

Naam:

Bachelor Bio-ingenieurswetenschappen
GP Fysiologie - Biochemie: vraagstukken
28 juni 2017

Question	Points	Score
1	2	
2	2	
3	2	
4	6	
5	8	
Total:	20	

- /2 1. Hoeveel mL van een 85% (massaprocent) H_3PO_4 ($\rho = 1,685 \text{ g/mL}$; $MW = 98 \text{ g/mol}$) heb je nodig om 100 mL van een 6 M oplossing te maken?

- /2 2. Wat betekent dit pictogram? Geef twee voorbeelden van stoffen die dit logo kunnen dragen.



- /2 3. Handschoenen of niet?

1. minikolom vullen met hexaan-aceton-mengsel met zetmeel
2. extract op de kolom brengen
3. absorptie van een effluent-band bepalen met een spectrometer
4. glaswerk na deze proef uitspoelen

4. Het glycolaat-oxidase is een peroxisomaal enzyme. Het katalyseert de oxidatie van glycolaat tot glyoxylaat en vormt hierbij een molecule H_2O_2 . Het gezuiverde enzyme heeft een K_m van $15 \mu\text{M}$ (voor glycolaat) en een V_{max} van $23 \mu\text{mol}/(\text{min mg})$.

De procedure voor de bepaling van de enzymatische activiteit ziet er als volgt uit:

1. Een bepaalde hoeveelheid van een $100 \mu\text{M}$ oplossing van glycolaat wordt aangelengd tot $250 \mu\text{L}$ met een 50 mM fosfaatbuffer (pH 5,5) en hieraan wordt $50 \mu\text{L}$ van een (8 x verdund) extract van spinazieblaadjes toegevoegd.
2. Dit blijft 10 minuten staan in een warmwaterbad bij 30°C .
3. Om de reactie te stoppen, wordt $95 \mu\text{L}$ azijnzuur (2 M) toegevoegd.
4. Hierbij wordt nog $5 \mu\text{L}$ pyranine (concentratie in overmaat) gepipetteerd. Het pyranine gaat reageren met het aanwezige H_2O_2 (in een 1:1 stoechiometrische verhouding) en het reactieproduct kan dan spectrofotometrisch worden bepaald ($\varepsilon_{320} = 10,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
5. De proef wordt uitgevoerd in een microtiterplaat - de lengte van de lichtstraal door de gekleurde oplossing is bijgevolg 4 mm .

Ga er van uit dat in het onverdunde extract $1,15 \text{ mg}$ eiwit per mL zit. 5% van de totale hoeveelheid eiwit in het extract is het gezochte glycolaat-oxidase. Hou geen rekening met aspecifieke afbraak van het glycolaat want daarbij wordt toch geen H_2O_2 gevormd.

- /2 (a) Reken uit hoeveel glycolaat moet worden toegevoegd vanuit de $100 \mu\text{M}$ stock om een eindconcentratie van $2 \mu\text{M}$ in het reactiebuisje (dus vóór het stoppen van de reactie!) te bekomen.
- /4 (b) Voorspel de correcte OD -waarden bij de bepaling van het glycolaat-oxidase bij een substraatsconcentratie van het $20 \mu\text{M}$ glycolaat.

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

μL standaardoplossing	A_{660}
0	0,000
10	0,021
20	0,045
40	0,084
60	0,131
80	0,159

Tabel 2: Eiwitbepaling voor het extract van bonencotylen.

μL extract	A_{660}
20	0,040
40	0,085
60	0,124

5. Uit 3 g cotylen van geëtioleerde stengeltjes van *Phaseolus vulgaris* (tuinboon) werd 2 mL eiwitextract bereid.

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

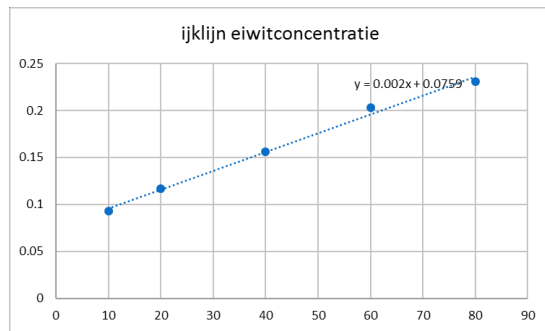
1. Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden vooraf bepaalde volumes (zie tabel 1) telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
2. Vervolgens werd 3 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
3. Vóór het meten van de absorptie werd nog 300 μL kleurreagens toegevoegd.
4. Van elk staal wordt de absorbantie bij 595 nm gemeten. Met de meetresultaten (zie tabel 1) maakt een laborant (die duidelijk geen flauw idee heeft waar hij mee bezig is) de grafieken in fig.1.
5. Een 4x 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 membraansuspensie.

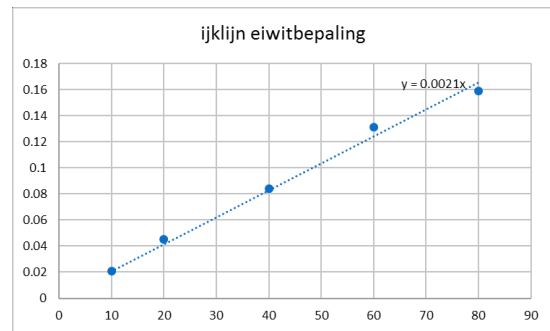
/3 (b) Bij de bepaling van het enzyme aspartaattranscarbamylase (ATCase) wordt 0,2 mL van een 0,125 M aspartaat gemengd met een bepaald volume extract (zie tabel 3), waarna het geheel op volume (0,9 mL) gebracht wordt met 80 mM Na-fosfaatbuffer (pH 7,0). De reactie wordt op gang gebracht door toevoeging van 100 μL 36 mM carbamylfosfaat en na 30 minuten bij 30°C gestopt door toevoegen van 1 mL 2% perchloorzuur. Vorming van carbamylaspartaat wordt gemeten bij 466 nm ($\epsilon = 13,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

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

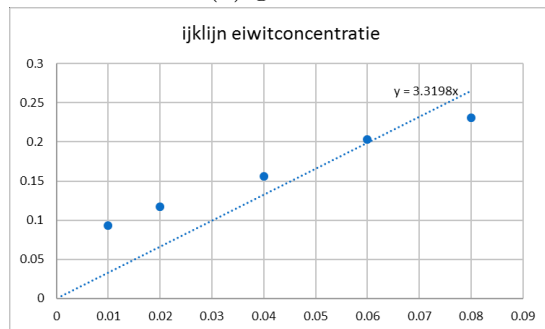
/2 (c) Bereken de totale activiteit van het ATCase in het extract, en de activiteit per g bonencotylen als de extractie-efficiëntie 13% bedraagt.



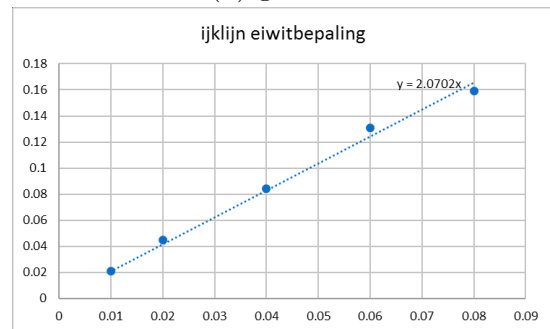
(a) grafiek1



(b) grafiek2



(c) grafiek3



(d) grafiek4

Figuur 1: Mogelijke grafieken voor eiwitbepaling. Kies 1 grafiek om de oefening verder af te werken, benoem de assen en motiveer je keuze.

Tabel 3: Absorptie bij 466 nm i.f.v. toegevoegd volume extract.

hoeveelheid extract (μL)	A_{466}
0	0
50	0,13
100	0,25
200	0,46
400	0,93