurreagens en VE: verdunde eiwitoplossing.

Uit een standaardoplossing van 4 mg eiwit per mL reageert 0,5 mL met 4,5 mL kleurreagens:

$$\rightarrow OD = 0,12 = \epsilon \cdot 2 \frac{mg}{5 mL} \cdot 1 cm \Leftrightarrow \epsilon = 0,12 \cdot \frac{5}{2} \cdot \frac{mL}{mg \cdot cm}$$

OD gemeten testoplossing: 0,18

$$\rightarrow 0,18 = 0,12 \cdot \frac{5}{2} \cdot 1 \cdot C_{staal} \frac{mL}{mg} \Leftrightarrow C_{staal} = \frac{0,18 \cdot 2}{0,12 \cdot 5} \frac{mg}{mL} = 0,6 \frac{mg}{mL}$$

dus: in totaal zat in de gemeten oplossing $0,6 \frac{mg}{mL} \cdot 5 mL = 3 mg$ eiwit

Deze 3 mg werd uit de eerste proefbuis genomen in een volume van 0,5 mL, dus concentratie van $6 \frac{mg}{mL}$

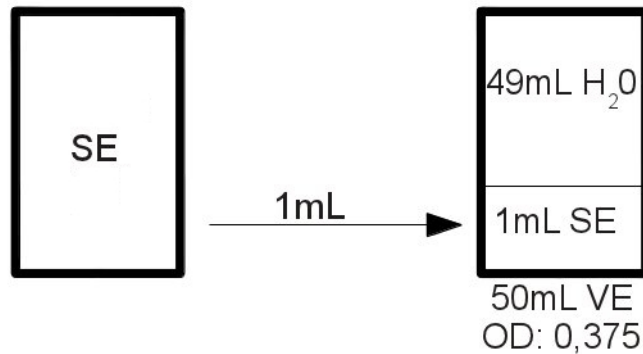
$\rightarrow 6 \frac{mg}{mL} \cdot 1,2 mL = 7,2 mg$ in 0,3 mL onverdunde oplossing $\rightarrow 24 \frac{mg}{mL}$ in oorspronkelijke eiwitop-

lossing

Of: andere redenering: $0,6 \frac{mg}{mL}$ werd 10 keer verdund door 0,5 mL over te brengen in 5 mL $\rightarrow 6 \frac{mg}{mL}$; deze werd 4 keer verdund door 0,3 mL over te brengen in 1,2 mL $\rightarrow 24 \frac{mg}{mL}$

15. $\varepsilon^{0,1\%} \rightarrow$ concentratie in 0,1 g per 100 mL of 1 mg per mL

$$280 \text{ nm: } A = \varepsilon cl \Leftrightarrow 1,5 = \varepsilon^{0,1\%} \cdot 1 \frac{mg}{mL} \cdot 1 \text{ cm} \Leftrightarrow \varepsilon^{0,1\%} = 1,5 \frac{mL}{mg \cdot cm}$$



Figuur 2: Schema staalbehandeling met: SE: stock eiwit en VE: verdunde eiwitoplossing.

In Figuur 2 wordt 1 mL SE 50 maal verdund in een eindvolume van 50 mL:

$$\rightarrow 0,375 = 1,5 \frac{mL}{mg \cdot cm} \cdot C_{VE} \cdot 1 \text{ cm} \Leftrightarrow C_{VE} = \frac{0,375}{1,5 \cdot 1} \frac{mg \cdot cm}{mL \cdot cm} = 0,25 \frac{mg}{mL}$$

dus: 0,25 mg verdund eiwit in 1 mL \rightarrow 12,5 mg verdund eiwit in 50 mL \rightarrow SE: 12,5 mg eiwit per mL

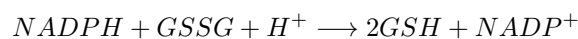
in 1 mL stock: $\frac{10,56}{95,94} \frac{\mu g_{Mo}}{\mu mol} = 0,11 \mu mol_{Mo} \rightarrow$ 1 molecule Mo per molecule eiwit

\rightarrow 0,11 μ mol eiwit komt overeen met 12,5 mg of 0,11 mmol eiwit komt overeen met 12,5 g

$$\rightarrow \frac{12,5}{0,11 \cdot 10^{-3}} \frac{g_{eiwit}}{mol_{eiwit}} = 113636,36 \frac{g_{eiwit}}{mol_{eiwit}} = 113,6 \text{ kDa}$$

16. NADPH: $2 \cdot 10^{-4}$ M of $2 \cdot 10^{-7}$ mol in 1 mL \rightarrow $3 \cdot 10^{-7}$ mol in 1,5 mL

1,5 mL NADPH reageert met 1,5 mL GSSG volgens onderstaande reactie:



na reactie: $0,25 = C_{NADPH} \cdot \varepsilon_{NADPH} \cdot 1 \text{ cm} + 0 GSGG + 0 GSH + 0 NADP^+$

$$\Leftrightarrow C_{NADPH} = \frac{0,25}{6220 \cdot 1} \frac{mol \cdot cm}{l \cdot cm} = 40,192 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

dus in 3 mL reactievolume: $40,192 \cdot 10^{-6}$ mol per L of $40,192 \cdot 10^{-9}$ mol per mL \rightarrow $120,6 \cdot 10^{-9}$ mol in 3 mL

voor reactie: $3 \cdot 10^{-7}$ mol NADPH of $300 \cdot 10^{-9}$ mol NADPH

verbruikt: $(300 - 120,6) \cdot 10^{-9}$ mol NADPH = $179,4 \cdot 10^{-9}$ mol NADPH

uit reactievergelijking: # mol NADPH = # mol GSSG

$$\rightarrow 179,4 \text{ nmol GSSG verbruikt in } 1,5 \text{ mL} = 0,119 \frac{mmol}{L} \rightarrow 0,12 \text{ mM}$$

17. extractie chl a en chl c uit 10 g *Fucus* in 25 mL ether met een efficiëntie van 34 %

$$660 \text{ nm: } 0,048 = 90.0,2 \cdot C_a \frac{1}{M} \Leftrightarrow C_A = \frac{0,048}{90.0,2} M = 0,00266 M \longrightarrow \text{in 25 mL extract: } 66,7 \mu\text{mol}$$

$$430 \text{ nm: } 0,071 = 115.0,2 \cdot C_a \frac{1}{M} + 115.0,2 \cdot C_c \frac{1}{M} \Leftrightarrow \frac{0,071}{23} M = C_a + C_c = 0,0031 M \Leftrightarrow C_c = (0,00308 - 0,00266) M = 0,00042 M = 0,42 \text{ mM}$$

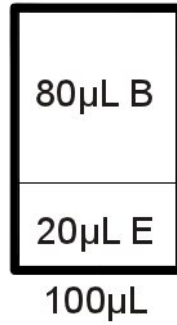
$$\text{chl a: } 67,6 \cdot 10^{-6} \cdot 893,6 \frac{\text{mol} \cdot \text{g}}{\text{mol}} = 59,573 \cdot 10^{-3} \text{ g} \longrightarrow 59,57 \text{ mg}$$

bij 34 % rendement: 59,57 mg chl a uit 10 g *Fucus* \longrightarrow bij 100 % rendement: 175 mg

2.3 Enzymologie

2.3.1 Specifieke activiteit

1. extract: $24 \text{ mg}_{\text{eiwit}} \text{ per mL} \rightarrow 20 \mu\text{L} = 0,48 \text{ mg eiwit}$

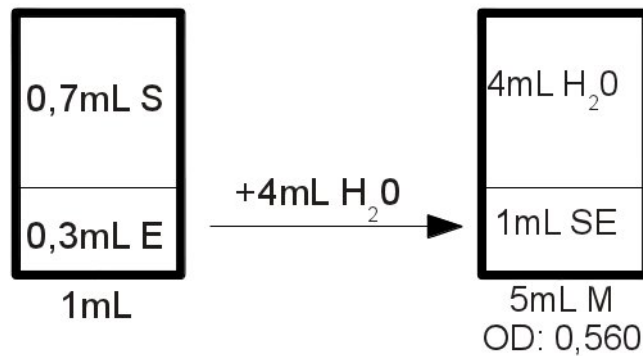


Figuur 3: $20 \mu\text{L}$ extract (E) bevat $0,48 \text{ mg}$ eiwit worden met $80 \mu\text{L}$ buffer aangelengd tot een reactievolume van $100 \mu\text{L}$.

\rightarrow per min wordt $1,6 \text{ nmol}$ glucose ingebouwd in cellulose

$$SA = \frac{\# \text{ mols}}{\# \text{ mg}_{\text{eiwit}} \cdot t} = \frac{1,6 \text{ nmol}}{0,48 \text{ mg} \cdot 1 \text{ min}} = 3,3 \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$$

2. extract: $2 \text{ mg}_{\text{eiwit}} \text{ per mL} \rightarrow 0,3 \text{ mL} = 0,6 \text{ mg extract}$



Figuur 4: $0,3 \text{ mL}$ extract (E) reageert met $0,7 \text{ mL}$ substraat (S); 1 mL van dit mengsel (SE) wordt gemengd met $4 \text{ mL H}_2\text{O}$ en de absorptie wordt bepaald bij 400 nm in een meetvolume (M) van 5 mL .

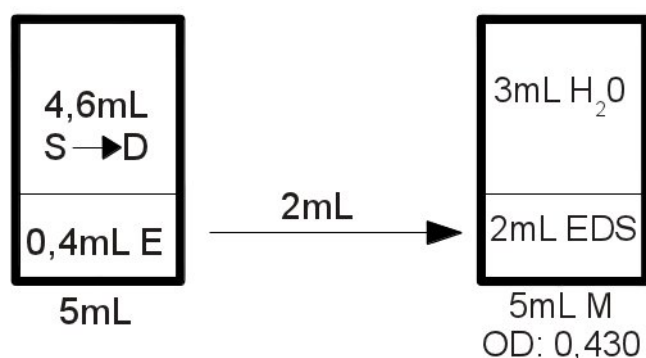
$$400 \text{ nm: } 0,560 = \varepsilon_c \cdot C_c \cdot 1 \text{ cm} \Leftrightarrow C_c = \frac{0,560}{3000} M = 0,18667 \text{ mM}$$

$\rightarrow 0,18667 \text{ mmol in } 1 \text{ L} = 0,18667 \cdot 10^{-6} \text{ M in } 1 \text{ mL} \rightarrow 0,93335 \mu\text{mol in } 5 \text{ mL meetvolume}$

Deze $0,93335 \mu\text{mol}$ gevormd product C zit tevens in het reactievolume van 1 mL

$$\rightarrow SA = \frac{0,93335 \mu\text{mol}}{0,6 \text{ mg} \cdot 20 \text{ min}} = 0,07777 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \rightarrow 78 \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$$

3. extract: $0,5 \text{ mg}_{\text{eiwit}} \text{ per mL} \rightarrow 0,4 \text{ mL} = 0,2 \text{ mg extract}$



Figuur 5: 0,4mL extract (E) reageert 15 min met 4,6mL substraat (S) en in het eindvolume van 5 mL wordt product D gevormd; 2 mL van dit mengsel (EDS) wordt gemengd met 3 mL H₂O en de absorptie wordt bepaald bij 400 nm in een meetvolume (M) van 5 mL .

$$400 \text{ nm: } 0,430 = 6500 \frac{1}{M \cdot cm} \cdot 1 \text{ cm} \cdot C_D \Leftrightarrow C_D = \frac{0,430}{6500} M = 66,153 \cdot 10^{-6} M \rightarrow 66 \mu M$$

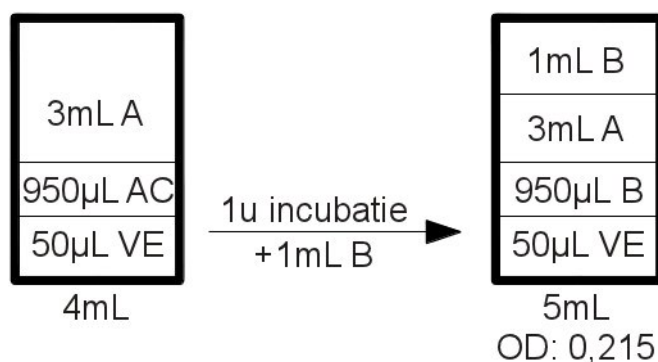
$$\text{dus gemeten: } 66,153 \cdot 10^{-6} \text{ mol per L} = 66,153 \cdot 10^{-9} \text{ mol per mL} \rightarrow 330,769 \cdot 10^{-9} \text{ mol per 5 mL}$$

$$\text{dus in reactievolumen: } \rightarrow 330,769 \cdot 10^{-9} \text{ mol per 2 mL} \rightarrow 165,384 \cdot 10^{-9} \text{ mol per mL} \rightarrow 0,82692 \cdot 10^{-6} \text{ mol in 5 mL}$$

$$\text{dus in totale reactie: } 0,82692 \cdot 10^{-6} \text{ mol C omgezet}$$

$$\rightarrow SA = \frac{0,82692 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}{0,2 \text{ mg} \cdot 15 \text{ min}} = 0,27564 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \rightarrow 276 \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$$

4. (b)



Figuur 6: 50 μL van een 1 op 10 verdund extract (VE) wordt aangelengd met acetaatbuffer (AC) tot 1 mL en vervolgens gemixt met 3 mL A. Na 1 uur incubatie wordt 1 mL B toegevoegd en wordt de absorptie van dit mengsel bepaald bij 660 nm.

Concentratierreeks met 1 mg per mL standaard (tip: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$):

Tabel 16: Data nodig voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a uit de vergelijking $y = ax$.

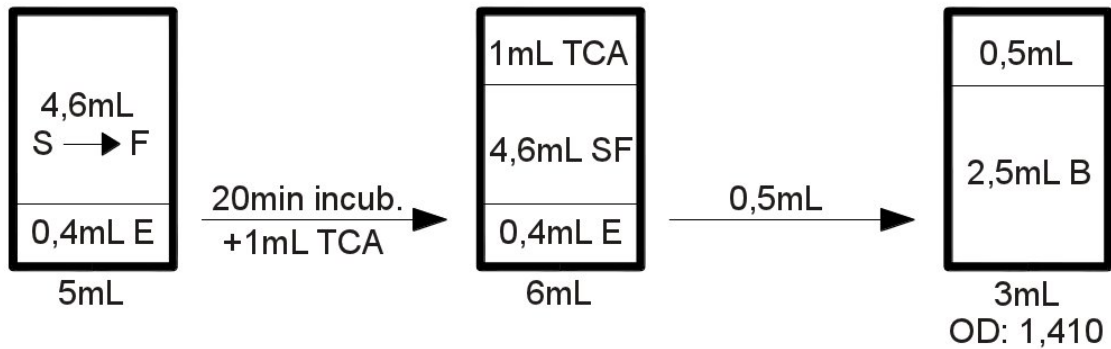
volume standaard (μL)	concentratie standaard ($\frac{mg}{mL}$) of x	OD of y	x^2	xy
5	0,1	0,043	0,01	0,0043
10	0,2	0,085	0,04	0,017
20	0,4	0,160	0,16	0,064
50	1,0	0,430	1	0,43
		Σ	1,21	0,5153

$$\rightarrow a = \frac{\sum xy}{\sum x^2} = 0,426$$

ijklijn $y = ax \Leftrightarrow \text{concentratie} = \frac{OD}{a} = 0,5048 \frac{mg}{mL} \rightarrow 10 \times \text{verdund extract: } 5,048 \text{ mg per mL} \rightarrow 5 \text{ mg per mL}$

(a) extract: $5,048 \text{ mg}_{\text{eiwit}} \text{ per mL} \rightarrow 0,4 \text{ mL} = 2,018 \text{ mg extract}$

In Figuur 7 worden de verschillen stappen getoond die uiteindelijk leiden tot het mengsel waarvan de absorptie wordt bepaald.



Figuur 7: 4,6 mL kleurloos substraat S wordt gedurende 20 min geïncubeerd met 0,4 mL enzymextract E en daarbij omgezet naar een product F. De reactie wordt stopgezet door toevoegen van 1 mL TCA. 0,5 mL uit dit mengsel wordt aangelengd tot 3 mL met fosfaatbuffer B en de absorptiewaarde hiervan wordt bepaald.

$$350 \text{ nm: } 1,410 = \varepsilon_F \cdot C_F \cdot l \Leftrightarrow C_F = \frac{1,410}{7000 \cdot 1} \frac{M \cdot cm}{cm} = 0,201 \cdot 10^{-3} M$$

dus gemeten: $0,201 \cdot 10^{-6} \text{ mol per mL} \rightarrow 0,604 \cdot 10^{-6} \text{ mol per 3 mL}$ komt overeen met $0,604 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ in 0,5 mL in de stopgezette reactie of $7,248 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ in 6 mL en deze werd aangemaakt na 20 min reactie.

$$\rightarrow SA = \frac{7,248 \mu\text{mol}}{2,081 \text{ mg} \cdot 20 \text{ min}} = 0,174 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \text{ of in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}}: SA = 0,174 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \cdot 5,048 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 0,878 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \rightarrow 900 \frac{\text{nmol}}{\text{mL} \cdot \text{min}}$$

2.3.2 Lineweaver-Burk transformaties

1. Op basis van onderstaande tabel:

$$y = ax + b$$

$$a = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \rightarrow 0,5 \cdot 10^{-6} \frac{M}{mg \cdot min}$$

$$b = \frac{\sum y}{n} - a \frac{\sum x}{n} \rightarrow 12,5 \cdot 10^{-3} \frac{1}{mg \cdot min}$$

Tabel 17: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a en intercept b uit de vergelijking $y = ax + b$. Met: S de substraatconcentratie (M) en SA de specifieke activiteit ($\frac{mmol}{mg \cdot min}$).

S (M)	SA ($\frac{mmol}{mg \cdot min}$) of V	$\frac{1}{S}$ (M^{-1}) of x	$\frac{1}{V}$ ($(\frac{mmol}{mg \cdot min})^{-1}$) of y	x^2	xy
$8,33 \cdot 10^{-6}$	13,8	120048	0,072464	14411526916	8699,132
...
$2 \cdot 10^{-4}$	66,7	5000	0,015	25000000	74,96252
\sum		569125	0,4470	40983000482	27602

$$0 = a \cdot \left(-\frac{1}{K_m}\right) + b \Leftrightarrow \frac{1}{K_m} = \frac{b}{a} \Leftrightarrow K_m = \frac{a}{b} \rightarrow 40 \mu M$$

$$\frac{1}{V_{max}} = a \cdot 0 + b \Leftrightarrow V_{max} = \frac{1}{b} \rightarrow 80 \frac{mmol}{mg \cdot min}$$

2. Op basis van onderstaande tabellen en berekeningen: I_1 competitief en I_2 niet-competitief.

Tabel 18: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a en intercept b uit de vergelijking $y = ax + b$ onder controle omstandigheden en met inhibitoren I_1 en I_2 . Met: S in mM; V, V_{I_1} en V_{I_2} in $\frac{mmol}{mg \cdot min}$; $\frac{1}{S}$ in $(mM)^{-1}$ en $\frac{1}{V}$, $\frac{1}{V_{I_1}}$ en $\frac{1}{V_{I_2}}$ in $(\frac{mmol}{mg \cdot min})^{-1}$.

S	V	V_{I_1}	V_{I_2}	$\frac{1}{S}$ of x	$\frac{1}{V}$ of y	$\frac{1}{V_{I_1}}$ of y_1	$\frac{1}{V_{I_2}}$ of y_2	x^2	xy	xy_1	xy_2
1	2,5	1,17	0,77	1	0,4	0,85	1,3	1	0,4	0,85	1,3
...
20	9,0	7,2	2,86	0,05	0,11	0,139	0,35	0,025	0,06	0,07	0,017
\sum				1,85	1,05	1,9	3,3	1,30	0,58	1,17	1,86

Tabel 19: Overzicht van de kinetische parameters a ($\frac{mM}{mg \cdot min}$), b ($\frac{1}{mg \cdot min}$), K_m (mM) en V_{max} ($\frac{mmol}{mg \cdot min}$) onder controle condities en met inhibitoren I_1 en I_2 .

	normaal	I_1	I_2
a ($\frac{mM}{mg \cdot min}$)	0,30	0,754	1
b ($\frac{1}{mg \cdot min}$)	0,99	0,1	0,3
K_m (mM)	3,05	7,54	3,33
V_{max} ($\frac{mmol}{mg \cdot min}$)	10,1	9,99	3,33

3. (a) Zie onderstaande tabellen.

Tabel 20: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a en intercept b uit de vergelijking $y = ax + b$ voor de enzymen E₁ en E₂. Met: S in M; V₁ en V₂ in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$; $\frac{1}{S}$ in M⁻¹ en $\frac{1}{V_1}$ en $\frac{1}{V_2}$ in $(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}})^{-1}$.

S	V ₁	V ₂	$\frac{1}{S}$ of x	$\frac{1}{V_1}$ of y ₁	$\frac{1}{V_2}$ of y ₂	x ²	xy ₁	xy ₂
1,67.10 ⁻⁵	5	1,05	60.10 ³	0,2	0,95	3,5.10 ⁹	11976	57028
...
3,0.10 ⁻⁴	17,1	1,54	3333	0,058	0,1	11111111	194,9	333,3
Σ			195.10 ³	0,988	3,44	6,9.10 ⁹	27051	113737

Tabel 21: Overzicht van de kinetische parameters a ($\frac{M}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$), b ($\frac{1}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$), K_m (M) en V_{max} ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$) voor E₁ en E₂.

	E ₁	E ₂
a ($\frac{M}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$)	2,5.10 ⁻⁶	15.10 ⁻⁶
b ($\frac{1}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$)	0,05	0,05
K _m (M)	50.10 ⁻⁶	0,3.10 ⁻³
V _{max} ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$)	20	20

(b) Op basis van onderstaande tabellen: K_m(E₂) \sim K_m(E_x). Dus de patiënt lijdt mogelijk aan een ernstige leverkwaal.

Tabel 22: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a en intercept b uit de vergelijking $y = ax + b$ voor de enzymen E₁ en E₂. Met: S in M; V₁ en V₂ in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$; $\frac{1}{S}$ in M⁻¹ en $\frac{1}{V_1}$ en $\frac{1}{V_2}$ in $(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}})^{-1}$.

S	V	$\frac{1}{S}$ of x	$\frac{1}{V}$ of y	x ²	xy
5.10 ⁻⁵	43	20000	0,023	400.10 ⁶	465
...
6.10 ⁻⁴	200	1667	0,005	2,8.10 ⁶	8,3
Σ		60952	0,084	787.10 ⁶	988

Tabel 23: Overzicht van de kinetische parameters a ($\frac{M}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$), b ($\frac{1}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}}$), K_m (M) en V_{max} ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$) voor E₁, E₂, E₃ en E_x.

	E ₁	E ₂	E ₃	E _x
K _m (μM)	50	304	20	297
V _{max} ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg eiwit} \cdot \text{min}}$)	20	20	nvt	298

4. Op basis van onderstaande tabellen kan worden besloten dat V_{max} gelijk blijft en Gly-Gly een competitieve inhibitor is.

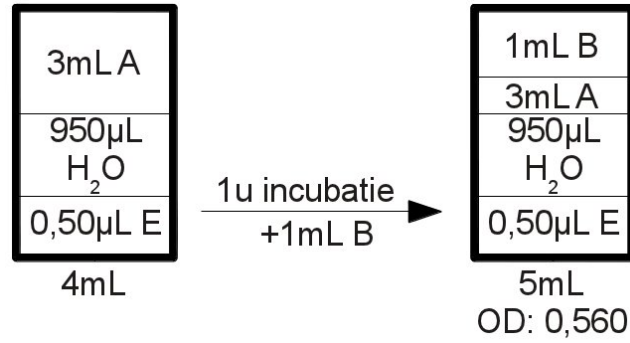
Tabel 24: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a en intercept b uit de vergelijking $y = ax + b$ voor het geïsoleerde enzyme met inhibitor (V₁) en zonder (V₂). Met: S in $\frac{g}{L}$; V₁ en V₂ in $(\frac{1}{s})$; $\frac{1}{S}$ in $(\frac{g}{L})^{-1}$ en $\frac{1}{V_1}$ en $\frac{1}{V_2}$ in $(\frac{1}{s})^{-1}$.

S	V ₁	V ₂	$\frac{1}{S}$ of x	$\frac{1}{V_1}$ of y ₁	$\frac{1}{V_2}$ of y ₂	x ²	xy ₁	xy ₂
1	12	4	1	0,83	0,25	1	0,83	0,25
...
9	25,8	16	0,11	0,039	0,06	0,01	0,004	0,007
Σ			2,82	0,44	0,89	1,54	0,17	0,42

Tabel 25: Overzicht van de kinetische parameters a ($\frac{s \cdot g}{L}$), b (s), K_m ($\frac{g}{L}$) en V_{\max} ($\frac{1}{s}$) voor E_1 en E_2 .

	V_1	V_2
a ($\frac{s \cdot g}{L}$)	0,05	0,21
b (s)	0,03	0,03
K_m ($\frac{g}{L}$)	1,48	6,5
V_{\max} ($\frac{1}{s}$)	29,7	31,0

5. (a)



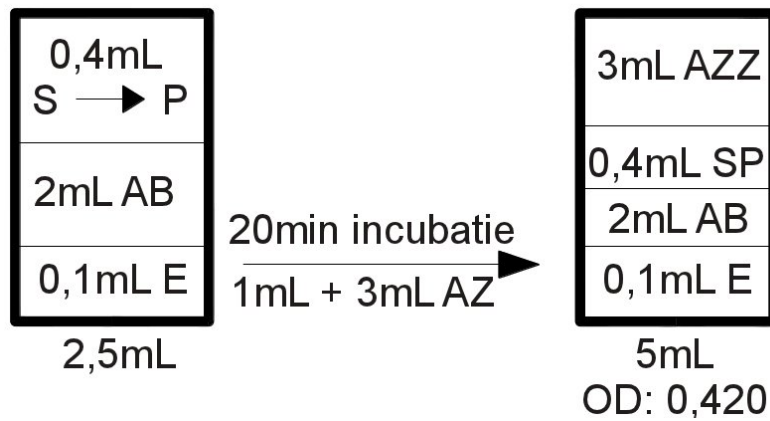
Figuur 8: 50 μL van een 4 maal verdund extract (E) wordt aangelengd met 950 μL H_2O en wordt vervolgens 1 u geïncubeerd met 3 mL A; aan dit mengsel wordt 1 mL oplossing B toegevoegd en de absorptie wordt gemeten bij 660 nm .

$$660 \text{ nm: } 0,560 = \varepsilon cl \Leftrightarrow c = \frac{0,560}{37,21} \frac{\text{mg}_{\text{eiwit}}}{\text{mL}} = 0,0151 \frac{\text{mg}_{\text{eiwit}}}{\text{mL}}$$

dus in 5 mL gemeten: 0,0755 mg_{eiwit} \rightarrow in 50 μL verdund extract: 0,0755 mg_{eiwit}

$\rightarrow \frac{E}{4}$ bevat 1,505 mg_{eiwit} in 1 mL \rightarrow het extract bevat 6,02 $\frac{\text{mg}_{\text{eiwit}}}{\text{mL}}$

(b)



Figuur 9: 100 μL van een 5 maal verdund extract (E) reageert met 0,4 mL substraat S in een mengsel dat met acetaatbuffer (AB) werd aangelengd tot 2,5 mL. Na 20 min incubatie wordt 1 mL van het reactievolume gemengd met 3 mL azijnzuur (AZ). De absorptie van dit meetvolume bedraagt 0,420.

Tabel 26: Data voor de berekening van de richtingscoëfficiënt a uit de vergelijking $y = ax$ met C de concentratie van de standaard ($\frac{mg}{mL}$).

C ($\frac{mg}{mL}$) of x	OD of y	xy	x ²
0,017	0,052	0,001	0,0003
0,033	0,108	0,004	0,0011
0,067	0,220	0,015	0,0044
0,167	0,540	0,090	0,0278
Σ	0,283	0,92	0,0336

$$a = \frac{0,109}{0,0336} \frac{mL}{mg} = 3,2441 \frac{mL}{mg}$$

gemeten concentratie P in meetvolume of x: $0,42 = ax \Leftrightarrow \frac{0,42}{3,2441} \frac{mg}{mL} = 0,1295 \frac{mg}{mL} \rightarrow 0,13 \frac{mg}{mL}$

dus: in 4 mL meetvolume: 0,518 mg \rightarrow 0,518 mg in 1 mL reactievolume \rightarrow 1,295 mg in 2,5 mL reactievolume

$$\rightarrow \# \text{ mol P gevormd} = \frac{1,29}{250 \cdot 10^3} \frac{mg}{mol} = 5,16 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

0,1 mL van een 5 keer verdund extract komt overeen met: $0,1 \text{ mL} \cdot 6,02 \frac{mg}{mL} \cdot \frac{1}{5} = 0,1204 \text{ mg eiwit}$

$$\rightarrow SA = \frac{5,16 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}{0,1204 \text{ mg} \cdot 20 \text{ min}} = 2,143 \frac{\mu\text{mol}}{mg \cdot min}$$

(c) $TA = 2,143 \frac{\mu\text{mol}}{mg \cdot min} \cdot 10 \text{ mL}_{\text{extract}} \cdot 6,02 \frac{mg_{\text{eiwit}}}{mL_{\text{extract}}} = 129 \frac{\mu\text{mol}}{min}$

$$\frac{TA}{g_{fw}} = \frac{129 \frac{\mu\text{mol}}{min}}{5 g_{fw}} = 25,8 \frac{\mu\text{mol}}{min \cdot g_{fw}}$$