

Tabel 1: Standaardreeks eiwitbepaling.

μL 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.

μL extract	A_{595}
20	0.039
40	0.083
60	0.126

1. (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 μL kleurreagens toegevoegd.
- Van elk staal wordt de absorptie 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.

- (b) (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 ($\varepsilon = 55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

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 (μL)	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.

2. Carbonaatbuffers worden in veel fysiologische oplossingen, zoals bloed, gebruikt om de pH van de vloeistof te bufferen ($pK_{a,1} = 10.33$, $pK_{a,2} = 6.3$). Carbonanhydrase katalyseert de volgende reactie:



Deze reactie verloopt op zich al vrij snel zonder katalysator. De reactie heeft een halfwaardetijd van ongeveer 3 seconden onder fysiologische condities. De dissociatie van H_2CO_3 heeft zelfs een reactiesnelheid van 910^{-8} sec.

CO_2 gedraagt zich dus als een zuur. De snelheid van het verzurende effect van carbonanhydrase kan dus gebruikt worden als een proxy voor de activiteit van carbonanhydrase. Er wordt een ijklijn opgesteld vanuit 8 verschillende volumes van konijnen rode bloed cellen (zie tabel) waarbij telkens de volgende procedure wordt gebruikt. Een constante gasstroom van 500 mL/min CO_2 wordt doorheen het meetapparaat geblazen. Dit zal de concentratie aan CO_2 in het staal constant houden. Alternatief kan de CO_2 doorheen het staal geborreld worden. Hierbij zorgen de belletjes tegelijkertijd voor een constante CO_2 concentratie en een goede menging in het staal. Er wordt 200 μL van een oplossing met 12.5 mg/L fenolrood en 2.6 mM NaHCO_3 in het apparaat gebracht (fenolrood heeft een rode kleur bij een hoge pH en een gele kleur bij een lage pH). Hierbij wordt het volume staal toegevoegd en dit mengsel wordt aangelengd tot 350 μL met gedeïoniseerd water. Het mengsel wordt 2 min zachtjes geroerd. Daarna wordt het mengsel harder geroerd en wordt 50 μL van een bufferoplossing met 300 mM Na_2CO_3 en 206 mM NaHCO_3 toegevoerd. Gelijktijdig met het toevoegen van de buffer wordt een timer gestart. Wanneer het staal geel verkleurt wordt de tijd genoteerd.

In de tabel worden de tijden na verkleuring gegeven voor verschillende volumefracties (VF).

volumefractie	tijd (sec)
0×10^{-5}	58.5
1.25×10^{-5}	49.6
2.50×10^{-5}	39.3
3.75×10^{-5}	34.7
5.00×10^{-5}	30.2
6.25×10^{-5}	27.8
7.50×10^{-5}	25.4
8.75×10^{-5}	23.8
10.00×10^{-5}	22.1

Een eenheid (unit) van activiteit van carbonanhydrase (A) wordt gedefinieerd als de concentratie aan carbonanhydrase waarbij de reactiesnelheid dubbel zo snel is als zonder carbonanhydrase.

$$A = t_0/t - 1$$

waarbij t_0 de verkleuringstijd is zonder anhydrase en t de verkleuringstijd bij de activiteit. Met andere woorden, de activiteit van het staal is 1 op de volumefractie waarbij het verkleuringstijd halveert.
De grafiek kan gelineariseerd worden als:

$$1/t = VF/t_0 + 1/t_0$$

Wat is de verkleuringstijd als de VF van het konijnenbloed 5.53×10^{-5} is? Bereken de specifieke activiteit van carbonanhydrase in het konijnenbloed als de totale massa proteïnen in het bloed 6.8 g/dL is. Wat is de verkleuringstijd als een hoeveelheid carbonanhydrase die equivalent is aan 10000 eenheden wordt toegevoegd aan het konijnenbloed.