

Oefeningenexamen

Geïntegreerd Practicum Fysiologie-Biochemie:

22 april 2022

Los de opgaven op met behulp van een rekenblad (Excel, Google spreadsheet, LibreOffice Calc) of R. Je kan je oplossing doormailen aan katrien.michiels@uantwerpen.be tot 22 april, 13u00.

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 foto of scan van handgeschreven beschrijving en/of schema van je aanpak (tekst, formules, voorbeeldberekeningen, schema’s) en een kort besluit (1 zin kan volstaan). Opgelet: 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.

μL suspensie	A_{660}
10	0,098
20	0,188
30	0,269

- Uit 252 mg geëtioteerde stengeltjes van *Cicer arietinum* (de keker-erwt) werd 3 mL gezuiverde plasmamembranen bereid.
 - (3 points) Op deze suspensie werd een eiwitbepaling uitgevoerd:
 - Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden vooraf bepaalde volumes telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
 - Vervolgens werd 2,5 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
 - Vóór het meten van de absorbantie werd nog 250 μL kleurreagens toegevoegd.
 - Van elk staal wordt de absorbantie bij 595 nm gemeten. De meetresultaten vind je in tabel 1.
 - Een 3x 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 $y = ax$: $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$)

μL standaardoplossing	A_{595}
0	0,081
10	0,176
20	0,199
40	0,329
60	0,455
80	0,525

Bereken de eiwitconcentratie per mL plasmamembraansuspensie.

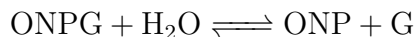
- (3 points) Bij de bepaling van het enzym glucaansynthase (GS) wordt radioactief gelabeld glucose aangeboden aan 0,20 mL van de suspensie. Na een vooraf bepaalde tijd (zie tabel 3) wordt het reactiemengsel gekookt om de reactie te stoppen. De gevormde glucanen slaan neer samen met het gedenateerde enzym. Het supernatans met de niet in glucanen gebonden ^{14}C -gelabelde glucosemoleculen wordt afgegoten en verder verwijderd. Vervolgens wordt de radio-activiteit (in μCurie) 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. ($1\text{ }\mu\text{Ci} = 1\text{ }\mu\text{mol glucose}$)

tijd (min)	radio-activiteit (μCi)
15	0,055
30	0,118
45	0,162

- (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 28% bedroeg.

2. β -galactosidase katalyseert de hydrolyse van o-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) in ortho-nitrophenol (ONP) en galactose:



De β -galactosidases zijn een familie van belangrijke hydrolase enzymen die in staat zijn om een β -galactosidebrug te verbreken. Tot deze familie behoort onder meer het bekende enzym lactase. Lactase splitst het disaccharide lactose (aanwezig in melkproducten) in galactose en glucose. Een afname in de activiteit van lactase na het tweede levensjaar veroorzaakt lactose-intolerantie bij de meeste mensen. Een mutatie ongeveer 6 millenia geleden heeft ervoor gezorgd dat Noord-Afrikanen en Europeanen (en hun afstammelingen in Amerika en Australië) langer lactase aan blijven maken. Daaraan hebben we te danken dat we ons hele leven melkproducten kunnen blijven eten en drinken.

Thiogalactosides zijn verbindingen die een zwavelatoom in plaats van een zuurstofatoom hebben in de β -galactoside brug en die daardoor ongevoelig zijn voor afbraak door β -galactosidase enzymen. Ze worden echter wel gebonden door het enzym, en kunnen dus fungeren als remmer. De remmer die we in de proef gebruiken, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) is een thiogalactoside en speelt onder meer een belangrijke rol in de regulatie van het lactose-metabolisme van veel bacteriën.

We meten de snelheid van de enzymreactie aan de hand van de concentratie-toename van één van de producten, orthonitrofenol (ONP). De ONPG-oplossing is kleurloos, maar ONP is geel, dus we kunnen de concentratieverandering van ONP bepalen met een spectrofotometer, door de absorptie van blauw/violet licht (400 nm) te meten over de tijd. We doen dit voor een aantal verschillende beginconcentraties substraat (ONPG), en tekenen een Michaelis-Menten curve door de gemeten vormingssnelheden van ONP uit te zetten tegen de beginconcentraties ONPG.

Twee reeksen (A en B) van 6 cuvetten worden gevuld zoals beschreven in tabel 4. Bij wijze van blanco wordt in een extra cuvet 3,0 ml KNaP-buffer gepipetteerd. Met deze blanco wordt de spectrofotometer ingesteld op $A = 0$, bij een golflengte van 400 nm. Per cuvet wordt de reactie gestart door 10 μ L enzym toe te voegen. De absorpties worden na 1 minuut bepaald.

- (a) (4 points) Bepaal de waarden van K_m en V_{max} .
- (b) (2 points) Kun je aan de hand van deze resultaten zien welk type inhibitor IPTG is?

Tabel 4: Substraatskinetiek β -galactosidase met (A) en zonder (B) inhibitor

cuvet	KNaP (mL)	ONPG (mL)	IPTG (mL)	A_{400}
Blanco	3	-	-	0
A1	2,80	0,20	-	0,276
A2	2,75	0,25	-	0,332
A3	2,60	0,40	-	0,381
A4	2,50	0,50	-	0,455
A5	2,00	1,00	-	0,650
A6	1,00	2,00	-	0,760
B1	1,80	0,20	1,00	0,127
B2	1,75	0,25	1,00	0,177
B3	1,60	0,40	1,00	0,205
B4	1,50	0,50	1,00	0,269
B5	1,00	1,00	1,00	0,291
B6	-	2,00	1,00	0,350