

## LÖSUNGSHINWEISE - Enzymatische Analyse

C3BL

Die Lösungshinweise sind zum Teil ausführlicher als vorgesehen. Evtl. müssen Sie die wichtigsten Botschaften jeweils selbst zusammenfassen, um sie auf dem zur Verfügung stehenden Raum des Arbeitsblattes unterzubringen.

1.1

Das ist nicht die Substratsättigungskurve, obwohl die Kurvenform ähnlich ist! Hier ist auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Produktkonzentration aufgetragen! eine S-Sättigungskurve finden Sie auf der selben Seite, weiter unten (Bei Aufgabe 1.3).

Zu Beginn der Reaktion sind noch viele S-Teilchen vorhanden, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit hier sehr hoch ist: Die Kurve verläuft hier sehr steil. Durch den Stoffumsatz nimmt die S-Konzentration immer weiter ab. Die Enzymmoleküle sind mit S zunehmend unterversorgt und können deshalb nicht mit voller Geschwindigkeit arbeiten. Die Produktneubildung pro Zeit (=Reaktionsgeschwindigkeit) nimmt immer weiter ab, entsprechend flacht auch die Kurve ab.

1.2

Die Aufgabe kann man mit per Dreisatz einfach einfach lösen.

$$0,5 \text{ g/L} \hat{=} 0,705$$

$$x \hat{=} 0,474 \Rightarrow x \approx 0,336 \text{ g/L}$$

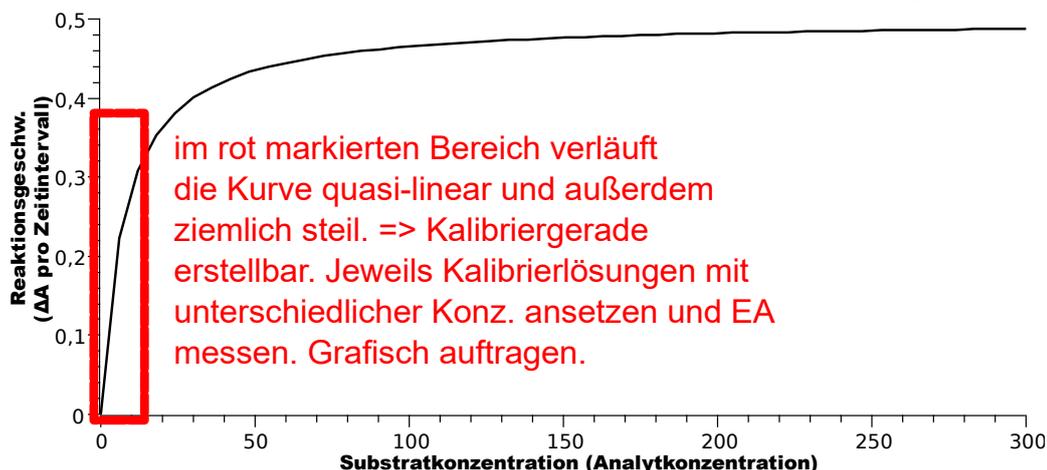
Verdünnungseffekte durch Reagenzienzugabe müssen hier nicht berücksichtigt werden, weil sie die Vergleichslösung und die Probelösung in derselben Weise betreffen!

1.3

Bei kinetischen Bestimmungen wird die Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität) bestimmt. Denn diese hängt von der Analytkonzentration ab. Der mathematische Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen liefert die S-Sättigungskurve (siehe Abb. der Aufgabe).

Wir wollen eine möglichst hohe Abhängigkeit zwischen der EA und der S-Konzentration. Mit anderen Worten: Das Messergebnis, also die EA, soll stark von der Analytkonzentration abhängen. Deshalb nimmt man den linken Teil der Kurve, dort wo die Kurve sehr steil ist. Sie ist dort sogar quasi-linear, d.h. im dortigen Bereich kann man näherungsweise von einem nahezu linearen Verlauf ausgehen.

Wie misst man die EA in der Praxis?  $\Rightarrow$  wenn das S oder das Produkt UV/VIS-aktiv ist, beobachtet man, wie sich die Absorbanz innerhalb einer bestimmten Zeit verändert. EA = Absorbanz-Änderung pro Zeiteinheit.



1.4

- Die Aufgabe kann man mit per Dreisatz einfach einfach lösen, denn man geht von aus, dass die EA proportional zur Analytkonzentration ist, weil man sich im quasi-linearen Bereich der S-Sättigungskurve aufhält.
- EA = Absorbanz-Änderung pro Zeiteinheit. hier also: EA =  $\Delta A$  in den ersten 25 Sekunden.

$$15 \mu\text{M} \hat{=} 0,053$$

$$x \hat{=} 0,039 \Rightarrow x \approx 11,038 \mu\text{M}$$

- Verdünnungseffekte durch Reagenzienzugabe müssen hier nicht berücksichtigt werden, weil sie die Vergleichslösung und die Probelösung in derselben Weise betreffen!

- Für eine gute Genauigkeit ist es hier besonders wichtig, dass der Kalibrierpunkt nahe dem Probepunkt liegt, denn in Wirklichkeit gibt keinen ganz exakten linearen Zusammenhang, sondern nur einen *quasi-linearen*: Der Kurvenverlauf ist also nur sehr schwach gekrümmt, dass man ihn durch eine Gerade annähern kann. Das gilt allerdings nur über möglichst kurze Distanzen zwischen den beiden Punkten. Man kann also die Einpunktkalibrierung optimieren, durch einen Kalibrierpunkt, der näher am Probepunkt liegt.

1.5

$$\epsilon_{260}(NAD^+) \approx 17000 \frac{L}{mol \cdot cm} \quad \epsilon_{340}(NAD^+) \approx 0 \frac{L}{mol \cdot cm}$$

$$\epsilon_{260}(NADH) \approx 14000 \frac{L}{mol \cdot cm} \quad \epsilon_{340}(NADH) \approx 6000 \frac{L}{mol \cdot cm}$$

1.6

- Der Unterschied im Absorptionskoeffizient fällt bei 260 nm relativ gering aus ( $\Rightarrow$  geringe Sensitivität).
- Bei 260 nm absorbieren viele Proteine und Nukleinsäuren (z.B. das Enzympräparat an sich) stark, bei 340 nm hingegen nicht.
- Die Absorptionsänderung bei 340 nm ist auch ein direktes Maß für den Gehalt eines Stoffs, da der andere bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert.
- Bei 340 nm können noch Kunststoffküvetten genutzt werden, bei 260 nm nicht mehr. Hier sind Quarzküvetten erforderlich.

1.7a)

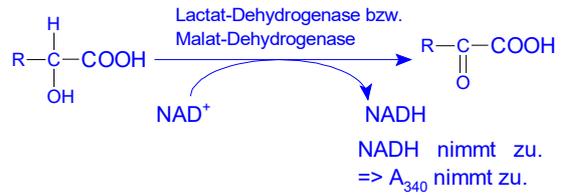
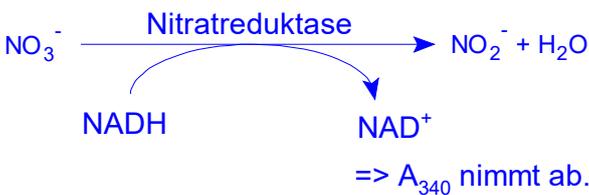
- Zuerst mit Lambert-Beerschen Gesetz  $c(NADH)$  berechnen:  $A = \epsilon \cdot c \cdot d \Rightarrow c(NADH) \approx 0,0965 \frac{mmol}{L}$
- Aus 1:1 Koeffizientenverhältnis folgt, dass für jedes NADH ein EtOH vorhanden war.  $\Rightarrow c(EtOH) \approx 0,0965 \frac{mmol}{L}$
- Hier muss noch der Verdünnungseffekt heraus gerechnet werden: *In der durch Reagenzien verdünnten Lösung war  $c(EtOH) \approx 0,0965 \frac{mmol}{L}$ . Wie hoch ist  $c(EtOH)$  in der ursprünglichen Probe? Verdünnungsgleichung:*

$$\overbrace{c_1 \cdot V_1}^{Konzentrat} = \overbrace{c_2 \cdot V_2}^{Verdünnung} \Rightarrow c_1 \cdot 150 \mu L = 0,0965 \frac{mmol}{L} \cdot 1750 \mu L \Rightarrow c_1 = 1,126 \frac{mmol}{L}$$

1.7b)

- Wenn möglich eine Kalibrierung durchführen, nicht darauf vertrauen, dass die Literaturwerte ( $6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) unter den tatsächlichen realen Bedingungen unbedingt gültig sind.

1.8



1.9

- Ansatz: Glucose-Bestimmung: Zur Probe wird ATP, Hexokinase,  $NAD^+$  und Glucose-6-P-Dehydrogenase gegeben. Bestimmung der Zunahme der Absorbanz bei 340 nm (optischer Test):  $A_{Gluc}$
- Ansatz: Fructose-Bestimmung. Wie Ansatz 1, nur wird noch Glucose-6-P-Isomerase zugegeben. Absorbanz messen:  $A_{Gluc+Fruc}$  Anschließender Abzug der bei Ansatz 1 gemessenen Absorbanz.  $A_{Fruc} = A_{Gluc+Fruc} - A_{Gluc}$
- Ansatz: Saccharose-Bestimmung: Wie Ansatz 1, nur wird noch Invertase zugegeben. Absorbanz messen:  $A_{Gluc+Fruc+Sacch}$  Anschließender Abzug des  $A_{sach} = A_{Gluc+Fruc+Sacch} - A_{Gluc+Fruc}$  Glucose-Ergebnis (aus Ansatz 2)

Eintrag im Abschnitt 1.3.2

A) Umsetzung eines Glucose-Überschuss und ATP mit Hexokinase zu Glucose-6-P.

- B) Anschließende Quantifizierung von Glucose-6-P mit  $\text{NAD}^+$  durch einen optischen Test nach Warburg (siehe oben) mithilfe der Glucose-6-P-Dehydrogenase.