

# 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 mag 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.

$\mu\text{L}$ standaardoplossing	$A_{595}$
0	0.066
10	0.086
20	0.098
40	0.142
60	0.190
80	0.218

Tabel 2: Eiwitbepaling voor het extract van luchtworteltjes.

$\mu\text{L}$ extract	$A_{595}$
20	0,039
40	0,083
60	0,126

- (9 points) Uit 9.5 g luchtworteltjes van *Vanilla planifolia* (vanille-orchidee) werd 2.5 mL eiwitextract bereid.

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

- Van een standaardoplossing met 1 mg/mL eiwit werden vooraf bepaalde volumes (zie tabel 1) telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
- Vervolgens werd 4 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
- Vóór het meten van de absorptie werd nog 400  $\mu\text{L}$  kleurreagens toegevoegd.
- Van elk staal wordt de absorbantie bij 595 nm gemeten. De meetresultaten vind je in tabel 1.
- Een 2x verdund extract werd op dezelfde manier behandeld als de standaardoplossing. De gebruikte hoeveelheden en gemeten absorpties worden weergegeven in tabel 2.

Bereken de eiwitconcentratie per mL extract.

- (3 points) Bij de bepaling van het enzyme nitraatreductase (NR) wordt 0,75 mL van een 0,125 M nitraat gemengd met een bepaald volume extract (zie tabel 3), waarna het geheel op volume (3.5 mL) gebracht wordt met 80 mM Na-fosfaatbuffer (pH 7,0). Na 12 minuten bij 30°C wordt de reactie gestopt door toevoegen van 0.8 mL 1% (w/v) sulphanilamide in 2,4 N HCl en 0.8 mL of 0.02% (w/v) N-(1-naphthyl)ethylenediamine dichloride. Het gevormde roze complex wordt gemeten bij 540 nm ( $\epsilon = 55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Bereken m.b.v. de enzymconcentratierreeks in tabel 3 de specifieke activiteit van het NR in het extract, gebruikmakend van het in deel a bekomen eiwitgehalte (heb je dit niet, gebruik dan 1 mg/mL).



Tabel 3: Absorptie bij 540 nm i.f.v.  
toegevoegd volume extract.

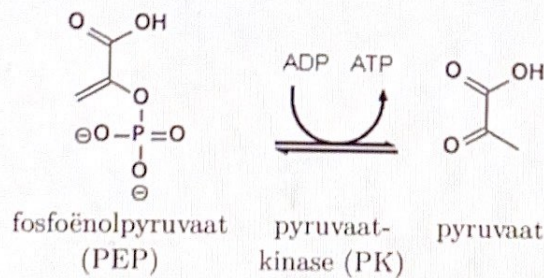
hoeveelheid extract ( $\mu\text{L}$ )	$A_{540}$
0	0
40	0,15
80	0,22
160	0,49
320	1.00

- (c) (2 points) Bereken de totale activiteit van het NR in het extract, en de activiteit per g luchtwortels als de extractie-efficiëntie 22% bedraagt.

Tabel 4: Substraatskinetiek

volume fosfoëno- pyruvaat (μL)	$A_{280}$
0	0,000
2	0,093
5	0,208
10	0,340
15	0,416
20	0,475
50	0,640
100	0,738

2. (6 points) Een metabolische studie van de seksuele activiteit van stekelbaarsjes postuleert dat het pyruvaatkinase (PK) de drijvende kracht is achter de maturatie van de testes.



Om een werkend wiskundig enzymmodel op te stellen, worden de parameters van de Michaelis-Menten-kinetiek bepaald voor het PK. Hiervoor mengen we verschillende volumes van een 0,1 mM fosfoëno-  
pyruvaatoplossing (zie tabel 4) met 0,5 mL van een ADP-oplossing in overmaat 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 0,25 mL testes-extract (5 mg/ml eiwit) aan toegevoegd.

Na 30 minuten bij 37°C werd de reactie stopgezet door toevoeging van 0,5 mL 5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 1 mL van dit mengsel werd aangelengd met 4 mL water en de absorptie van het gevormde ATP ( $\epsilon = 6000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) werd gemeten bij 280 nm. De meetresultaten zijn weergegeven in tabel 4.

Bereken  $K_m$  en  $V_{max}$  voor het pyruvaatkinase in het extract in de juiste eenheden.