

# 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 2: Eiwitbepaling suspensie plasmamembranen.

$\mu\text{L}$ suspensie	$A_{595}$
20	0,071
40	0,119
60	0,182

1. Uit 250 mg geëtioteerde stengeltjes van *Cicer arietinum* (de keker-erwt) werd 3 mL gezuiverde plasmamembranen bereid.

(a) (3 points) Op deze suspensie werd een eiwitbepaling uitgevoerd:

1. Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden vooraf bepaalde volumes telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
2. Vervolgens werd 2 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
3. Vóór het meten van de absorbantie werd nog 250  $\mu\text{L}$  kleurreagens toegevoegd.
4. Van elk staal wordt de absorbantie bij 595 nm gemeten. De meetresultaten vind je in tabel 1.
5. Een 2x verdunde suspensie van plasmamembranen werd op dezelfde manier behandeld als de standaardoplossing. De gebruikte hoeveelheden en gemeten absorbanties worden weergegeven in tabel 2.

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

$\mu\text{L}$ standaardoplossing	$A_{595}$
0	0,083
10	0,167
20	0,207
40	0,322
60	0,465
80	0,533

Bereken de eiwitconcentratie per mL plasmamembraansuspensie.

- (b) (3 points) Bij de bepaling van het enzym glucaansynthase (GS) wordt radioactief gelabeld glucose aangeboden aan 0,15 mL van de suspensie. Na een vooraf bepaalde tijd (zie tabel 3) wordt het reactiemengsel gekookt om de reactie te stoppen. De gevormde glucanen slaan neer samen met het gedenatureerde enzym. Het supernatans met de niet in glucanen gebonden  $^{14}\text{C}$ -gelabelde glucosemoleculen wordt afgegoten en verder verwijderd. Vervolgens wordt de radio-activiteit (in  $\mu\text{Curie}$ ) in de pellet (als maat voor de hoeveelheid in glucanen ingebouwde glucose) bepaald.

Bereken de specifieke activiteit van het GS in de membraansuspensie, gebruikmakend van de in deel a bepaalde eiwitconcentratie. (Heb je die eiwitconcentratie niet, gebruik dan 1 mg/mL.)

Tabel 3: Radio-activiteit in de pellet i.f.v. incubatietijd. ( $1\ \mu\text{Ci} = 1\ \mu\text{mol}$  glucose)

tijd (min)	radio-activiteit ( $\mu\text{Ci}$ )
20	0,063
40	0,112
60	0,174

- (c) (2 points) Bereken de totale activiteit van het glucaansynthase in de plasmamembraansuspensie en de activiteit per gram erwtenstengels als je weet dat de extractie-efficiëntie 23% bedroeg.

Tabel 4: Substraatskinetiek van isocitraatdehydrogenase

volume isocitraat ( $\mu\text{L}$ )	$A_{380\text{ nm}}$
0	0,000
2	0,106
5	0,218
10	0,334
15	0,420
20	0,491
50	0,655
100	0,727

2. (6 points) In een metabolische studie van rijpende rozenbottels wordt isocitraatdehydrogenase (IDH) gebruikt als merker voor het rijpingsstadium. In een eerste experiment, bij wijze van karakterisatie, worden de parameters van de Michaelis-Menten-kinetiek bepaald. Voor de bepaling van IDH mengen we verschillende volumes van een 0,1 M isocitraatoplossing (zie tabel 4) met 0,5 mL 25 mM  $\text{NADP}^+$  en brengen we het geheel op een volume van 1 mL met TRIS-HCl buffer (pH 7,9). Om de reactie te starten, werd daar nog 0,3 mL rozenbottelextract (eiwitgehalte = 2 mg/mL) aan toegevoegd. Na 30 minuten bij 21°C werd de reactie gestopt door toevoegen van 0,25 mL 0,2 N NaOH. 0,4 mL van dit mengsel werd aangelengd met 2,6 mL water en de absorptie van het gevormde NADPH ( $\varepsilon^m = 1400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) werd gemeten bij 380 nm. De resultaten worden hieronder weergegeven:

Bereken  $K_m$  en  $V_{max}$  voor dit enzyme in de juiste eenheden.