

Uitwerkingen

Hoofdstuk 5

Antwoord 1a

De citraatbuffer, in deze buffer is enzym X het meest actief. Voor een enzymatische test is het van belang dat de condities (o.a. pH, temperatuur) van de reactie zo optimaal mogelijk zijn.

Antwoord 1b

Een overmaat substraat, dus $> 2,5$ mmol/L ($> 10 K_M$). Bij een overmaat substraat geldt dat het enzym maximaal actief is (V_{MAX}), omdat V_{MAX} overeenkomt met de enzymactiviteit (maat voor de enzymconcentratie) in het monster.

Antwoord 1c

Aan de hand van de resultaten bereken je ΔE en Δt . $\Delta E = 0,30$ en $\Delta t = 2$ min. De $\Delta E/\Delta t$ -ratio is dan $0,15$ (je kunt ook een andere ΔE nemen, als de daarbij behorende Δt maar juist is, bijvoorbeeld $\Delta E = 0,90$ en $\Delta t = 6$ min (verschil tussen tijdstip 1 minuten en 7 minuten). De ratio $\Delta E/\Delta t$ blijft $0,15$). Het patiëntmonster is 20 maal verdund gemeten (0,1 ml serum in totaal volume van 2,0 ml). Vervolgens kun je de concentratie berekenen:

$$\text{enzymactiviteit (U/L)} = (\Delta E/\Delta t) \times (\text{verdunding}/\epsilon) \times 10^6$$

$$\text{ingevuld: } (0,30/2) \times 20 \times 10^6/30.000 = 0,15 \times 20/0,03 = 3/0,03 = 100 \text{ U/L}$$

De enzymactiviteit in het monster is dus 100 U/L.

Antwoord 1d

Substraatuitputting: er is een tekort aan substraat waardoor de extinctielijn niet meer recht loopt, maar afbuigt. Dit is onwenselijk omdat je dan geen correcte berekening van de enzymactiviteit kunt uitvoeren. De oorzaak van substraatuitputting is een zeer hoge concentratie enzym X in het monster. De analist dient het serummonster te verdunnen en nogmaals te meten.

Antwoord 2a

Een substraatbepaling. Er wordt gebruik gemaakt van een indicatorreactie.

Antwoord 2b

Tijdens de reactie zal de extinctie afnemen (verbruik van kleurstof NADH). Een lage extinctie zal overeenkomen met een hoge ureumconcentratie in het monster en vice versa. Dus monster A (weinig ureum) levert de hoogste extinctie op.

Antwoord 2c

De enzymen urease en glutamaat dehydrogenase, en de substraten oxoglutaaraat en NADH. De reactie vindt plaats in een pH-gebufferde oplossing bij 37 °C.

Antwoord 2d

1 mol ureum levert 2 mol ammonium (NH_4^+). Per mol ammonium wordt 1 mol NADH verbruikt. Dus totaal wordt er 2 mol NADH verbruikt per 1 mol ureum.

Antwoord 2e

Het serummonster is 300 × verdund (0,01 ml in totale volume van 3,0 ml (2,99 + 0,01 ml)).

$$\Delta E \cdot \text{verdunning} = e \cdot c \cdot l$$

$$c \text{ (in mol/L)} = (\Delta E \cdot \text{verdunning}) / e \cdot l$$

$$c = (E_{\text{blanco}} - E_{\text{monster}}) \times 300 / 6300 \times 1$$

$$c = (1,00 - 0,35) \times 300 / 6300 = 0,031 \text{ mol/L} = 31 \text{ mmol/L}$$

Er wordt dus 31 mmol/L NADH tijdens de reactie verbruikt. Dit komt overeen met 15,5 mmol/L ureum in het monster (1 mol ureum levert immers 2 mol NADH omzetting, dus 15,5 mmol ureum levert 31 mmol NADH).

De concentratie in het patiëntmonster is dus 15,5 mmol/L.

Antwoord 2f

$$C_{\text{monster}} = (\Delta E_{\text{monster}} / \Delta E_{\text{standaard}}) C_{\text{standaard}}$$

$$C_{\text{monster}} = (1,00 - 0,35) / (1,00 - 0,55) \times 10,7 \text{ mmol/L}$$

$$= 0,65 / 0,45 \times 10,7 = 15,5 \text{ mmol/L}$$