

Cursushandleiding

Biochemie

Oktober/November 2008

Inhoudsopgave

1. Voorwoord en praktische zaken
3. DEEL I – Basiskennis en -vaardigheden
23. DEEL II – Ademhaling en fotosynthese
43. DEEL III – Bloed glucose
49. Veiligheidsvoorschriften

Voorwoord en praktische zaken

Doelstelling:

Het belangrijkste doel van het practicum Biochemie is het illustreren van een aantal belangrijke metabole processen in de levende cel met behulp van experimenten, waardoor het inzicht in deze processen wordt bevorderd. Tijdens de hoor- en werkcolleges zullen deze metabole processen uitgebreid worden behandeld.

De practica hebben verder tot doel:

- Illustratie van gedeeltes van de collegestof
- Kennismaking met een aantal biochemische analyse technieken
- Het leren plannen en uitvoeren van experimenten.
- Het leren werken met een labjournaal.

DEEL I – Basiskennis en -vaardigheden

Bij dit onderdeel wordt de basiskennis over rekenen, concentraties meten, en het maken van oplossingen en verdunningen herhaald en geoefend. Daarnaast wordt een toelichting gegeven op enkele belangrijke concepten, zoals pH en (biologische) buffers.

DEEL II – Ademhaling en fotosynthese

Mitochondriën komen voor in vrijwel alle eukaryote cellen en zijn de energiecentrales van de cel. De reacties die daarbij plaatsvinden worden bestudeerd in geïsoleerde aardappelmitochondriën door meting van het zuurstofgehalte van de oplossing waarin de mitochondriën zich bevinden.

Chloroplasten komen voor in groene plantendelen en algen. Net als mitochondriën produceren ze ATP en fungeren ze dus als energiecentrales voor plantecellen. Maar daarnaast zijn het ook de energiecentrales van het globale ecosysteem. Ze zetten lichtenergie om in chemische energie. De elektrontransport-keten die hier voor zorgt en de ATP synthese worden bestudeerd met behulp van spectroscopie.

Deel I en II van het practicum worden gegeven op de O-0 labzalen in het Wis- en Natuurkundegebouw. Van een van de proeven van deel II wordt een verslag geschreven. Samen met de algemene inzet en het netjes bijhouden van een labjournaal telt dit mee voor de beoordeling van het practicum.

DEEL III – Bloed glucose-proef

Coördinator

Dr. Irma van Die
Glycoimmunologie Groep
Afdeling Moleculaire Celbiologie & Immunologie
VU Medisch Centrum
Tel: 020-4448157
Email: falwonderwijs.mcbi@vumc.nl

Plaats en tijdsindeling: In verband met het aantal studenten wordt deel III van het practicum drie maal gegeven. De studenten werken samen in groepen van 2, in subgroepen van ca. 12 -15 studenten onder de begeleiding van een assistent. Alle experimenten worden uitgevoerd op de practicumzaal in het Geneeskunde gebouw (A205). De studenten dienen het practicum goed voor te bereiden, en de bijbehorende vragen te maken. Elke dag wordt voorbespreking gehouden waarbij de gemaakte vragen worden doorgenomen, en ook een nabespreking waar de resultaten worden besproken in relatie met de resultaten van andere groepjes (niet iedereen doet hetzelfde!). Studenten dienen een labjournaal bij te houden dat aan het einde van de dag ingeleverd wordt bij de assistent(e).

DEEL I – Basiskennis en -vaardigheden

Eenheden en grootheden

Zoals bekend definieert het SI-stelsel (*Système International*) uit 1960 de standaard-eenheden waarin een *grootheid* zoals volume, massa, tijd, etc. wordt uitgedrukt. In de praktijk wordt in veel vakgebieden echter vaak gewerkt met niet-standaard eenheden. De volgende tabel geeft een overzicht van enkele veel gebruikte eenheden in de biochemie:

Grootheid (en afkorting)	Gebruikelijke eenheid	Notatie	Equivalent in SI eenheden
volume (V)	liter, milliliter, etc.	l	10^{-3} m^3
massa (m)	gram, milligram, etc.	g	10^{-3} kg
hoeveelheid moleculen (n)	mol, millimol, etc.	mol	mol
concentratie / molariteit (c)	molair (= mol per liter)	M, of $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^3 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$
dichtheid (ρ)	gram per liter of gram per milliliter	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ of $10^3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
molaire massa (M)	gram per mol	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$
molecuulmassa (M)	dalton	Da	$1.6605\cdot 10^{-27} \text{ kg}$
temperatuur (T)	graden celsius	$^{\circ}\text{C}$	K (+ 273)
energie (E)	joule	J	J
energieflux / <i>luminous power</i> (Φ of P)	watt	W	$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$
lichtintensiteit / <i>radiant flux</i> (I)	watt per steradiaal	$\text{W}\cdot\text{sr}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{sr}^{-1}$
tijd (t)	seconden of minuten	s of min	s of 60 s
extinctie van licht (A) (<i>attenuance</i> of <i>absorbance</i>)	(dimensieloos)	AU	
afstand (x) en lengte (ℓ)	meter, centimeter, etc.	m	m
golflengte (λ)	nanometer (bij UV/VIS)	nm	10^{-9} m
frequentie (f)	herz	Hz	s^{-1}
snelheid (v)	meter per seconde	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
draaisnelheid (hoeksnelheid, ω)	radiaal per seconde	$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$
draaisnelheid (RPM)	omwentelingen per minuut	RPM	$1/60 \cdot 2\pi \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$
versnelling (a) en zwaartekrachtsversnelling (g)	meter per seconde per seconde	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
centrifugaalversnelling (RCF)	zwaartekrachtsversnelling (g -waarde)	$\times g$	$0.980 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$
kracht (F)	newton	N	$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
gewicht (w)	newton (!)	N	$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
genormaliseerde sedimentatiesnelheid (s) (sedimentatiecoëfficiënt)	Svedberg	S	10^{-13} s

Heel veel fouten worden gemaakt doordat mensen vergeten om eenheden te noteren, of de verkeerde eenheden noteren. Schrijf daarom *altijd* de juiste eenheden bij *alle* gegevens! Ook bij berekeningen is het handig om eenheden te noteren in de tussenstappen, dit vergemakkelijkt het opsporen of zelfs voorkomen van fouten in een berekening. Je kunt namelijk met eenheden rekenen, net als met getallen. Dit noemt men een *dimensieanalyse*.

Bijvoorbeeld, als je uit wilt rekenen hoeveel mol stof er in 2 ml van een 1.5 mM oplossing zit, dan kun je aan de eenheden zien of je het goed doet: $2.00 \text{ ml} \times 1.50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} = 0.002 \text{ l} \times 0.0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} = 3.00 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$.

Als je had gedeeld in plaats van vermenigvuldigd dan had je gekregen: $3.00 \text{ ml} \div 1.50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} = 0.003 \text{ l} \div 0.0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} = 2.00 \text{ l}^2\cdot\text{mol}^{-1}$. De eenheden kloppen duidelijk niet in dit geval ($\frac{1}{\frac{1}{\text{mol}}} = 1 \cdot \frac{1}{\text{mol}}$, want delen door een breuk is vermenigvuldigen met het omgekeerde, zie het onderdeel over breuken verderop).

Een tweede voorbeeld is het berekenen van de concentratie azijnzuur (het aantal moleculen in een liter oplossing), met behulp van de dichtheid en de molaire massa: $1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \div 60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 17.49 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dit is de correcte berekening, en levert dus ook de correcte eenheid.

Vermenigvuldigen van deze waarden zou echter het volgende, onjuiste resultaat hebben opgeleverd: $1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \times 60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 63052.5 \text{ g}^2\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. En het delen van de molaire massa door de dichtheid: $60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \div 1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} = 5.719 \cdot 10^{-2} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Om de schrijfwijze van eenheden wat te vergemakkelijken wordt vaak gebruik gemaakt van voorvoegsels, die staan voor een vermenigvuldiging met een macht van tien. Zo worden kleine volumes meestal uitgedrukt in ml, in plaats van 10^{-3} liter (of 10^{-9} m^3). De volgende tabel geeft een overzicht van enkele veel voorkomende voorvoegsels.:

voorvoegsel	symbool	vermenigvuldigingsfactor	Nederlands	Engels
giga	G	10^9	miljard	billion
mega	M	10^6	miljoen	million
kilo	k	10^3	duizend	thousand
deci	d	10^{-1}	een tiende	a tenth
centi	c	10^{-2}	een honderdste	a hundredth
milli	m	10^{-3}	een duizendste	a thousandth
micro	μ	10^{-6}	een miljoenste	a millionth
nano	n	10^{-9}	een miljardste	a billionth
pico	p	10^{-12}	een biljoenste	a trillionth

Bij het omrekenen tussen eenheden met een vermenigvuldigingsfactor worden helaas veel fouten gemaakt. Een experiment kan soms geheel mislukken door het toevoegen van een factor tien teveel of te weinig van een bepaalde stof. Let dus goed op in welke eenheid iets precies staat, en bedenk goed of je moet delen of vermenigvuldigen om naar een andere eenheid te komen. Om bijvoorbeeld een volume in ml uit te drukken in liter *deel* je door duizend, want een milliliter is veel minder dan een liter dus het getal moet kleiner worden als het wordt uitgedrukt in een grotere eenheid. En andersom, om een hoeveelheid mmol uit te drukken in μmol *vermenigvuldig* je met duizend, want micromol is een kleinere eenheid dan millimol, dus het getal moet groter worden (anders zou het betekenen dat je ineens een miljoen maal minder moleculen hebt!).

Breuken en machten

Bij het omrekenen en uitrekenen van waarden zul je in de praktijk veel met breuken te maken krijgen. Dat is geen probleem zo lang je weet wat je aan het doen bent. Het gebruik van deelstrepen bij breuken leidt helaas vaak tot grote verwarring, vooral zo gauw er in een uitdrukking meer dan één breuk voorkomt. In dat soort gevallen kan het vaak handig zijn om breuken te schrijven als een negatieve macht. Als je dan consequent haakjes gebruikt en de rekenregels voor machten toepast, kan er weinig mis gaan. We herhalen hier kort de rekenregels voor breuken en machten. Bovendien zullen we de regels voor breuken helemaal uitschrijven met negatieve en positieve machten, om te laten zien dat beide notaties tot hetzelfde resultaat leiden.

Om een enigszins simplistisch voorbeeld te geven, zo weet iedereen bijvoorbeeld dat een getal gedeeld door zichzelf één is. Als je het schrijft met machten kun je ook zien waarom:

$$\frac{x}{x} = x \cdot \frac{1}{x} = x^1 \cdot x^{-1} = x^{1-1} = x^0 = 1$$

Werken met machten en breuken, enkele voorbeelden:

$$x^{-1} = \frac{1}{x}$$

$$x^{\frac{1}{2}} = \sqrt{x}$$

$$x^{\frac{m}{n}} = (\sqrt[n]{x})^m$$

$$x^{-n} = \frac{1}{x^n}$$

$$x^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{x}$$

$$x^{-\frac{m}{n}} = \frac{1}{(\sqrt[n]{x})^m}$$

$$x^0 = 1$$

$$0^n = 0$$

$$x^1 = x$$

$$x^a \cdot x^b = x^{a+b}$$

$$\frac{x^a}{x^b} = x^a \cdot x^{-b} = x^{a-b}$$

$$(x^a)^b = x^{a \cdot b}$$

$$a \cdot \frac{1}{b} = \frac{a}{b} = a^1 \cdot b^{-1}$$

$$a \cdot \frac{b}{c} = a^1 \cdot b^1 \cdot c^{-1} = \frac{a \cdot b}{c}$$

$$\frac{a^n}{b^m} = a^n \cdot b^{-m}$$

$$(a^m \cdot b^n)^x = (a^m)^x \cdot (b^n)^x = a^{m \cdot x} \cdot b^{n \cdot x}$$

$$\frac{a}{b} \cdot \frac{c}{d} = a \cdot \frac{1}{b} \cdot c \cdot \frac{1}{d} = a \cdot b^{-1} \cdot c \cdot d^{-1} = a^1 \cdot c^1 \cdot b^{-1} \cdot d^{-1} = \frac{a \cdot c}{b \cdot d}$$

$$\frac{a}{(\frac{b}{c})} = a \cdot (b^{-1} \cdot c^{-1})^{-1} = a \cdot (b^{-1} \cdot c^1) = a \cdot \frac{c}{b} = \frac{a \cdot c}{b}$$

Ofwel: “delen door een breuk is vermenigvuldigen met het omgekeerde”

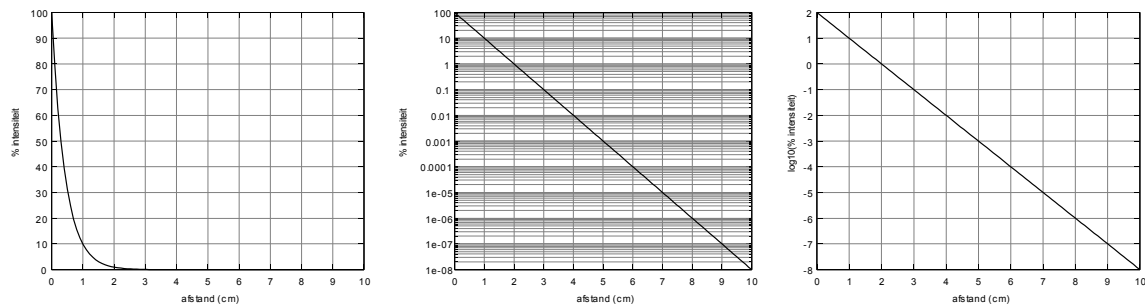
$$\frac{(\frac{a}{b})}{(\frac{c}{d})} = (a^1 \cdot b^{-1}) \cdot (c^1 \cdot d^{-1})^{-1} = (a^1 \cdot b^{-1}) \cdot (c^{-1} \cdot d^1) = a^1 \cdot d^1 \cdot b^{-1} \cdot c^{-1} = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Volgorde van wiskundige bewerkingen: () x^n $\sqrt{\quad}$ \times \div $+$ $-$

Logaritmen

Naast breuken zul je regelmatig logaritmen tegenkomen. In de praktijk worden logaritmen veel toegepast om exponentiële processen lineair weer te geven. Een voorbeeld is de afname van lichtintensiteit met afstand bij spectrofotometrie. Als licht door een (homogeen) medium gaat neemt de lichtintensiteit exponentieel af, aangezien over iedere afstand hetzelfde percentage licht verdwijnt (door absorptie en verstrooiing). Als na een centimeter door een troebele

oplossing bijvoorbeeld nog 10% van het licht over is (90% extinctie), dan is na 2 cm dus nog 1% licht over, na 3 cm 0.1% enzovoort.



Figuur 1.1 Verschillende manieren om exponentiële afname van lichtintensiteit weer te geven.

We kunnen dit op drie manieren weergeven. In de linker grafiek hebben we simpelweg de lichtintensiteit uitgezet tegen de afstand. Na 3 cm is echter de intensiteit zo klein geworden dat we de waarde niet meer kunnen aflezen. Bovendien is onze waarneming van licht (en geluid) niet lineair maar logaritmisch. Als we naar het licht zouden kijken *zien* we geen 90% reductie in lichtintensiteit per cm, maar slechts ongeveer een halvering. De grafiek is in dit geval dus ook geen goede weergave van hoe we zelf de wereld zien.

In de middelste grafiek hebben we een logaritmische schaal gebruikt voor de lichtintensiteit. Nu zijn lage-intensiteitswaarden wel goed af te lezen. Een andere mogelijkheid is om niet de lichtintensiteit te plotten maar een logaritme ervan, bijvoorbeeld de \log_{10} van de lichtintensiteit. Dit hebben we rechts gedaan, en het geeft exact dezelfde grafiek als het gebruik van een logaritmische schaal. Het nadeel is natuurlijk dat we nu niet meer direct de lichtintensiteit af kunnen lezen, alleen de “orde van grootte” ervan. Dat kan echter ook een voordeel zijn: als je alleen geïnteresseerd bent in de orde van grootte, dan hoef je bij gebruik van de \log_{10} niet langer steeds hele grote of kleine getallen te schrijven (meestal ook nog met een 10-macht erbij).

In dit geval heeft het gebruik van het logaritme nog een extra voordeel. De afname in lichtintensiteit kun je gebruiken om de concentratie van stoffen te meten. De lichtintensiteit neemt ook exponentieel af met de concentratie van een licht-absorberende stof. Dit betekent dat concentratie evenredig is met het logaritme van de intensiteit. Met andere woorden, je kunt de \log_{10} van de afname in lichtintensiteit (de extinctie) direct gebruiken als lineaire maat voor de concentratie van een licht-absorberende stof. Dat is ook precies wat we doen bij spectrofotometrie.

Andere bekende logaritmische maten zijn pH (zuurgraad), decibel (geluidsintensiteit) en bit (informatie-hoeveelheid).

Voor de volledigheid geven we hier nog even de definities en de rekenregels voor logaritmen:

Algemeen logaritme: $n = \log_a(x) \Leftrightarrow a^n = x$

Base-10 logaritme: $\log(x) = \log_{10}(x)$ $n = \log_{10}(x) \Leftrightarrow 10^n = x$

Natuurlijk logaritme: $\ln(x) = \log_e(x)$ $n = \ln(x) \Leftrightarrow e^n = x$

Rekenregels: $\log_a(1) = 0$ $\log_a(a) = 1$

$\log_a(x^g) = g \cdot \log_a(x)$ $\log_a(b \cdot c) = \log_a(b) + \log_a(c)$

$\log_a\left(\frac{1}{x}\right) = \log_a(x^{-1}) = -\log_a(x)$

$$\frac{\log_n b}{\log_n a} = \log_a b \quad (n, a, b > 0 \wedge n, a \neq 1)$$

$$\log_a \left(\frac{b}{c}\right) = \log_a (bc^{-1}) = \log_a (b) + \log_a (c^{-1}) = \log_a (b) - \log_a (c)$$

Concentraties, moleculen en volumes

De meest voorkomende berekeningen op het lab hebben te maken met concentraties en volumes. Bij het maken van een verdunning moet je bijvoorbeeld berekenen hoeveel van de oorspronkelijke oplossing toegevoegd moet worden om de gewenste concentratie te krijgen. En andersom is het vaak nodig om van een verdunde oplossing de concentratie te berekenen.

De concentratie of molariteit van een oplossing geeft aan hoeveel moleculen van de opgeloste stof er in een liter van de betreffende oplossing zitten. Als je een milliliter van die oplossing neemt, bevat deze dus een duizendste van het aantal opgeloste moleculen dat in een liter zit. De concentratie is echter hetzelfde. Als je nu echter een milliliter van de oplossing aan zou vullen met water tot een liter, dan bevat het nog steeds hetzelfde aantal moleculen opgeloste stof, maar nu in een duizendmaal zo groot volume. Het aantal opgeloste moleculen verandert dus niet bij deze verdunning, maar de concentratie is duizendmaal zo klein geworden.

De bovenstaande redenering leidt tot een relatief eenvoudige manier om concentraties en volumes te berekenen. Stel, je pipetteert een bepaald volume A van oplossing 1 in een maatcilinder, en je vult de cilinder aan met water (of buffer) tot een nieuw eindvolume B, zodat je een verdunde oplossing 2 krijgt. Bij een dergelijke verdunning blijft het aantal opgeloste moleculen gelijk. Dit aantal moleculen is te berekenen door de concentratie van de oorspronkelijke oplossing (bijvoorbeeld in $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) te vermenigvuldigen met het volume A dat van de oorspronkelijke oplossing 1 is toegevoegd (de gepipetteerde hoeveelheid, bijvoorbeeld in liter). Het resultaat is het aantal mol opgeloste stof dat aan de verdunde oplossing 2 is toegevoegd. Als je nu het eindvolume B van de verdunde oplossing 2 vermenigvuldigt met de concentratie van die oplossing, dan zou je op hetzelfde aantal moleculen uit moeten komen. Kortom:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Ofwel, het gepipetteerde volume maal de concentratie van de oorspronkelijke oplossing 1, geeft een aantal moleculen dat gelijk moet zijn aan het totaalvolume van de verdunde oplossing 2 maal de concentratie van die oplossing. Als je drie van deze vier waardes weet, dan kun je de onbekende waarde dus berekenen. Stel bijvoorbeeld dat je 2 ml van een 1.5 mM oplossing in een buisje pipetteert, en je vult dit aan tot 3 ml. Wat is nu de concentratie van de oplossing in het buisje? Invullen in bovenstaande vergelijking geeft:

$$2.00 \cdot 10^{-3} \text{l} \times 1.50 \cdot 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1} = 3.00 \cdot 10^{-3} \text{l} \times C_2$$

Controleer dat het resultaat $1.00 \cdot 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zal zijn, ofwel 1.00 mM. Je kunt ook makkelijk zien dat het niet uit maakt welke eenheden (of eigenlijk: voorvoegsels) je gebruikt, zo lang de eenheden aan beide zijden van de vergelijking hetzelfde zijn. Op dezelfde manier kun je dus ook eenvoudig uitrekenen hoeveel water of buffer je toe moet voegen aan de oorspronkelijke 2 ml 1.5 mM oplossing om een molariteit van 1 mM te bereiken, of hoeveel van de 1.5 mM oplossing je in 3 ml moet pipetteren om een 1 mM oplossing te krijgen.

Naast de molariteit van een stof kennen we ook het begrip *osmolariteit*. Dit is de concentratie osmotisch actieve deeltjes (bijvoorbeeld ionen). Een voorbeeld: $1 \text{ M NaCl} = 2 \text{ osmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$.

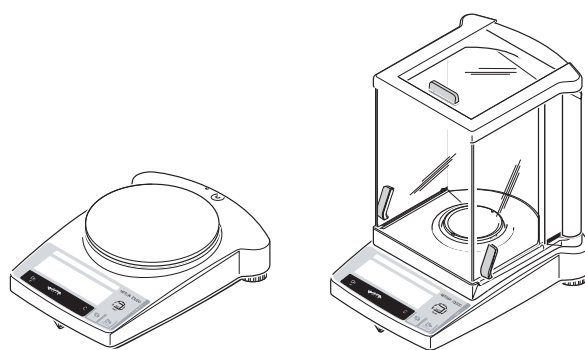
Op verpakkingen worden concentraties van stoffen vaak niet uitgedrukt als molariteit, maar als massa- of volumepercentage:

- % (w/w), massa (gram) opgeloste stof per 100 g oplossing.
- % (w/v), massa (gram) opgeloste stof per 100 ml oplossing.
- % (v/v), volume onverdunde stof per volume oplossing (bijvoorbeeld ml/ml).

Wegen, meten en pipetteren

Massa

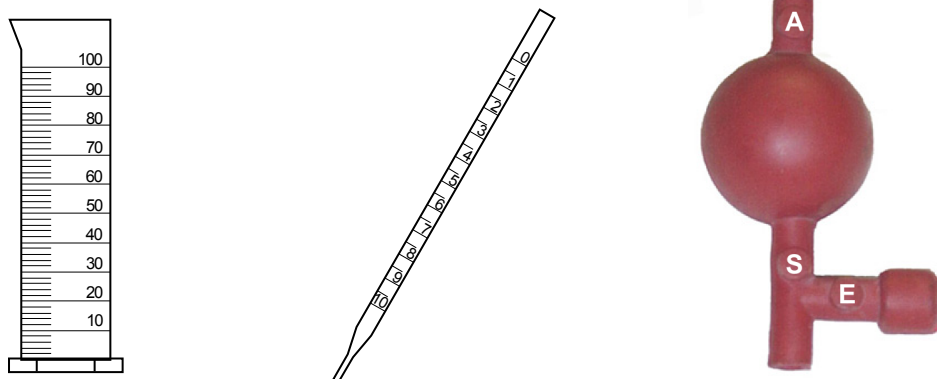
Voor afwegen van stoffen zijn op de practicumzalen twee typen balansen aanwezig. Met de *bovenweger* kunnen hoeveelheden > 500 mg met een redelijke nauwkeurigheid (± 10 mg) worden afgewogen. Met een *fijnbalans* kun je kleinere hoeveelheden afwegen (tot enkele milligrammen), met een grotere nauwkeurigheid (± 0.1 mg).



Figuur 1.2 Een bovenweger (links) en een fijnbalans (rechts).

Volumes

Voor het afmeten van volumina gebruiken we maatglaswerk (tegenwoordig vaak ook kunststof) of pipetten. Voor het nauwkeurig afmeten van vaste volumes (bv. 50, 100 of 250 ml) kun je een *maatkolf* gebruiken. Met een *maatcilinder* kun je minder nauwkeurig maar uiteraard veel flexibeler volumes afmeten. Voor een volume kleiner dan 10 ml gebruiken we meestal een *pipet*.



Figuur 1.3 Een maatcilinder, een meetspipet en een pipetteballon.

Glaspipetten (van glas of plastic) worden vaak gebruikt voor volumes van 1-10 ml. *Volpipetten* zijn glaspipetten die worden gebruikt voor het afmeten van een vast volume. Deze worden echter nauwelijks meer gebruikt. *Meetpipetten* zijn voorzien van een maatverdeling, en kunnen dus net als een maatkolf gebruikt worden om variabele volumes meet af te meten. Let bij het gebruik van glaspipet op correct gebruik. De manier van pipetteren kan soms van invloed zijn op het gepipetteerde volume, met name als je de pipet helemaal leeg laat lopen. Het is daarom aan te raden om dit soort pipetten niet te gebruiken voor pipetteren van het volledige volume, tenzij je ervaren bent in het gebruik.

Voor glaspipetten wordt een pipetteerballon gebruikt (zie figuur 1.3). Dit werkt als volgt:

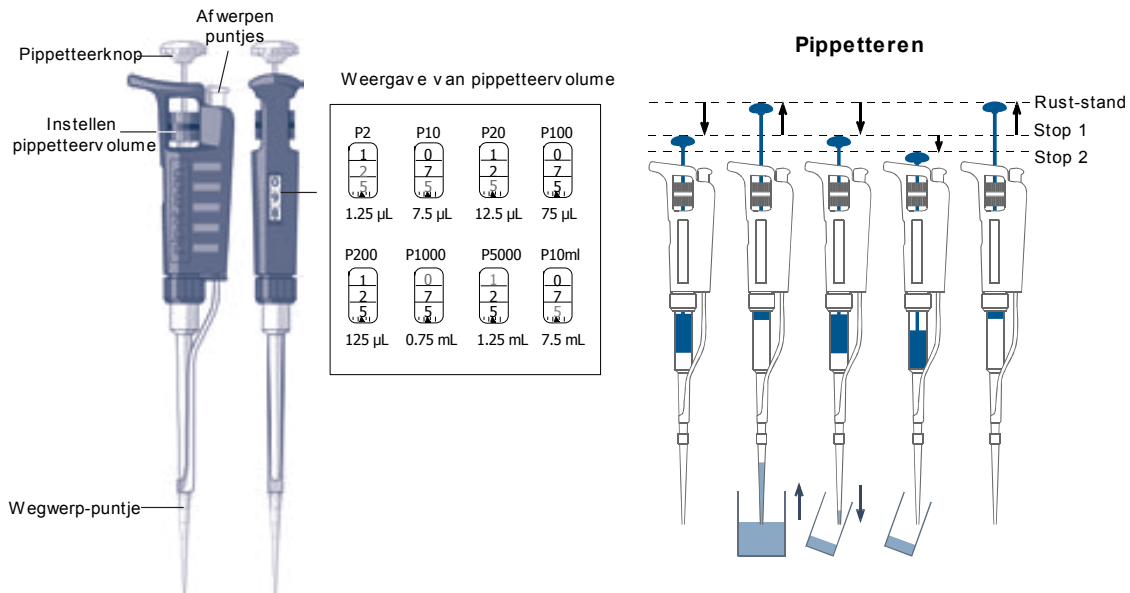
- Maak de ballon goed vast aan de bovenkant van de pipet.
- Druk op **A** (*Air*), en knijp de lucht uit de ballon.
- Steek de punt van de pipet in de te pipetteren oplossing en zuig de vloeistof op door **S** (*Suck*) in te drukken op de ballon. Zorg dat je iets meer oplossing opzuigt dan dat je wilt pipetteren.
- Veeg met een tissue de buitenkant van de pipet schoon.
- Zet de pipet verticaal tegen de wand van het vat waaruit je pipetteert. Hou het vat schuin zodat de pipet een hoek van ongeveer 45° met de wand maakt.
- Druk op **E** (*Empty*) op de ballon en laat langzaam vloeistof teruglopen in het vat, tot de onderkant van de meniscus in je pipet precies op 0 staat.
- Zet nu de pipet weer verticaal tegen de wand van het vat waarin je wilt pipetteren. Hou het vat weer iets schuin, en laat met **E** voorzichtig de gewenste hoeveelheid vloeistof uit de pipet lopen.

Voor volumes beneden 5 ml worden tegenwoordig meestal *automatische pipetten* gebruikt. Deze worden ook wel *micropipetten* of *Gilson-pipetten* genoemd, en zijn gemaakt van kunststof. Met een stel-wieltje of knop wordt het te pipetteren volume ingesteld. Op iedere pipet wordt het maximale volume aangegeven in microliter. De meest voorkomende typen zijn P-5000 (5 ml), P-1000 (1 ml), P-200 (0.2 ml), P-20 (20 µl) en P-2 (2 µl). Het pipetteren gebeurt met plastic wegwerp-puntjes. Iedere keer dat van monster gewisseld wordt, moet in principe het puntje gewisseld worden. De verschillende pipetten gebruiken verschillende typen puntjes, met verschillende kleuren. Het pipetteren gebeurt door de knop in te drukken tot de eerste stop, de pipetpunt in een vloeistof te steken, en de knop langzaam los te laten. Vervolgens hou je de punt boven de houder of oplossing waar je in wilt pipetteren (tegen de wand), en druk je de knop volledig in, tot de laatste (tweede) stop. Enkele punten om op te letten:

- Pipetteer nooit zonder puntje. Let ook op dat je het juiste puntje neemt voor het type pipet dat je gebruikt.
- Let bij het instellen van het volume op de positie van de decimale punt. In principe is het volume dat wordt weergegeven in microliter, tenzij anders aangegeven (op de pipet). Vraag het bij twijfel aan de assistent. Draai de stelknop nooit verder dan het maximale volume.
- Hou de pipet nooit ondersteboven of horizontaal als er vloeistof in zit! Je kunt een gevulde pipet dus niet op tafel neerleggen. Laat de pipet ook niet op de grond vallen.
- Bij hele kleine of hele grote volumes is het verschil tussen de stops soms moeilijk te voelen. Oefen eventueel even voordat je echt gaat pipetteren, of overweeg een ander type pipet te gebruiken in dat soort gevallen (groter of kleiner volume).
- Let er bij alle typen pipetten (ook glaspipetten) op dat je geen luchtballen of schuim (bv.

bij eiwitten) in de pipet krijgt. Lucht in de pipet kan uiteraard het gepipetteerde volume beïnvloeden.

- In principe pipetteer je boven de vloeistof, in een hoek van 45° tegen de wand van de houder (bv. cuvet, bekeerglas, maatcilinder) waar je in pipetteert. Alleen in speciale gevallen (bijvoorbeeld de enzymen in proef 2) pipetteer je in de vloeistof.



Figuur 1.4 Automatische pipetten uit de veelgebruikte Gilson Pipetman P-serie.

Oplossingen maken

Als je oplossingen moet maken is het verstandig om eerste een tabelletje te maken met de gewenste concentraties, en de benodigde volumes en/of massa's die je af moet meten om de concentraties te verkrijgen.

Voor het oplossen van vaste stoffen gebruik je meestal een bekeerglas. Begin met een kleine hoeveelheid oplosmiddel, en los daarin de vaste stof op. Vul vervolgens de oplossing aan tot het gewenste volume, bijvoorbeeld in een maatcilinder. Meestal is het makkelijker om exacte volumes oplosmiddel af te meten dan een exacte massa vaste stof. Dat is zeker het geval bij grote korrels of kristallen. Je kunt in dergelijke gevallen beter iets teveel stof afwegen. Vervolgens kun je de hoeveelheid oplosmiddel aanpassen, door te berekenen hoeveel je nodig hebt om de gewenste concentratie te bereiken.

Voor vloeistoffen begin je in principe ook met een kleine hoeveelheid oplosmiddel, en vul je pas op het laatst aan tot het gewenste volume. Alleen als je met exacte volumes werkt (bijvoorbeeld bij het maken van een verdunningsreeks in cuvetten, met behulp van een micropipet) is aanvullen uiteraard niet nodig.

Let op bij het oplossen of verdunnen van sterke zuren of basen! Hierbij kan veel warmte vrijkomen, waardoor het in je gezicht kan spatten. Werk dus altijd in een zuurkast en voeg altijd het zuur of de base toe aan het oplosmiddel, in plaats van andersom. Het oplosmiddel zal de vrijkomende warmte absorberen, zodat het minder snel opspat. Let bij het maken van oplossingen ook altijd op eventuele toxiciteit van stoffen, en neem indien nodig veiligheidsmaatregelen zoals werken in een zuurkast en het dragen van handschoenen. Was altijd je handen, zeker nadat je met giftige stoffen hebt gewerkt.

Als je de pH van een oplossing moet stellen (bij het maken van een buffer), dan doe je dit uiteraard in iets minder dan het eindvolume. Stellen doe je door een sterk zuur en/of een sterke

base toe te voegen tot de gewenste pH is bereikt. Daarna vul je de oplossing aan tot het eindvolume.

Oplossingen die bewaard moeten worden, moet je overbrengen in een geschikt bewaarvat (bijvoorbeeld een afsluitbaar flesje), en voorzien van een informatief etiket met daarop de samenstelling, pH, datum en de naam van de producent/eigenaar. Overweeg waar je de oplossing moet bewaren (op tafel, in een kast, in de koelkast/vriezer of op een bewaarplatform in de zuurkast).

Als je klaar bent met een oplossing, moet deze op de juiste manier afgevoerd worden. Overleg bij twijfel met de assistent. Let ook op dat sommige oplossingen later in het practicum nog nodig kunnen zijn. De volgende soorten stoffen mogen in ieder geval niet door de gootsteen gespoeld worden, en worden apart ingezameld:

- Vloeibaar organisch-chemisch afval (met < 4% halogenen). Bijvoorbeeld toluen, ether(s), xyleen, pyridine, aceton, terpentine, alcoholen (methanol, ethanol), aminen, fenolen en aromaten.
- Vloeibaar organisch-chemisch afval (met > 4% halogenen). Bijvoorbeeld chloroform, tetrachloorethyleen, bromoform, dichloorethaan/methaan, trichloorethyleen, trichloorazijnzuur, chloorfenolen en ontvettingsmiddelen als “per” en “tri”.
- Anorganische zuren (>10%) en zure of neutrale oplossingen van zware metalen of metalloïden en fluoriden. Bijvoorbeeld zwavelzuur, zoutzuur, fosforzuur, perchloorzuur, waterstoffluoride, oplosbare fosfaten en oplossingen met zink, koper, nikkel, lood, chromaat en vanadaat.
- Anorganische basen (>10%) en basische oplossingen van zware metalen of metalloïden. Bijvoorbeeld natriumhydroxide, kaliumhydroxide, lithiumhydroxide, ammoniak, permanganaat, molybdaat, arsenaten, antimonaten, en cyanide bevattende oplossingen.
- Anorganische nitreuze zuren (>10%) zoals salpeterzuur, en nitreuze zure of neutrale oplossingen van metalen of metalloïden.
- Specifiek ziekenhuisafval (SZA), zoals microbiologisch besmet afval, besmette scherpe voorwerpen, (delen van) proefdieren, beddingafval van pathogeen besmette proefdieren en Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO-afval).
- Zeer gevaarlijke stoffen (bijvoorbeeld kwik, asbest, explosieve verbindingen, zeer sterke zuren/basen/oxidatoren/reductoren, en zeer toxische stoffen zoals cyanide).

Suffe fouten

Nauwkeurig meten en goed materiaal gebruiken is erg belangrijk voor experimenteel werk. Echter, de meeste fouten worden niet veroorzaakt door onnauwkeurig meten of onnauwkeurigheid in de instrumenten, maar door verkeerd gebruik van materiaal, onoplettendheid of slordigheid. Veel voorkomende bronnen van “experimentele fouten” bij practica zijn:

- verkeerd gebruik van pipetten (bv. verkeerde type, verkeerd instellen, te ver of niet ver genoeg doordrukken, of lucht opzuigen)
- rekenfouten bij het bepalen van concentraties (bv. een factor 10-100 te hoog of te laag)
- vergeten te mengen, of onvoldoende homogeniseren
- slechte administratie (monsters niet markeren, meetwaarden of eenheden niet noteren)

Spectrofotometrie

Er zijn diverse methodes om de concentratie van een stof in een oplossing te bepalen. Een indirecte methode is bijvoorbeeld titratie, uitvoerig behandeld op de middelbare school. Dit is echter vrij bewerkelijk en lang niet mogelijk voor alle soorten stoffen. Voor oplossingen van veel stoffen is het gelukkig mogelijk om de concentratie direct te meten, aan de hand van de absorptie van licht. Dit is het principe van UV-VIS spectrofotometrie.

Iedere stof heeft een karakteristiek *absorptiespectrum*, dat weergeeft bij welke golflengtes de stof UV en zichtbaar (VIS) licht absorbeert en verstrooit. Sommige stoffen hebben duidelijke *extinctie*-pieken bij bepaalde golflengtes. Meting van de extinctie gebeurt door de oplossing in een *cuvet* te pipetteren, en deze in een spectrofotometer te plaatsen met de doorzichtige kant in de lichtbundel. De spectrofotometer schijnt licht van een vooraf in te stellen golflengte λ door de oplossing en meet hoeveel licht er aan de andere kant door de oplossing heen komt. Hieruit wordt de *attenuance* of *absorbance* (in het Nederlands: *extinctie*) van licht door de oplossing berekend. Deze is gedefinieerd als de $-\log_{10}$ van $\frac{I}{I_0}$, de fractie van de oorspronkelijke lichtintensiteit, nadat de lichtbundel door de oplossing is gegaan. Hoe meer opgeloste stof er is, hoe meer licht er wordt geabsorbeerd (of verstrooid). De extinctie A_λ is dus recht evenredig met de concentratie c van de stof die licht absorbeert:

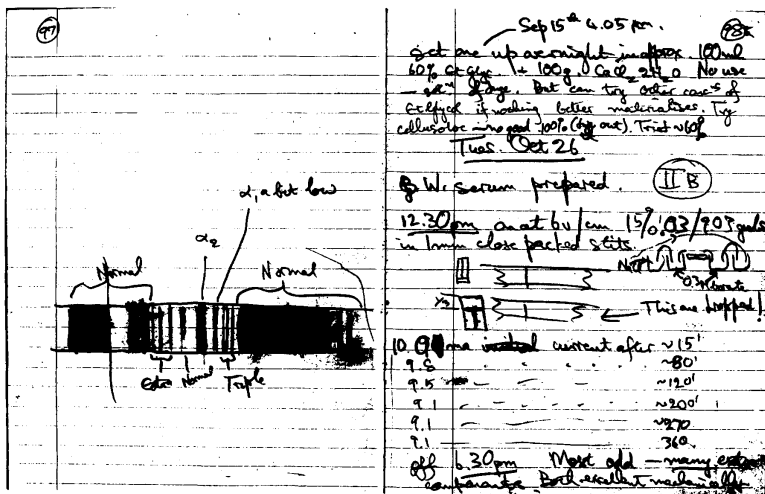
$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot \ell$$

Dit is de *Wet van Beer-Lambert-Bouguer* (in Nederland beter bekend als de *Wet van Lambert-Beer*). Als het licht een langere weg af moet leggen door de oplossing, dan zal er uiteraard ook meer licht geabsorbeerd worden. Vandaar dat de absorptie ook recht evenredig toeneemt met de weglengte ℓ , de afstand die het licht aflegt door de cuvet (meestal 1 cm). Tenslotte wordt de verhouding tussen concentratie en absorptie gegeven door de extinctiecoëfficiënt ε_λ , die specifiek is voor een bepaalde stof bij een bepaalde golflengte (en pH en redox-toestand). Als ℓ en ε bekend zijn, dan kan de concentratie c van de betreffende stof in oplossing dus heel snel en makkelijk bepaald worden door de extinctie A van licht te meten.

Uitwerking en labjournaal

Bij het opzetten van een experiment is het erg belangrijk om *van tevoren* op te schrijven wat je precies van plan bent te gaan meten en waarom, welke materialen en stoffen je daarvoor nodig hebt, in welke verhoudingen je de stoffen moet mengen om de juiste concentraties te krijgen, enzovoort. Nog veel belangrijker is het om *tijdens* het uitvoeren van een experiment exact bij te houden wat je gedaan hebt en wat de resultaten waren. Dit is met name van belang als er iets onverwachts gebeurt of als je bent afgeweken van de planning of van een protocol, anders kun je later niet meer terugvinden wat je exact had gedaan. Ontelbare experimenten zijn al mislukt of overnieuw gedaan omdat de betreffende onderzoeker dacht “ik schijf het later wel op”, en dat vervolgens vergat. Het is bovendien ook de moeite waard om te vermelden dat *erg veel* grote ontdekkingen in de biologie en de medische wereld min of meer per ongeluk zijn gedaan! Als de oplettende onderzoekers in kwestie hun resultaten en werkwijze niet goed hadden bijgehouden, zouden erg veel van deze ontdekkingen waarschijnlijk over het hoofd zijn gezien.

Omdat het zo belangrijk is om bij te houden wat je precies hebt gedaan, houden onderzoekers een *labjournaal* bij. Dit is simpelweg een boekje of schrift waarin je de hele dag door opschrijft wat je van plan bent, wat je hebt gedaan, wat het resultaat was, hoe je dat hebt uitgewerkt, welke ideeën je hebt voor verder onderzoek, wat je conclusies zijn, enzovoort. Het bijhouden van een lab-journaal is een belangrijk hulpmiddel, en onmisbaar bij het uitwerken van resultaten voor bijvoorbeeld een publicatie. Onderzoeksprojecten lopen meestal vele jaren, en vaak werken verschillende onderzoekers eraan mee. Het is daarom ook belangrijk dat waarnemingen op een zodanige manier worden weergegeven dat ze duidelijk zijn voor anderen.



Figuur 1.5 Links twee pagina's uit het labjournaal van de Brits-Amerikaanse geneticus Oliver Smithies, de uitvinder van zetmeel-gelelectroforese (zie proef 6). Op 26 oktober 1954 ontdekte hij met zijn nieuwe techniek onverwacht extra eiwitbandjes bij het scheiden van bloed-serum. Aan het eind van de pagina schreef hij "Most odd — many extra components." De onbekende componenten bleken later *haptoglobinen* te zijn, bloedplasma-eiwitten die bij mensen in verschillende vormen voor kunnen komen. Deze toevallige ontdekking vormde het begin van de studie van genetische eiwit-polymorfismes. Rechts een pagina uit het labjournaal van de Zweede chemicus Per Flodin uit 1957. De pagina beschrijft een belangrijke stap in de ontwikkeling van gelfiltratie (zie proef 4). De vertaling luidt ongeveer: "A160, Dextraan gel. 100 g dextraan (DR 302-310; $|\eta| = 0.195$) werd opgelost in 100 ml 2 N NaOH, tot een visceuze oplossing ontstond met veel kleine luchtballen. Voor het oplossen werd een Brookfield-stirrer gebruikt. Aan de oplossing werd 20 ml epichloorhydrine (23.6 g) toegevoegd, dat met de hand werd gemengd tot een fijne emulsie. Gel-vorming vond plaats binnen enkele uren. De gel werd 5 uur lang verwarmd bij 50°C. De gel was breekbaar en kon makkelijk verkruid worden. De gel werd verder vermalen tot fijn poeder in een "Starmix", en werd vervolgens gewassen op een filter tot het vrij was van Cl⁻-ionen (na de reactie was het neutraal vanwege de toevoeging van overmatige epichloorhydrine). Vervolgens werd het gewassen in ethanol en een nacht gedroogd in de oven. Het droge poeder woog 116 g. Het werd verder vermalen in een molen en gezeefd. Twee hoofdfracties werden verkregen, < 20 DIN en > 20 < 10 DIN. Twee gram van de meest fijne fractie (< 20 DIN) werden gezwollen in water tot een volume van 14 ml. De zwellingsfactor was 7 mg/g. Een mengsel van kleurstoffen werd op de gel gebracht in een chromatografie-kolom. Een rode fractie liep door de kolom met gedestilleerd water. Achtereenvolgens een groene en een rode fractie liepen door de kolom met een zout-oplossing."

Tijdens dit practicum moet ook een labjournaal bijgehouden worden, zodat je zelf, evenals je groepsgenoten en de assistent naderhand nog goed kunt terugzoeken wat je precies hebt gedaan, en wat de resultaten waren. In je labjournaal wordt de globale planning van het experiment genoteerd en worden tijdens de uitvoering van een experiment de waarnemingen bijgehouden. Werk zoveel mogelijk met schema's en tabellen. Geleerd moet worden de verschillende zaken direct overzichtelijk in het labjournaal op te nemen. Een goede voorbereiding is daarom belangrijk. Het is niet de bedoeling dat een werkstuk wordt geproduceerd, waaraan thuis nog wordt gewerkt. Aan het einde van de practicum-dag moet je het labjournaal aan de assistent laten zien.

De volgende zaken dienen vermeld te zijn in het labjournaal voordat je begint aan de praktische werkzaamheden:

- Datum van het experiment, en korte inleiding
- Een globale tijdsplanning van de uit te voeren werkzaamheden.

- Beantwoording van de vragen die gesteld zijn in de handleiding
- Indien van toepassing een pipetteer-schema voor de uit te voeren bepaling(en).
- Een schema en/of voorbereekte tabel, met daarbij een duidelijke weergave van de te volgen rekenmethode. Belangrijke variabelen als de te maken verdunningen, incubatietijd etc. moeten hierin worden opgenomen.

Na het starten van de werkzaamheden en de uitvoering van de bepalingen worden de metingen en andere gegevens direct genoteerd in de voorbereekte tabel. Daardoor kunnen de meetgegevens direct worden omgerekend naar de juiste eenheden en worden uitgezet in een grafiek, die ook in het labjournaal wordt opgenomen. Het labjournaal wordt afgesloten met een korte samenvatting, conclusie en discussie van de resultaten. Eventueel wordt ook de relatie met de resultaten van anderen in de groep behandeld.

Per proef heb je ongeveer 3-4 pagina's nodig in je labjournaal. Schrijf en werk netjes. Het labjournaal moet in ieder geval de volgende onderdelen bevatten:

Tijdens de voorbereiding:

- Titelpagina: je naam, datum, titel van het experiment.
- Eventueel te beantwoorden vragen uit de practicumhandleiding.
- Inleiding: een korte beschrijving van het experiment (de theoretische achtergrond, het doel en de werkwijze, hooguit driekwart A4-pagina).
- Tijdsplanning en eventuele tabellen en werkschema's.

Tijdens het practicum:

- Vermeld welk protocol je volgt (in dit geval waarschijnlijk de practicumhandleiding). Noteer ook eventuele handelingen die afwijken van het protocol.
- Resultaten: waarnemingen en meetwaarden per onderdeel van het experiment. Verwerk meetwaarden en observaties zoveel mogelijk in tabellen, een grafiek en/of een tekening. Vermeld *altijd* de gebruikte eenheden in tabellen en op de assen van een grafiek!
- Vermeld welke monsters door jezelf werden geanalyseerd, en vergelijk dit met andere geanalyseerde monsters in de groep.

Na het experiment:

- Trek conclusies uit de waarnemingen.
- Wat zijn eventueel verschillen/overeenkomsten tussen je eigen meetwaarden en die van medestudenten?
- Is de uitkomst naar verwachting? Bediscussieer je resultaten, en eventueel verschillen/overeenkomsten met de resultaten van anderen.
- Beantwoord eventuele vragen uit de practicumhandleiding.

In het labjournaal hou je dus je uitkomsten bij voor jezelf en de mensen met wie je samenwerkt. Naast het labjournaal is ook een meer formele verslaglegging van je resultaten belangrijk. In de praktijk gebeurt dit meestal in de vorm van een rapport of een wetenschappelijk artikel, waarin een kort overzicht wordt gegeven het gedane onderzoek, en waarin de belangrijkste metingen en conclusies overzichtelijk worden weergegeven voor de buitenwereld. In dit practicum moet je van één van de proeven een kort rapport schrijven. Hiervoor zijn uiteraard de gegevens uit het labjournaal essentieel. Het weergeven van kwantitatieve resultaten gebeurt meestal in de vorm van grafieken of tabellen. Voor de juiste interpretatie hiervan is het belangrijk dat de juiste eenheden en significantie gebruikt worden.

Als je met een computer werkt, dan kun je het aantal cijfers achter de komma instellen op de juiste significantie. Ook kun je wetenschappelijke notatie gebruiken. Dat vereist op de computer wat gewenning, maar is wel aan te raden. Een getal $x \cdot 10^y$ wordt op een computer meestal weergegeven als $x\text{E}y$ of $x\text{e}y$. Het getal 0.05719 wordt dus 5.719E-02 of 5.719e-02.

Let op dat Engelstalige software meestal decimale punten gebruikt in plaats van de Nederlandse decimale komma. Zo zal een Engelstalige versie van Microsoft Excel geen getallen met komma's herkennen, en een Nederlandstalige versie geen getallen met punten. Dit kan bijvoorbeeld problemen opleveren met het knippen en plakken van meetgegevens tussen verschillende programma's. De zoek-en-vervang optie van Excel biedt hierbij uitkomst, alle komma's kunnen simpelweg vervangen worden door punten, of andersom. In deze handleiding gebruiken we voor alle getallen de Engelse notatie, dus met een decimale punt, en een komma voor duizendtallen. Deze notatie wordt het meest gebruikt in internationale publicaties. Je mag echter zelf kiezen welke notatie je gebruikt, zo lang je maar consequent bent.

Bij grafieken moeten altijd de grootheden en eenheden op de assen vermeld worden. Als er meerdere lijnen (data-series of *datasets*) geplot worden is een legenda ook noodzakelijk. Voor het maken van grafieken in Excel gebruik je in principe meestal het grafiek-type XY-Scatter. Met het tabblad "Series" (na het kiezen van het grafiek-type, of later op te vragen met de functie "Source Data") kun je vervolgens meerdere experimenten in een grafiek plotten, en afzonderlijk de x- en y-assen en de naam van iedere data-serie opgeven.

Voor het maken van ingewikkelde of hoge kwaliteit grafieken is Excel niet echt geschikt, en is speciale plotting-software aan te raden. Naast dure commerciële pakketten zijn er goede gratis programma's zoals *SciDAVis* (<http://scidavis.sourceforge.net/>) of *JPlot* (<http://jplot.sourceforge.net/>) voor (onder meer) Windows, *LabPlot* (<http://labplot.sourceforge.net/>) voor MacOS X en Linux, en *Kst* (<http://kst.kde.org/>) voor Linux.

pH

De pH is een maat voor de hoeveelheid waterstof-ionen (H^+) in een oplossing. De pH beïnvloedt onder meer de oplosbaarheid van veel stoffen, en de werking en activiteit van biologische systemen (van enzymen en reactieketens tot kleine organismen).

Puur water dissocieert onder natuurlijke omstandigheden in kleine hoeveelheden H^+ en OH^- ionen. De waterstof-ionen komen niet los voor, maar zijn gebonden aan water (als hydronium-ionen, H_3O^+). Dus de dissociatie van water is: $2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$. Echter, vaak zie je de dissociatie-reactie simpelweg geschreven als: $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$.

Bij 25°C is de concentratie H^+ (dus eigenlijk $[\text{H}_3\text{O}^+]$) en OH^- ionen in zuiver water elk $1.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. De pH wordt gedefinieerd als de negatieve logaritme van de *activiteit* van H_3O^+ ionen in een oplossing. Voor de meeste waterige oplossingen is activiteit echter vrijwel gelijk aan de concentratie, dus kunnen we bij benadering zeggen:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+].$$

Voor zuiver water is de pH bij 25°C dus: $-\log_{10} (1.0 \cdot 10^{-7} \text{ M}) = 7.0$. Daarom zeggen we dat pH 7.0 bij 25°C *neutraal* is. Als de concentratie H_3O^+ 10 keer groter wordt, dan neemt de pH-waarde af met 1. Dus bijvoorbeeld $1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M H}_3\text{O}^+$ geeft een pH van 6.0, enzovoort.

De evenwichtsconstante K_{eq} van de dissociatie-reactie van water ($2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$) is:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]\cdot[\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]\cdot[\text{H}_2\text{O}]} = 3.3 \cdot 10^{-18}$$

De concentratie van water, $[\text{H}_2\text{O}]$ is $55.6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (bij 25°C), want 1 liter water weegt dan 1 kg, en

de molaire massa van water is $18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, dus 1 kg water bevat $\frac{1}{18} \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1} \times 10^3 \text{ g} = 55.6 \text{ mol}$ water-moleculen.

Omdat water meestal in overschot aanwezig is, blijft de concentratie van water meestal nagenoeg constant. We kunnen daarom een ionisatieconstante voor water definiëren, K_w (ook wel waterconstante, ionen-product of dissociatieconstante genoemd):

$$K_w = K_{\text{eq}} \cdot [\text{H}_2\text{O}]^2 = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{OH}^-]$$

Met als waarde (bij 25°C):

$$K_{\text{eq}} \cdot [\text{H}_2\text{O}]^2 = 3.3 \cdot 10^{-18} \cdot (55.6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1})^2 = 1.0 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2\cdot\text{l}^{-2}$$

We noemen de pH van een oplossing neutraal als er in evenwicht evenveel H_3O^+ als OH^- aanwezig is. Bij een overschot van H_3O^+ ionen spreken we van een zure oplossing, en bij een overschot van OH^- ionen spreken we van een basische oplossing.

De pH van een neutrale oplossing hoeft lang niet altijd 7.0 te zijn. Omdat de evenwichtsconstante K_{eq} afhangt van temperatuur, zullen de waterconstante K_w en de pH van een neutrale oplossing ook afhankelijk zijn van temperatuur:

T ($^\circ\text{C}$)	K_w ($\text{mol}^2\cdot\text{l}^{-2}$)	$[\text{H}_3\text{O}^+]$ ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	pH
0	$0.114 \cdot 10^{-14}$	$3.39 \cdot 10^{-8}$	7.47
10	$0.293 \cdot 10^{-14}$	$5.37 \cdot 10^{-8}$	7.27
20	$0.681 \cdot 10^{-14}$	$8.32 \cdot 10^{-8}$	7.08
25	$1.008 \cdot 10^{-14}$	$1.00 \cdot 10^{-7}$	7.00
30	$1.471 \cdot 10^{-14}$	$1.20 \cdot 10^{-7}$	6.92
40	$2.916 \cdot 10^{-14}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$	6.77
50	$5.476 \cdot 10^{-14}$	$2.34 \cdot 10^{-7}$	6.63
100	$51.3 \cdot 10^{-14}$	$7.24 \cdot 10^{-7}$	6.14

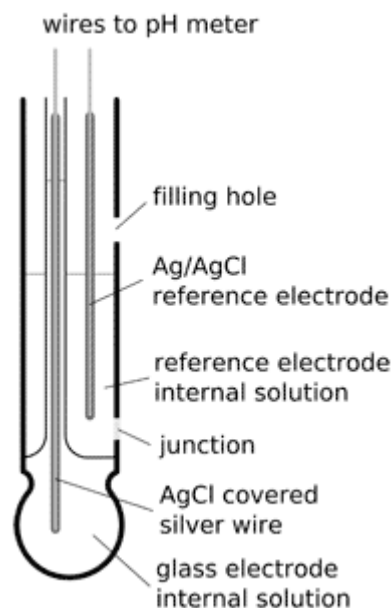
pH metingen

Het meten van pH kan op verschillende manieren, bijvoorbeeld chemisch, met behulp van een pH indicator, of elektrisch met een pH elektrode en pH-meter.

Een pH indicator is een stof die van kleur verandert op een pH-afhankelijke manier, in een beperkt pH-bereik. Vanwege de beperkte nauwkeurigheid zijn dergelijke indicatoren meestal niet geschikt voor nauwkeurige metingen.

Voor een nauwkeurige pH meting wordt meestal een pH-elektrode gebruikt. Het meest gebruikte type elektrode is de glas-elektrode, die bestaat uit twee reservoirs van speciaal glas. Beide delen bevatten een oplossing van sterk zuur. Het binnenste reservoir wordt gebruikt als referentie, het buitenste reservoir is permeabel voor sommige soorten ionen. De activiteit van H_3O^+ ionen in de te meten oplossing bepaalt de mate van ionenuitwisseling van het zuur met de te meten oplossing. Door de uitwisseling van ionen ontstaat er een elektrisch potentiaalverschil tussen beide reservoirs. De elektrode werkt in feite als een galvanische cel, en produceert een klein maar meetbaar voltage. Door dit voltage te kalibreren aan de hand van twee of drie buffers met een bekende pH, kan het als pH-waarde worden weergegeven door een pH meter.

Dergelijke pH-elektrodes zijn nauwkeurig, maar moeten voorzichtig worden behandeld, en constant worden bewaard in een oplossing van sterk zuur (3.0 M KCl) om de verloren ionen weer aan te vullen.



Zuren en basen

Een *zuur* is een stof die in oplossing protonen (H^+ ionen) afstaat. Dit zorgt voor een overschot aan H_3O^+ ionen ten opzichte van OH^- ionen, waardoor de oplossing zuur wordt. Op dezelfde wijze is een *base* een stof die protonen accepteert, zodat een tekort aan H_3O^+ ionen ten opzichte van OH^- ionen ontstaat en de oplossing *basisch* of *alkalisch* wordt.

Een sterk zuur dissocieert geheel, en een zwak zuur dissocieert slechts gedeeltelijk.

De dissociatie-reactie van een willekeurig zwak zuur HA in water,

$\text{HA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{A}^-$, heeft de volgende evenwichtsconstante:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]}$$

Net als bij de eerder beschreven dissociatie van water, kunnen we de concentratie van water in een waterige oplossing als constant beschouwen, en kunnen we dus een dissociatie-constante definiëren (als het product van de evenwichtsconstante en de waterconcentratie). Deze dissociatieconstante voor een zuur noemen we de *zuurconstante* K_a :

$$K_a = K_{\text{eq}} \cdot [\text{H}_2\text{O}] = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Omdat de mate van dissociatie, en daarmee de waarde van deze dissociatieconstante nogal kan verschillen tussen verschillende zuren, gebruiken we in de praktijk meestal $\text{p}K_a$. Dit is de negatieve logaritme van de K_a -waarde:

$$\text{p}K_a = -\log_{10} K_a$$

Een logaritme van het product van twee waarden, $\log(X \cdot Y)$, mag je schrijven als: $\log X + \log Y$. Je kunt pK_a dus ook schrijven als:

$$pK_a = -\log_{10} K_a = -\log_{10}([H_3O^+] \cdot \frac{[A^-]}{[HA]}) = -(\log_{10}[H_3O^+] + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]})$$

Aangezien $pH = -\log_{10} [H_3O^+]$, volgt hieruit de zogenaamde *Henderson-Hasselbach vergelijking*, voor de relatie tussen de pH en de ionisatiegraad van een zwak zuur of een zwakke base:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

HA is hierbij een willekeurig zwak zuur, en A^- de geconjugeerde base. Voor zwakke basen geldt uiteraard hetzelfde, A^- is dan de base en HA het geconjugeerde zuur.

Net als bij een zuur kan aan de hand van de dissociatie-reactie van een zwakke base ($B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + OH^-$) en de bijbehorende evenwichtsconstante ook een dissociatieconstante gedefinieerd worden. Deze noemen we de baseconstante K_b , en de negatieve logaritme hiervan is de pK_b -waarde van een zwakke base:

$$K_{eq} = \frac{[BH^+] \cdot [OH^-]}{[B] \cdot [H_2O]}$$

$$K_b = K_{eq} \cdot [H_2O] = \frac{[BH^+] \cdot [OH^-]}{[B]}$$

$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

Uiteraard hangen alle genoemde dissociatieconstanten met elkaar samen. De waterconstante K_w hadden we al eerder gedefinieerd als: $K_w = [H_3O^+] \cdot [OH^-] = 1.0 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2 \cdot \text{l}^{-2}$ (bij 25°C)

Aan de hand hiervan kunnen we ook een pK_w -waarde definiëren:

$$pK_w = -\log_{10} K_w = -\log_{10} ([H_3O^+] \cdot [OH^-]) = (-\log_{10}[H_3O^+]) + (-\log_{10} [OH^-])$$

Dus:

$$pK_w = pH + pOH = 14.0 \text{ (bij 25°C)}$$

En aangezien $K_a = [H_3O^+] \cdot \frac{[base]}{[zuur]}$ en $K_b = [OH^-] \cdot \frac{[zuur]}{[base]}$, geldt ook dat $K_a \cdot K_b = [H_3O^+] \cdot [OH^-]$. De negatieve logaritme hiervan geeft: $pK_a + pK_b = pH + pOH$, wat weer gelijk is aan pK_w . Dus ook:

$$pK_w = pK_a + pK_b = 14.0 \text{ (bij 25°C)}$$

Buffers

Een buffer is een oplossing die veranderingen in pH tegengaat als er een kleine hoeveelheid zuur of base wordt toegevoegd. Dit is belangrijk voor toepassingen waarbij de pH constant moet blijven, zoals microbiologische experimenten, reacties die worden gekatalyseerd door enzymen, etc.

Een bufferoplossing wordt gemaakt door zowel een zwak zuur als de bijbehorende geconjugeerde base op te lossen, meestal in ongeveer gelijke concentraties. Het zwakke zuur HB zal reageren met eventuele vrije OH^- ionen tot water en de geconjugeerde base B:
 $\text{HB} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{B} + \text{H}_2\text{O}$.

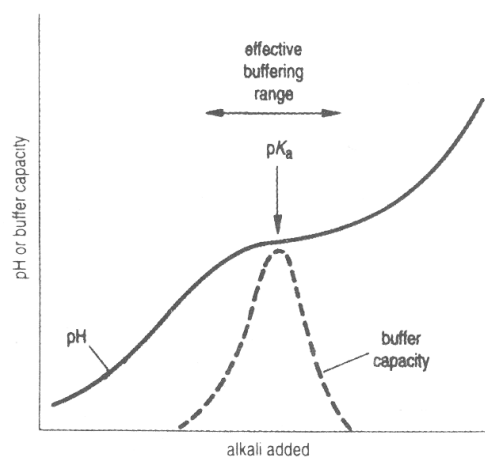
Omgekeerd zal de geconjugeerde base B reageren met eventuele vrije H_3O^+ ionen tot water en het zwakke zuur HB: $\text{B} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons \text{HB} + \text{H}_2\text{O}$. De concentraties zuur en base zullen dus wel enigszins veranderen en er stelt zich een nieuw evenwicht in, met een iets andere pH. Echter, deze pH verandering is vele malen kleiner dan het geval zou zijn in afwezigheid van de buffer. Vanwege het evenwicht zal de concentratie H_3O^+ (en daarmee de pH) dus relatief weinig veranderen.

Omdat de dissociatieconstante van zuur en base in dit geval hetzelfde is (dus ook $\text{pK}_a = \text{pK}_b$), geldt dat als je beiden in gelijke hoeveelheden oplost (dus $[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-]$ en $\text{pH} = \text{pOH}$), de pH van de bufferoplossing gelijk zal zijn aan de pK_a -waarde:
 $\text{pK}_a + \text{pK}_b = \text{pH} + \text{pOH} \Rightarrow 2 \cdot \text{pK}_a = 2 \cdot \text{pH}$.

Buffercapaciteit en het maken van buffers

Zoals hierboven beschreven fungeren oplossingen van zwakke zuren en zwakke bases als pH-buffers in het pH-gebied rondom de waarde van hun $\text{pK}_{a/b}$ (de negatieve logaritme van hun dissociatieconstante).

Onder buffercapaciteit verstaan we de mate van 'resistentie' tegen pH-veranderingen. Deze capaciteit kan experimenteel gemeten worden door te titreren met een sterk zuur of een sterke base, en de pH van de buffer te meten.



Figuur 1.6 Theoretische pH-titratiecurve van een bufferoplossing. De pH-verandering is het kleinst en de buffercapaciteit het grootst bij de pK_a van de bufferoplossing.

Het 'midpoint' van het plateau waar de buffercapaciteit het grootst is in bovenstaand figuur, vertegenwoordigt de pH waar een gelijke hoeveelheid zuur en base aanwezig is. Dit is de pK_a van de bufferoplossing.

De pK_a is dus een belangrijk gegeven bij het bepalen van een geschikte buffer voor een bepaald pH-traject. Kies een buffer waarvan de pK_a binnen één pH-eenheid ligt van de waarde die je nodig hebt.

In de tabel hieronder zijn de pK_a waardes weergegeven van enkele veelgebruikte zuren en basen voor buffer-oplossingen. Voor meerwaardige zuren/basen zijn de pK_a waardes gegeven voor iedere dissociatiestap.

Zuur/base	Engelse naam	pK_a waarde bij 25°C
Azijnzuur	Acetic acid	4.7
Carbonzuur	Carbonic acid	6.1, 10.2
Citroenzuur	Citric acid	3.1, 4.8, 5.4
Glycylglycine	Glycylglycine	3.1, 8.1
Ftaalzuur	Phthalic acid	2.9, 5.5
Fosforzuur	Phosphoric acid	2.0, 6.7, 12.3
Barnsteenzuur	Succinic acid	4.2, 5.6
TRIS	TRIS	8.1

Bij het maken van een buffer moet je rekening houden met onder meer de volgende factoren:

- Kies een buffer met een geschikte pK_a .
- Bepaal de ratio van zuur en geconjugeerde base die de goede pH geven.
- Bepaal de buffersterkte; de buffercapaciteit hangt ook af van de absolute hoeveelheid zuur en base.

Voor traditionele buffers meng je vervolgens de zure en basische component in de verhouding die de goede pH geeft. Voor Zwitterionbuffers¹: los de stof op en breng hem op de goede pH met sterk zuur of base. Controleer na afloop altijd de pH met een pH-meter.

Biologische buffers

Als je met biologisch actieve materialen werkt (bijvoorbeeld eiwitten, enzymen, cellen, organellen) is het vaak nodig om een *biologische buffer* te gebruiken. Biologische buffers moeten aan de volgende eisen voldoen:

- Impermeabel voor membranen.
- Niet toxisch voor metabole en biochemische processen.
- Vormt geen oplosbare complexen met kationen.
- Minimaal effect van ionsamenstelling of zoutconcentratie.
- Beperkte pH-verandering in reactie op temperatuur.

Traditionele buffers voldoen hier vaak niet aan. De tabel hieronder geeft een lijst met enkele veelgebruikte biologische buffers.

¹ Een zwitterion is een molecuul dat zowel positieve als negatieve groepen bezit

Afkorting	Chemische stof	pKa bij 25 °C	Werkzame pH-gebied
MES	2- <i>N</i> -morpholinoethanesulphonic acid	6.1	5.5-6.7
PIPES	1,4-piperazinediethanesulphonic acid	6.8	6.1-7.5
MOPS	3- <i>N</i> -morpholinopropanesulphonic acid	7.2	6.5-7.9
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulphonic acid	7.5	6.8-8.2
TRICINE	<i>N</i> -2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethylglycine	8.1	7.4-8.8
TAPS	2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethylamino-1-propanesulphonic acid	8.4	7.7-9.1
CHES	2- <i>N</i> -cyclohexylaminoethanesulphonic acid	9.3	8.6-10.0
CAPS	3-cyclohexylamino-1-propanesulphonic acid	10.4	9.7-11.1

Tips voor het maken van oplossingen

1. Maak eerst een tabelletje (zie Basisvaardigheden en het voorbeeld hieronder).
2. Overweeg de veiligheidsaspecten:
 - giftigheid van stoffen
 - doe zuur bij water en niet omgekeerd
3. De stoffen apart afpassen (afwegen, pipetteren).
4. Oplossen in iets minder dan het eindvolume.
5. Stel eventueel op pH met daartoe gemaakte oplossingen van zuur en base.
6. Vul (in maatglaswerk) het volume aan tot het eindvolume. Breng de oplossing daarna over in een bewaarvat (bij voorkeur een fles met dop).
7. Voorzie elke oplossing van een informatief etiket, met daarop:
 - samenstelling
 - pH
 - datum
 - producent / eigenaar
8. Overweeg even waar je de oplossing bewaart (werktafel, koelkast, vriesvak, zuurkast)
9. Bij het afvoeren van stoffen:
 - let op veiligheids- en milieuaspecten
 - overleg met assistent (sommige oplossingen kunnen verder nog nodig zijn)

Voorbeeld tabelletje (voor het maken van isolatiemedium voor de Fotosyntheseproof)

Stof	Molecuulmassa	Eindconcentratie	Eindvolume	Gram nodig
Sorbitol	0.300 M	0.5 l g
Tricine	0.050 M	0.5 l g
NaCl	0.025 M	0.5 l g
KCl	0.025 M	0.5 l g
MgCl ₂	0.005 M	0.5 l g

pH 7.8 stellen met NaOH

Let op de eenheden! Zie ook pag. 3-4.

Afwegen: gewicht = molaire massa \times concentratie \times volume (*mits de eenheden kloppen!*)

Dus bijvoorbeeld: m afwegen (gram) = M (gram/mol) \times C (mol/liter) \times V (liter)

Verdunnen: $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

Dus: V (afmeten) \times C (mol/l stockoplossing) = V (eindvolume) \times C (mol/l eindconcentratie)

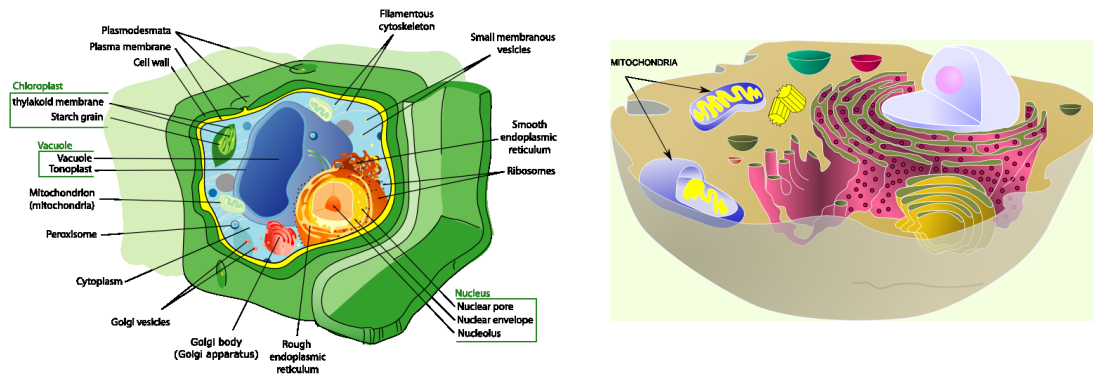
DEEL II – Ademhaling en Fotosynthese

Fotosynthese en de ademhalingsketen zijn waarschijnlijk de twee belangrijkste processen voor vrijwel al het leven op aarde. Bij fotosynthese wordt energie uit zonlicht omgezet in chemische energie. Deze energie wordt vervolgens gebruikt om suikers te vormen uit CO_2 . Dit proces vormt de basis voor vrijwel alle energie die we gebruiken, en is bovendien verantwoordelijk voor de zuurstof-atmosfeer op aarde.

Cellulaire ademhaling is een proces dat erg lijkt op fotosynthese, maar werkt in omgekeerde richting. Het stelt cellen in staat om suikers af te breken tot CO_2 , waarbij chemische energie vrijkomt voor gebruik in de cel. Bij dit afbraakproces wordt zuurstof gebruikt en komt water vrij.

Cellulaire energiecentrales

Veel prokaryoten zijn in staat om fotosynthese, ademhaling of beide processen uit te voeren. Bij dergelijke bacteriën en archaea zitten de benodigde eiwitcomplexen in de celmembraan. Eukaryote cellen hebben speciale organellen voor ademhaling en fotosynthese: mitochondriën en chloroplasten. Algemeen wordt aangenomen dat deze organellen oorspronkelijk zijn ontstaan uit prokaryoten die zich hebben gevestigd in gastheercellen, de verre voorouders van onze eukaryote plantencellen en dierlijke cellen. Een dergelijk samenwerkingsverband tussen cellen heet *endosymbiose*. De endosymbiose-theorie voor de afkomst van mitochondriën en chloroplasten wordt ondersteund door het feit dat deze organellen elk hun eigen DNA hebben.



Figuur 2.1 Een plantencel en een dierlijke cel.

Redoxreacties en elektronenoverdracht

Zowel ademhaling als fotosynthese zijn redoxreacties, dat wil zeggen reacties waarbij elektronen worden uitgewisseld tussen moleculen. De **elektron-donor** in een dergelijke reactie heet een *reductor*. Als een molecuul een elektron accepteert (van een reductor) dan zeggen we dat het molecuul wordt *gereduceerd*. Een **elektron-acceptor** heet een *oxidator*. Als een molecuul een elektron afstaat (aan een oxidator) dan zeggen we dat het molecuul wordt *geoxideerd*.

Bij fotosynthese worden twee watermoleculen geoxideerd tot O_2 en 4H^+ , met behulp van licht-energie. Dit leidt tot een keten van gekoppelde redox-reacties, waarbij een H^+ -gradiënt wordt

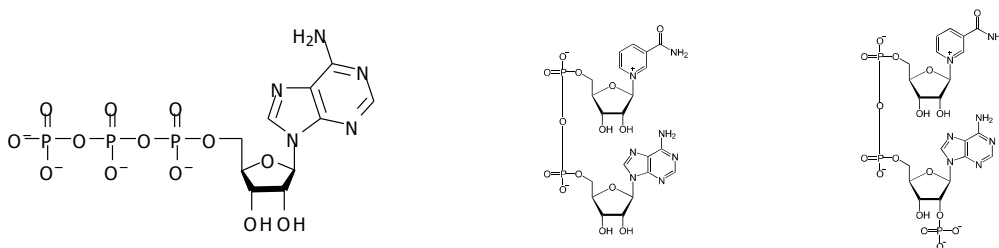
gevormd. Uiteindelijk wordt aan het eind van de keten $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ gereduceerd tot NADPH. NADPH kan vervolgens gebruikt worden voor de reductie van CO_2 , zodat complexere koolwaterstoffen (suikers) gevormd kunnen worden.

Bij ademhaling worden koolwaterstoffen (suikers en vetten) eerst afgebroken tot pyruvaat. Dit pyruvaat wordt vervolgens in stappen geoxideerd tot CO_2 . De vrijgekomen elektronen worden gebruikt voor de reductie van $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$ tot NADH en/of $\text{FAD} + 2 \text{H}^+$ tot FADH_2 . Vervolgens worden NADH en FADH_2 weer geoxideerd door een keten van gekoppelde redoxreacties, waarbij een H^+ -gradiënt wordt gevormd. Uiteindelijk wordt aan het eind van de keten $\text{O}_2 + 4 \text{H}^+$ gereduceerd tot water.

Energiedragers

Zowel fotosynthese als ademhaling maken gebruik van een *elektronen-transportketen*, een reeks van gekoppelde redoxreacties die leidt tot de vorming van een H^+ -gradiënt. Deze gradiënt houdt in dat er een concentratieverschil van H^+ -ionen ontstaat tussen de binnenzijde en de buitenzijde van het membraan waarin de transportketen zich bevindt. In dit membraan zit ook het eiwit-complex *ATP-synthase*. Dit belangrijke eiwitcomplex gebruikt de H^+ -gradiënt om ATP te vormen uit $\text{ADP} + \text{P}_i$. Zoals waarschijnlijk bekend is ATP (adenine trifosfaat) een belangrijke drager van chemische energie in biologische cellen. De vorming van ATP uit ADP kost energie, en bij het verbreken van de fosfaat-binding komt deze energie weer vrij.

Andere belangrijke energiedragers zijn NADPH, NADH en FADH_2 . De vorming van deze verbindingen uit NADP^+ , NAD^+ en FAD kost energie, en heeft twee elektronen nodig. Als de waterstof-groepen later weer verwijderd worden levert dat twee elektronen op, die gebruikt kunnen worden om andere moleculen te reduceren. Deze verbindingen kun je dus beschouwen als dragers van redox-energie (of reductie-potentiaal).



Figuur 2.2 De belangrijke cellulaire energiedragers ATP (links), NAD^+ (midden) en NADP^+ (rechts).

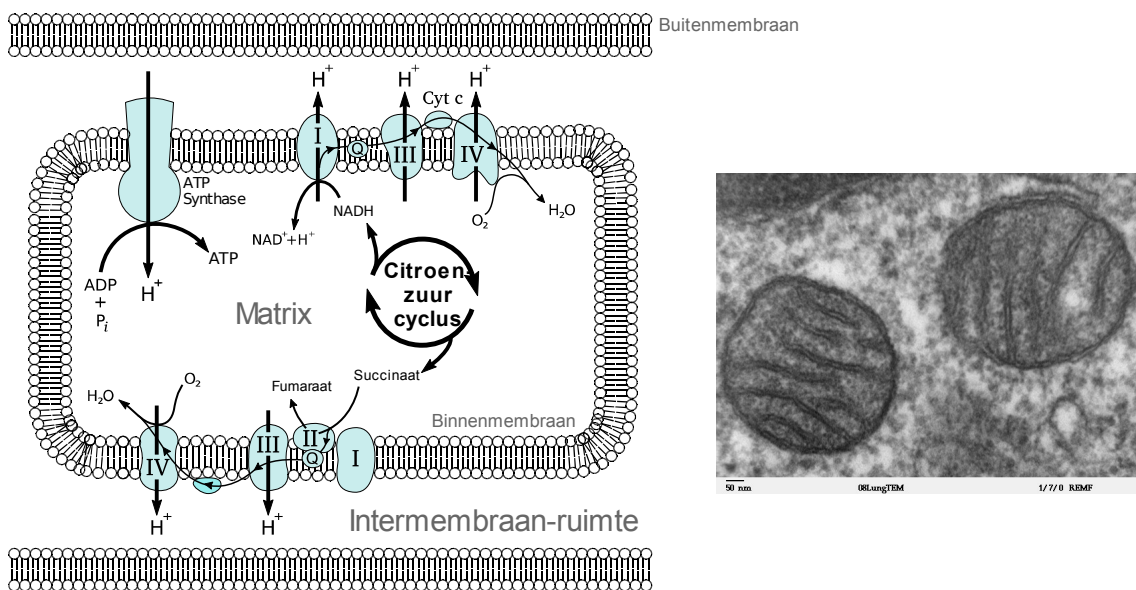
De proeven

Bij de volgende twee proeven gaan we in meer detail kijken naar de processen in chloroplasten en mitochondriën. Hiervoor zullen we de organellen isoleren uit plantencellen met behulp van centrifugatie. Vervolgens zullen we metingen verrichten aan de geïsoleerde organellen, onder verschillende omstandigheden. Van een van de twee proeven wordt ook een verslag geschreven.

Ademhaling

Theorie

In eukaryote cellen vindt ademhaling plaats in de mitochondriën. Deze organellen worden wel de energiecentrales van de cel genoemd. Ze nemen vetzuren en pyruvaat op uit het cytosol en oxideren deze in de mitochondriële matrix. De elektronen die hierbij vrijkomen worden overgedragen op NAD^+ of FAD . Oxidatie van NADH en FADH_2 gebeurt door een elektronen-transportketen (ademhalingsketen) in het binnenmembraan van de mitochondriën. Overdracht van elektronen vindt plaats in een aantal stappen, met behulp van drie grote enzymcomplexen en twee kleinere mobiele moleculen (de elektronen-transporters *ubiquinon* en *cytochroom c*). Uiteindelijk worden de elektronen aan het eind van de keten overgedragen op zuurstof, waarbij water wordt gevormd.



Figuur 2.3 Links een schematische voorstelling van de locatie van processen in een mitochondrion. Rechts een elektronenmicroscop-foto van mitochondriën uit longweefsel.

Elektronentransport van NADH naar O_2 gaat gepaard met transport van protonen naar de intermembraan-ruimte (de ruimte tussen de binnen- en de buitenmembraan van de mitochondriën). Zo ontstaat een elektrochemische H^+ -gradiënt (die leidt tot een membraanpotentiaal en een pH verschil) over de binnenmembraan. Deze gradiënt wordt door het eiwitcomplex ATP-synthase gebruikt als drijvende kracht voor de vorming van ATP. De energiedrager ATP wordt naar het cytosol getransporteerd, waar het wordt gebruikt voor tal van energievragende reacties.

Dit proces van *oxidatieve fosforylering* in de mitochondriën maken het mogelijk veel meer ATP per glucose te maken (ruim 30 ATP moleculen) dan het geval zou zijn als uitsluitend gisting (*glycolyse*) plaats zou vinden (wat 2 ATP moleculen oplevert).

Mitochondriën

Mitochondriën hebben twee membraansystemen (buiten- en binnenmembraan) en dus twee compartimenten (matrixruimte en intermembraan ruimte). De buitenmembraan bevat porines (passieve kanaal-eiwitten), waardoor moleculen van <5 kD kunnen passeren (ook kleine

eiwitten).

De binnenmembraan bevat geen porines, maar wel verschillende specifieke transporters. In de binnenmembraan bevinden zich ook de enzymen van de ademhalingsketen en het ATP-synthase complex dat verantwoordelijk is voor de oxidatieve fosforylering (ATP-synthese). In de matrixruimte bevinden zich de enzymen van de citroenzuur-cyclus.

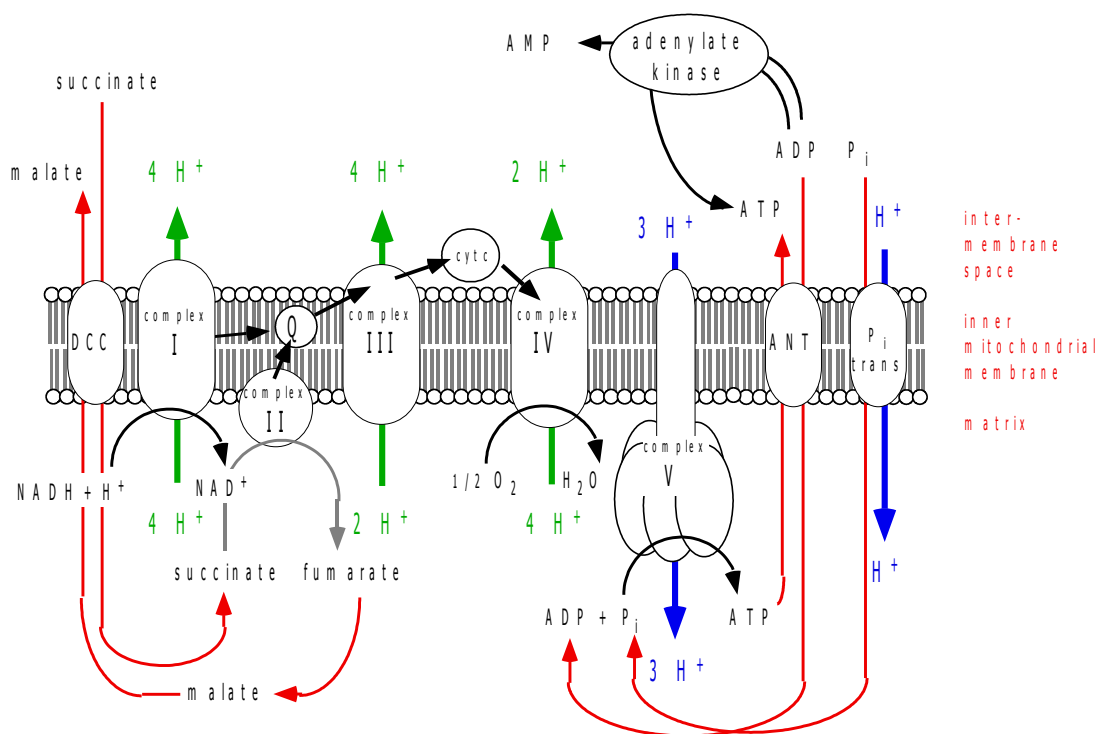
Als substraat importeren mitochondriën voornamelijk pyruvaat (in dierlijke cellen) of een combinatie van malaat en pyruvaat (in plantencellen). Mitochondriën kunnen in de cel van plaats en van vorm veranderen.

Glycolyse

Glycolyse is een afbraak-stap die vooraf gaat aan de ademhalingsketen. Tijdens glycolyse wordt een glucose-molecuul afgebroken tot 2 moleculen pyruvaat. In het begin van de route worden 2 moleculen ATP verbruikt, maar later worden er 4 moleculen ATP gevormd. De netto opbrengst is dus 2 moleculen ATP. Bovendien ontstaan er 2 moleculen NADH.

De ademhalingsketen in detail

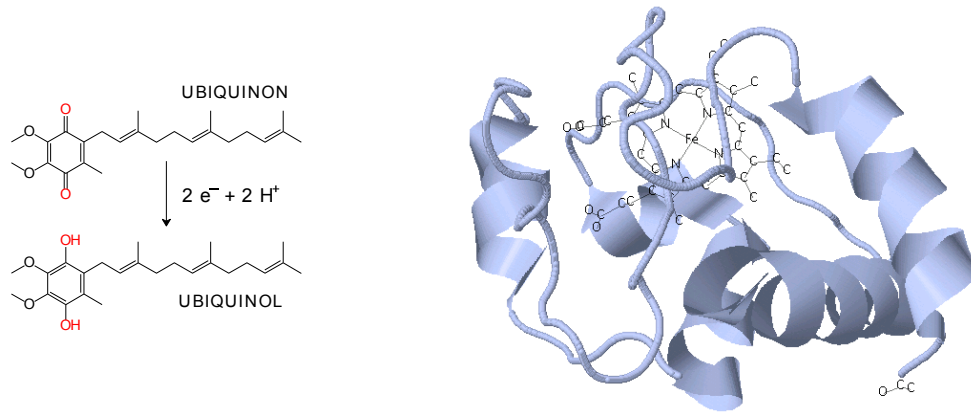
In de ademhalingsketen worden elektronen getransporteerd van NADH (of FADH₂) naar O₂ via drie grote enzym-complexen en twee kleinere redox-carriers.



Figuur 2.4 De belangrijkste processen en verbindingen in de ademhalingsketen. *Q* = ubiquinon/ubiquinol, *cyt c* = cytochroom c, *complex V* = ATP-synthase, *ANT* = adenine nucleotide translocase.

Het elektronentransport in de ademhalingsketen begint met het overdragen van twee elektronen

van NADH op *Complex I*, het *NADH dehydrogenase complex*. De oxidatie van twee moleculen NADH levert voldoende energie om H^+ -ionen uit de matrix naar de intermembraanruimte te transporteren, en om het transport-molecuul *ubiquinon* (Q) te reduceren tot *ubiquinol*.



Figuur 2.5 De elektrontransport-moleculen in de ademhalingsketen. Links ubiquinon en ubiquinol. Rechts het eiwit cytochroom c, met in het midden de ijzenhoudende heem c-groep.

Ubiquinol wordt weer geoxideerd tot ubiquinon door *Complex III* (*coenzym Q-cytochroom c oxidoreductase*). Hierbij komen de twee H^+ -ionen van ubiquinol vrij in de intermembraanruimte, en worden extra H^+ -ionen uit de matrix getransporteerd naar de intermembraanruimte. *Complex III* reduceert een Fe^{3+} -atoom in de heem-groep van twee cytochroom c eiwitten tot Fe^{2+} . Uiteindelijk wordt de Fe^{2+} -groep van cytochroom c weer geoxideerd door *Complex IV* (*cytochroom c oxidase*). Hierbij worden de elektronen van vier cytochroom c moleculen overgedragen op zuurstof, waarbij water wordt gevormd. Ook worden weer H^+ -ionen uit de matrix getransporteerd naar de intermembraanruimte.

Het verschil in redoxpotentiaal tussen de drie complexen levert de energie voor de uitstoot van H^+ . Als de H^+ -gradiënt te groot wordt, dan zal deze de elektronenstroom in de ademhalingsketen tegen gaan werken (ademhalingscontrole).

De hoge concentratie protonen (H^+) in de intermembraanruimte ten opzichte van de matrix zorgt voor zowel een pH-gradiënt als een ladings-gradiënt (membraanpotentiaal). Samen vormen ze de elektrochemische protonengradiën over de binnenmembraan, die de energie levert voor de vorming van ATP, gekatalyseerd door *Complex V*, het enzym ATP-synthase. Mitochondriën moeten wel eerst ADP en P_i importeren.

Ontkoppeling

Ontkoppelaars (H^+ -ionoforen) zijn moleculen die H^+ -ionen (protonen) door de membraan kunnen loodsen. Toevoeging van een H^+ -ionofoor (= protonofoor) zal de permeabiliteit van een membraan voor protonen dus sterk verhogen. In aanwezigheid van een protonofoor is elektrontransport (dus ook O_2 -verbruik) nog steeds mogelijk. Maar omdat geen protongradiënt kan worden opgebouwd kan geen ATP worden gevormd. Elektrontransport en ATP-synthese zijn “ontkoppeld”.

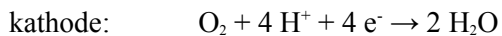
Over de proef

In deze proef wordt de ademhalingsketen bestudeerd met geïsoleerde mitochondriën uit aardappelen. Het meten van de ademhaling gebeurt aan de hand van het zuurstofgehalte van het medium waarin de mitochondriën zijn opgelost. De gebruikte meetopstelling wordt een oxygraaf genoemd. Het effect van remmers en ontkoppelaars wordt bestudeerd.

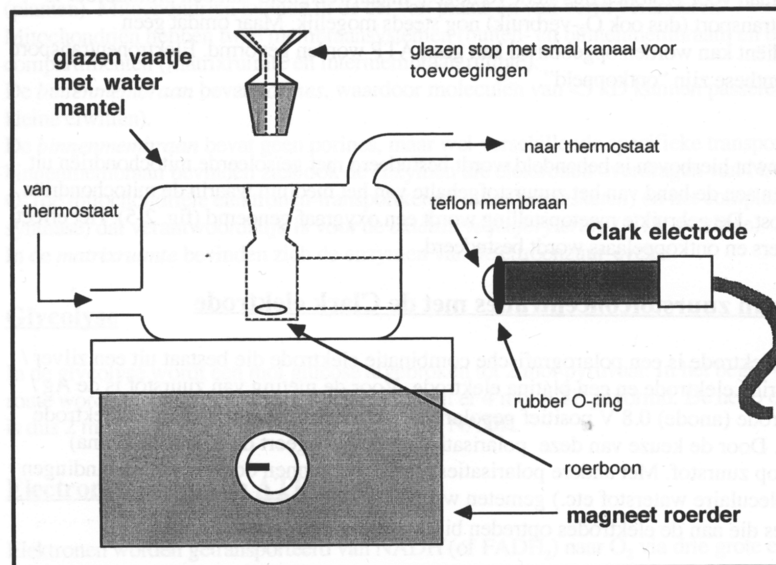
Meting van zuurstofconcentraties met de Clark elektrode

De Clark elektrode is een polarografische combinatie-elektrode die bestaat uit een zilver / zilverchloride elektrode en een platina elektrode. Voor de meting van zuurstof is de Ag / Ag^+ elektrode (anode) 0.8 V positief gepolariseerd ten opzichte van de platina elektrode (kathode). Door de keuze van deze polarisatiespanning reageert de elektrode (bijna) specifiek op zuurstof. Met andere polarisatiespanningen kunnen ook andere verbindingen (N_2O , moleculaire waterstof etc.) gemeten worden.

De reacties die aan de elektrodes optreden bij de meting van zuurstof zijn:



Door de kathode-reactie wordt de zuurstof in de directe omgeving van de kathode verbruikt; de zuurstof wordt aangevuld door diffusie.



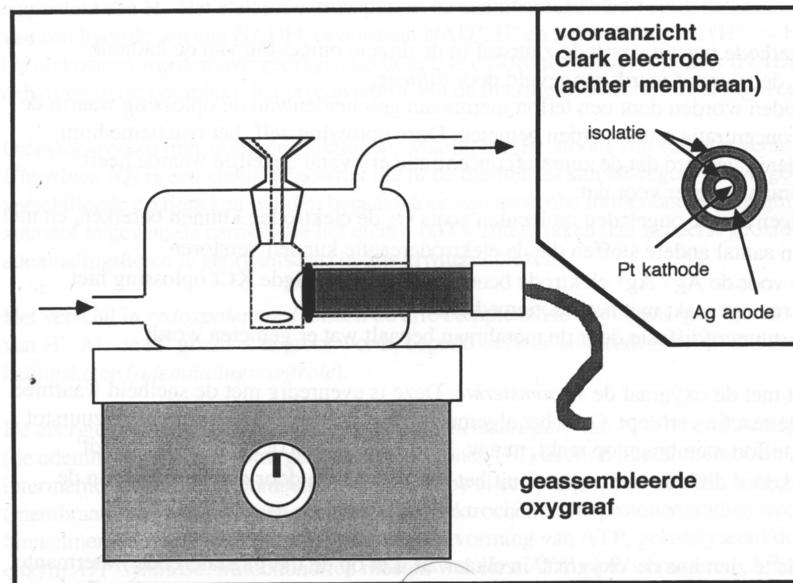
Figuur 2.6 Opbouw van de oxygraaf. Let op de thermostaterende watermantel en de magneet-roerder.

De elektroden worden door een teflon membraan gescheiden van de oplossing waarin de zuurstof concentratie moet worden gemeten. Deze oplossing, het reactiemedium, wordt zodanig geroerd dat de zuurstofconcentratie er overal dezelfde waarde heeft.

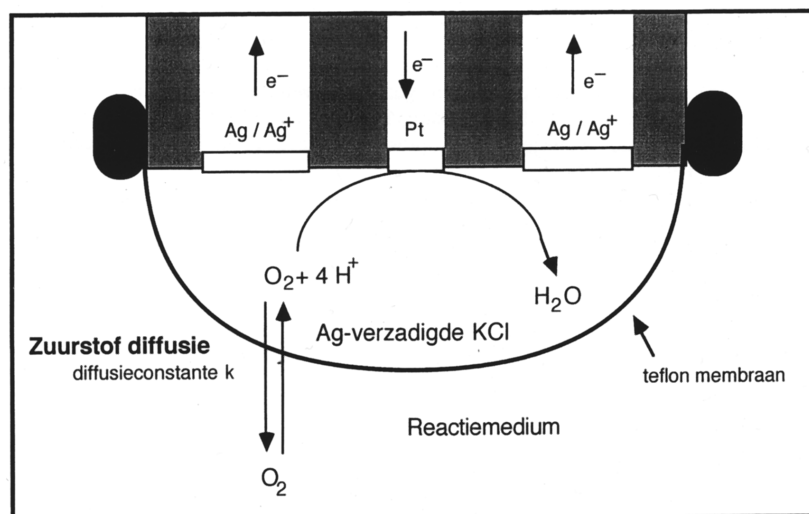
De membraan zorgt er voor dat:

1. Alleen kleine ongeladen moleculen zoals O_2 de elektroden kunnen bereiken, en niet een aantal andere stoffen die de elektrode-reactie kunnen verstoren.
2. De voor de Ag / Ag^+ elektrode benodigde Ag -verzadigde KCl oplossing niet vermengt raakt met het reactiemedium.
3. De zuurstofdiffusie door de membraan bepaalt wat er gemeten wordt.

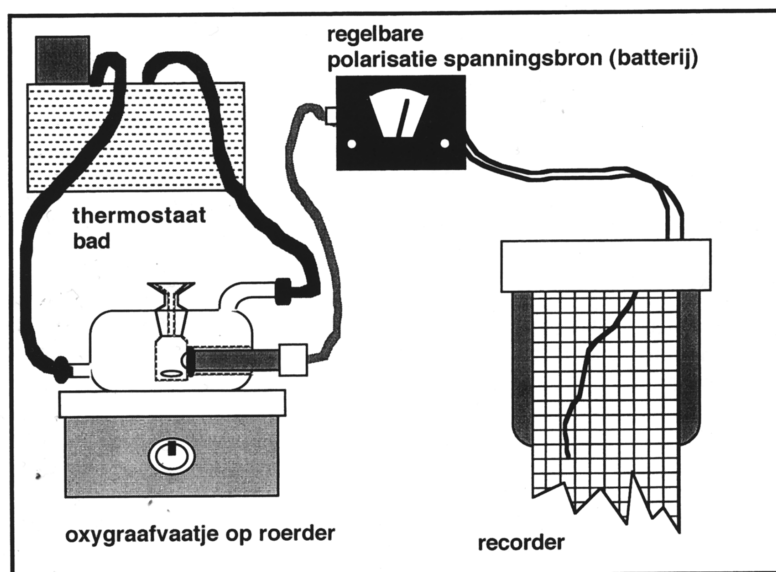
Men meet met de oxygraaf de stroomsterkte. Deze is evenredig met de snelheid waarmee de kathode-reactie verloopt. Over het algemeen zorgt deze reactie ervoor dat de zuurstof achter de teflon membraan op raakt, met andere woorden $[O_2]_{\text{elektrode}} \rightarrow 0$. De zuurstof wordt aangevuld door diffusie van zuurstof uit het reactiemedium door de membraan, naar de elektrode.



Figuur 2.7 De oxygraaf in geassembleerde vorm. De inzet toont het vooraanzicht van de Clark-electrode; de zilver anode zit als een ring om de platina kathode heen, om een zo groot mogelijk oppervlak te krijgen.



Figuur 2.8 Een close-up van de elektrode waar de kathodereactie en de zuurstof diffusie zich afspelen.



Figuur 2.9 Een complete oxygraaf-opstelling.

Oxygraaf metingen

De voor de proeven benodigde oplossingen worden gedeeltelijk door de assistenten gemaakt. (De samenstelling van de gebruikte oplossingen staat vermeld op de laatste pagina van de Ademhalingsproef). Houd de buisjes met de oplossingen steeds koud. Bedenk dat een aantal van de remstoffen **ZEER GIFTIG** is.

Het is verstandig om het reactiemedium tijdens de proef bij kamertemperatuur te bewaren, zodat het opwarmen in het elektrodevaatje niet te lang duurt. Het thermostaatbad wordt op 25 °C ingesteld. Let erop dat het vaatje geheel gevuld en goed afgesloten is, dat de roerboon goed draait en vooral dat er géén luchtbelletjes in zitten. Voor het berekenen van de toe te voegen hoeveelheden substraten en remmers moet het vatvolume bepaald worden. Toevoegingen tijdens de proef worden bij voorkeur gedaan m.b.v. microliter spuit, door het kanaal in het stopje. Tussentijds verwijderen van het stopje leidt meestal tot problemen met luchtballen.

De zuurstof-elektrode wordt geijkt door:

- Het elektrodesignaal te bepalen dat na enige tijd equilibreren gemeten wordt in puur reactiemedium bij 25 °C. Dit komt overeen met een zuurstofconcentratie van 250 μM .
- Het electrodesignaal te bepalen dat gemeten wordt na het toevoegen van enkele korrels vast dithioniet (een sterke reductor). Dit komt overeen met een zuurstofconcentratie van 0 μM .

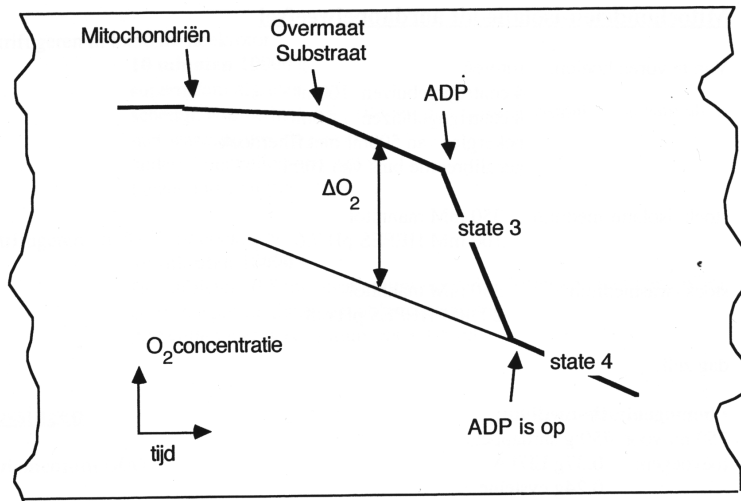
Het verschil tussen de beide niveaus komt dan overeen met $250 \times (\text{vatvolume in ml}) \text{ nmol O}_2$. Uit de hellingen van de recorder-traces kunnen dan ademhalingsnelheden worden berekend, uitgedrukt in $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{ml mitochondriën suspensie})^{-1}$.

Energieconservering

Met mitochondriën bereid uit verse aardappels zijn enkele proeven te doen die het energieconserverende karakter van de mitochondriële ademhaling illustreren. Op de in figuur 2.10 aangegeven wijze kunnen voor de verschillende substraten de P/O waarde (een aanwijzing voor het aantal fosforyleringsplaatsen dat een rol speelt bij de verademing van het betreffende substraat) en de ademhalingscontrole bepaald worden. De ademhalingscontrole is in principe een empirische maat voor de intactheid van het mitochondrion.

Eveneens kan aan een mitochondriënpreparaat van verse aardappels de invloed van remmers als

KCN en antimycine, en van de ontkoppelaar FCCP bestudeerd worden. Stel in overleg met de assistent hiervoor een proefschema op.



$$\text{ademhalingscontrole} = \frac{\text{snelheid state 3}}{\text{snelheid state 4}}$$

$$\frac{P}{O} = \frac{\text{hoeveelheid toegevoegd ATP}}{2 \times \Delta O_2}$$

Figuur 2.10 Een plot van de zuurstof-concentratie over de tijd.

Handleiding

Mitochondrien-isolatie uit aardappelweefsel

Van te voren koelen:

- roteren
- 4 centrifugebuizen van 100ml
- 8 centrifugebuizen van 50ml
- bekersglas van 500ml met filterdoek
- gecalibreerde buis van 10ml
- stock isolatie-medium: 350 mM mannitol, 100 mM HEPES pH 7.6
- stock wasmedium: 350 mM mannitol, 20 mM HEPES pH 6.8

Deze oplossingen moeten op de dag zelf worden bereid:

- **homogenisatie-medium:**
250 ml voor 450 g aardappels
toevoegen:
 - 0.37g EDTA
 - 0.24g cysteïne
 - 1.0g BSA **erop strooien en erin laten zakken!**medium op ijs zetten
- **was-medium:**
100 ml voor 450 g aardappelen
toevoegen: 0.1 g BSA **erop strooien en erin laten zakken!**

Vervolgens moeten de aardappels geprepareerd worden:

- Was de aardappels, snij ze in dikke plakken (kapjes weggooien) en snij alles buiten de vaatbundelring eraf (alleen parenchym over) tot 450 g.
- Zet een koud bekglas met filterdoek onder de sapcentrifuge.
- Zet de sapcentrifuge aan, voeg wat homogenisatiemedium toe, druk een paar stukken aardappel erdoor, voeg weer wat medium toe, dan weer wat aardappel, enzovoort tot aardappels en medium op zijn.
- Controleer de pH met pH-papier controleren. Deze mag niet lager zijn dan 6.8.
- Verdeel het sap over 4 buizen van 100 ml.
- Tarreer de buizen.

Als laatste worden de mitochondrieën geïsoleerd door middel van een aantal centrifugatiestappen:

- Centrifugeer in een 4 × 100 ml swing-out rotor, **5 minuten** bij een RCF van **1700 g**.
- Giet het supernatant over in buizen van 50 ml.
- Tarreer de buizen (met dop).
- Centrifugeer in een 8 × 50 ml hoekrotor, **10 minuten** bij een RCF van **10000 g**.
- Giet het supernatant af.
- Maak de pellets los met een penseel, en verzamel ze in één buis.
- Spoel de buizen na met wasmedium, en voeg dit toe aan de buis met de pellets. Vul aan met wasmedium.
- Vul een tweede buis met water. Tarreer de buizen (met dop).

- Centrifugeer in een 8 × 50 ml hoekrotor, **10 minuten** bij een RCF van **10000 g**.
- Giet het supernatant af.
- Doe een scheutje wasmedium bij de pellet, maak de pellet los met een penseel, vul de buis aan met wasmedium.
- Vul een tweede buis met water. Tarreer de buizen (met dop).
- Centrifugeer in een 8 × 50 ml hoekrotor, **10 minuten** bij een RCF van **10000 g**.
- Giet het supernatant af.
- Voeg 0.5 ml wasmedium toe aan de pellet, en maak de pellet los met een penseel.
- Breng de suspensie over in een glazen gekalibreerde buis
- Vul aan met wasmedium tot ± 1.5 ml.

Gebruikte oplossingen

Reactiemedium (RM)

350 mM mannitol
 20 mM HEPES
 5 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 2 mM NaPi (uit de stockoplossing)
 0.1% BSA (**vers toevoegen!**)
 pH 6.8

substraten	succinaat	1 M
activator SDH	ATP	100 mM
fosforylatie	ADP	100 mM
ontkoppelaar	S13	200 μM (in ethanol)
remstoffen fosforylatie (complex V ATP-synthase)	oligomycine	100 μM (in ethanol)
remstoffen cytochroomroute	KCN	10 mM (complex IV, cyt.c oxidase)
	antimycine	1 mg/ml (complex III, cyt. bc1)
hoeveelheden:	RM + mitochondriën	2 ml (1.95 ml RM, 50 μl mt)
	ATP	4 μl
	succinaat	20 μl
	ADP	2-4 μl
	S13	4 μl
	oligomycine	6 μl
	KCN	20 μl
	antimycine	3 μl

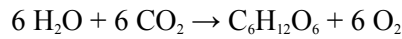
Referenties

Voet, Voet en Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd edition, Chapter 17

Fotosynthese

Achtergrond en theorie

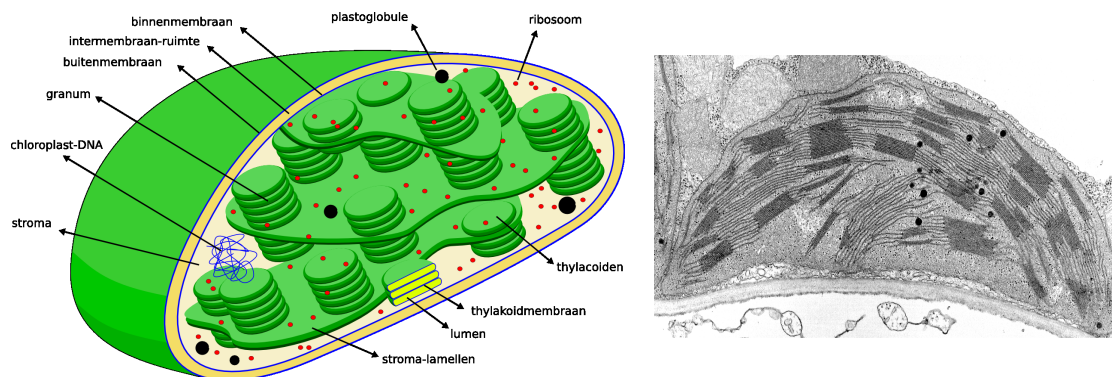
De netto-reactie van fotosynthese wordt vaak gegeven als:



In het echt bestaat fotosynthese echter uit twee processen. De eerste stap in fotosynthese is een licht-afhankelijke reactieketen waarbij water geoxideerd (gesplitst) wordt en waarbij de energiedragers ATP en NADPH gevormd worden. De tweede stap is een licht-onafhankelijke reactie (de *Calvin-cyclus*), waarbij de energie uit ATP en NADPH gebruikt wordt om suikers te vormen uit CO_2 . In deze proef bestuderen we de elektrontransport-keten van de licht-afhankelijke reactie.

Chloroplasten

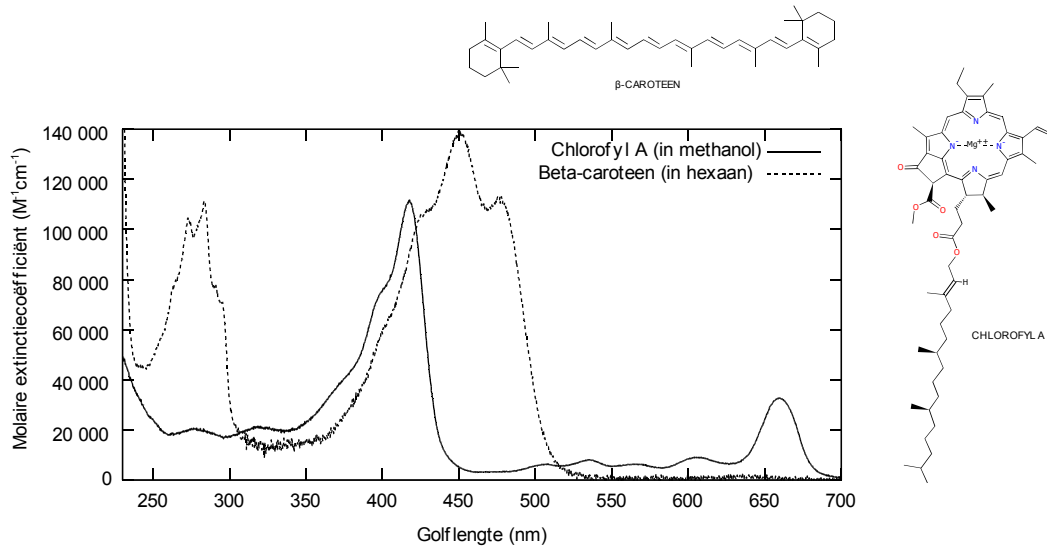
In hogere planten en algen vindt fotosynthese plaats in de *chloroplasten*. Een chloroplast heeft een dubbel buitenmembraan, de *enveloppe*. In de chloroplasten bevindt zich nog een derde membraanstructuur, de *thylakoïd-membraan*. Dit membraan is sterk gevouwen, en vormt daardoor structuren die eruit zien als “stapeltjes” (*grana*) verbonden door “buisjes” (*grana-lamellen*). De ruimte tussen de thylakoïd-membraan en de binnenmembraan van de enveloppe wordt het *stroma* genoemd. De ruimte binnen de thylakoïd-membraan heet het *lumen*. In het thylakoïd-membraan bevinden zich de eiwitcomplexen van de elektrontransport-keten. In het stroma vinden de reacties van de Calvin-cyclus plaats.



Figuur 2.11 Schematische voorstelling en een foto van een chloroplast.

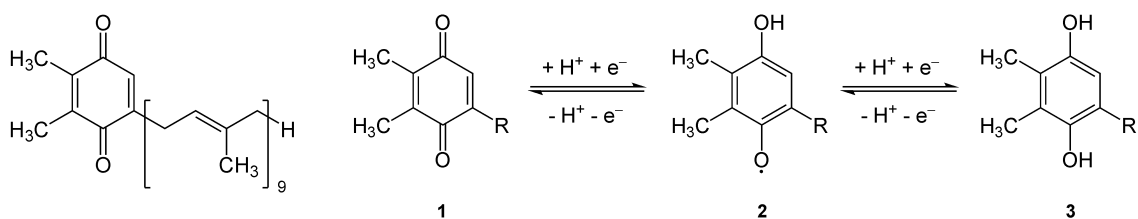
De elektrontransport-keten

Het eerste eiwit-complex dat belangrijk is in de lichtreactie van fotosynthese is *Fotosysteem II* (ook wel *PS680* genoemd, aangezien het een extinctiepiek heeft bij 680 nm). Het fotosysteem is een dimeer en bevat een tweetal *antenne-complexen*. Deze antenne-complexen bevatten een aantal chlorofyl-moleculen, met in het midden een speciaal chlorofyl-molecuul, het *reactiecentrum*.



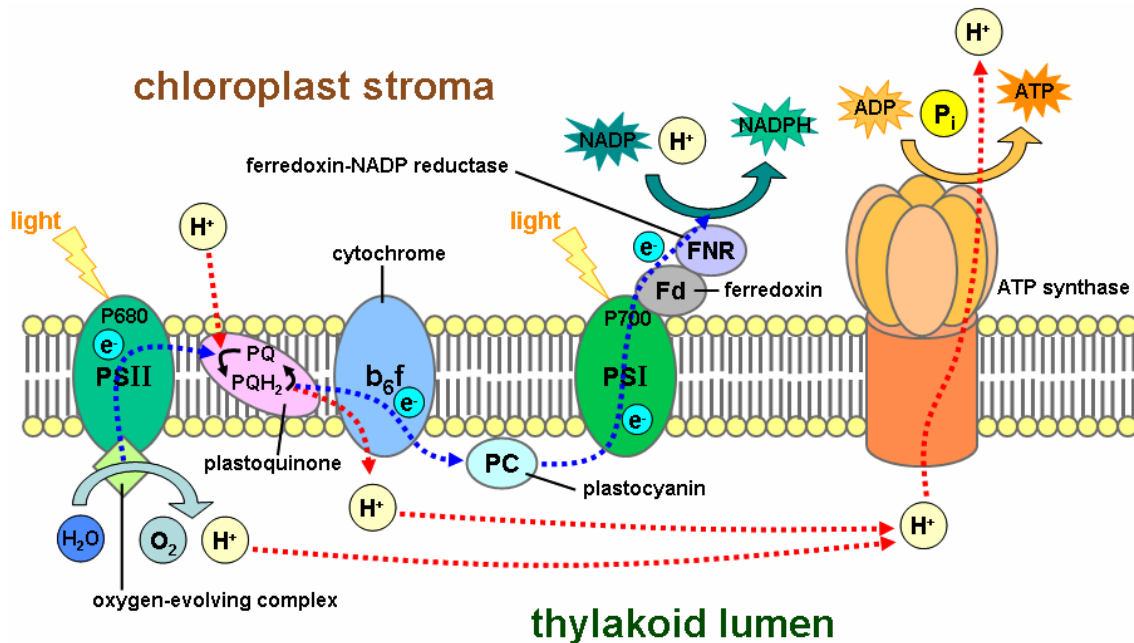
Figuur 2.12 Absorptie-spectra van chlorofyl a en beta-caroteen, twee belangrijke pigmenten die voorkomen in fotosystemen, en die in staat zijn fotonen van zichtbaar licht te absorberen. Bij absorptie van een foton wordt een elektron aangeslagen. Dergelijke aangeslagen elektronen leveren vervolgens de energie aan de fotosystemen om een keten van redox-reacties in gang te zetten.

Als een foton van de juiste golflengte een van de chlorofyl-moleculen in het antenne-complex raakt, wordt het foton geabsorbeerd. Hierdoor raakt een elektron in een aangeslagen toestand. Aangezien de chlorofyl-moleculen zo dicht bij elkaar zitten, kan het aangeslagen elektron min of meer “doorgegeven” worden aan het reactiecentrum (het proces dat dat daarvoor zorgt heet *kwantumresonantie*). Normaal zou een aangeslagen elektron vrij snel terugvallen naar de grondtoestand, waarbij warmte en eventueel licht (fluorescentie) vrij zou komen. De structuur van het fotosysteem zorgt er echter voor dat de energie van het aangeslagen elektron wordt gebruikt om een transport-molecuul te reduceren. Na het absorberen van twee fotonen door PS680 krijgt dit molecuul (*plastoquinon*, PQ) twee elektronen van het fotosysteem. Plastoquinon neemt ook twee H^+ -ionen op uit het stroma, en wordt plastoquinol (PQH_2).



Figuur 2.13 Links de structuur van plastoquinon (PQ), en rechts de reductie van plastoquinon tot plastoquinol (en vice versa) door het doneren van twee elektronen, en de opname van twee H^+ -ionen.

Het fotosysteem komt nu twee elektronen tekort. In deze toestand verandert PS680 in de sterkste natuurlijke oxidator die we kennen, en is het in staat elektronen te onttrekken aan twee watermoleculen uit het lumen. Hierbij wordt zuurstofgas gevormd, dat uiteindelijk verdwijnt in de atmosfeer, en vier H^+ -ionen die in het lumen blijven.



Figuur 2.14 Een schematische weergave van de onderdelen van de elektronentransport-keten in het thylakoïd-membraan van een chloroplast.

Plastoquinol diffundeert in het thylakoïd-membraan, totdat het bindt aan een *cytochrom-*b₆f**-complex. Dit eiwitcomplex (ook wel *PC-PQ-reductase* genoemd) draagt de twee elektronen van plastoquinol over op een koperhoudend transport-eiwit in het lumen, *plastocyanine* (PC). Hierbij wordt plastoquinol weer geoxideerd tot plastoquinon, en worden de twee H⁺-ionen afgegeven aan het lumen. Plastocyanine vervoert de elektronen naar een tweede fotosysteem, dat verwarrend genoeg *Fotosysteem I* wordt genoemd, of *PS700*.

Na absorptie van twee fotonen door de antenne-complexen van PS700 wordt een molecuul plastocyanine geoxideerd, en een molecuul ferredoxine gereduceerd. De geabsorbeerde fotonen leveren extra energie, in de vorm van aangeslagen elektronen. Deze extra energie is nodig omdat het doneren van twee elektronen aan ferredoxine meer energie kost dan wat vrijkomt bij het onttrekken van twee elektronen aan plastocyanine. Het fotosysteem zorgt dus voor een extra verhoging van de redox-potentiaal met behulp van licht. Uiteindelijk draagt ferredoxine zijn elektronen over op het enzym ferredoxine-NADPH-reductase. Dit enzym gebruikt de elektronen om twee moleculen NADP⁺ te reduceren tot NADPH. Hierbij worden twee H⁺-ionen gebruikt uit het stroma. De gevormde NADPH speelt vervolgens een rol als elektron-donor in de Calvin-cyclus.

De H⁺-gradiënt en ATP-synthese

Bij het transporteren van twee elektronen door de transport-keten van de lichtreactie worden vier H⁺-ionen afgegeven aan het lumen, en vier H⁺-ionen onttrokken aan het stroma. Hierdoor ontstaat een ladings- en pH-verschil tussen het lumen en het stroma. Dit *elektrochemisch potentiaalverschil* over het thylakoïd-membraan kan gebruikt worden door het eiwit-complex ATP-synthase. De pH in het lumen kan dalen tot ongeveer 4, en het stroma heeft een pH rond 7-8. ATP-synthase transporteert H⁺-ionen uit het lumen naar het stroma, en vormt daarbij ATP, dat gebruikt wordt in onder meer de Calvin-cyclus. De H⁺-gradiënt die wordt gevormd door de elektronentransport-keten fungeert dus als een energierijke tussentoestand voor de vorming van ATP. Als de H⁺-ionen uit het lumen niet afgevoerd zouden worden door ATP-synthase zou de elektronentransport-keten vrij snel stil komen te liggen, omdat er bij een sterke gradiënt geen H⁺-ionen meer afgegeven kunnen worden aan het lumen.

Remmers en ontkoppelaars

Er zijn verschillende soorten stoffen die de lichtreactie kunnen verstoren. Een competitieve remmer zoals DCMU (als herbicide verkocht onder de merknaam Diuron) concurreert met plastoquinon om de bindingssite van PS680. Een overmaat DCMU zal dus plastoquinon wegconcurreren, en alle door PS680 geproduceerde elektronen afvangen.

Ontkoppelaars zijn stoffen die elektronenoverdracht ontkoppelen van ATP-synthese, door H⁺-ionen te transporteren over het thylakoid-membraan. Hierdoor wordt de H⁺-gradiënt geneutraliseerd, zodat ATP-synthase geen ATP meer kan vormen.

Over de proef

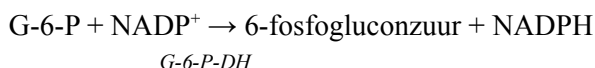
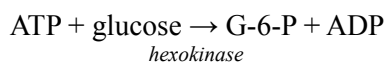
In deze proef gaan we de snelheid van elektronentransport in de lichtreactie meten, onder verschillende omstandigheden. We gebruiken hiervoor chloroplasten die we isoleren uit spinazie-bladeren, en die we vervolgens een bepaalde tijd blootstellen aan licht in een lichtbak.

De isolatie van chloroplasten gebeurt door de bladeren te ontdoen van nerven en stelen, en te vermalen in een blender met een laag-osmotische buffer erbij. De chloroplasten worden vervolgens geïsoleerd met behulp van centrifugatie. Echter, bij deze isolatie treedt ernstige verdunning op van onder meer NADP⁺ en ferredoxine. Om het elektronentransport toch te kunnen laten verlopen voegen we een kunstmatige elektronenacceptor toe, *kalium ferricyanide*. Het ferricyanide-ion (Fe(CN)₆³⁻) is geel in oplossing, en wordt bij acceptatie van een elektron gereduceerd tot het kleurloze ferrocyanide (Fe(CN)₆⁴⁻).

Aangezien ferricyanide in oplossing een absorptiepiek heeft bij 420 nm, kunnen we de mate van elektronenoverdracht meten met een spectrofotometer, als een afname van de extinctie bij 420 nm.

ATP-meting

Naast de mate van elektronen-overdracht bepalen we ook de concentratie ATP die wordt gevormd door ATP-synthase. De concentratie ATP wordt enzymatisch bepaald, met behulp van de enzymen hexokinase en glucose-6-fosfaat-dehydrogenase (G-6-P-DH). Hiervoor gebruiken we de volgende reacties:



NADPH heeft een absorptiepiek in het UV bij 340 nm, en de concentratie ervan is dus ook te meten met een spectrofotometer.

Chlorofyl-gehalte

Uiteraard hangt de snelheid van elektronenoverdracht per volume-eenheid sterk af van de concentratie chloroplasten die je hebt geïsoleerd. Om te resultaten te kunnen vergelijken tussen verschillende groepen (en met andere experimenten), wordt de elektronenoverdracht en de snelheid van ATP-synthese uitgedrukt per hoeveelheid chlorofyl. Chlorofyl a en in mindere mate chlorofyl b zijn de meest voorkomende pigmenten in chloroplasten. De concentratie chlorofyl geeft dus een goede indicatie van de hoeveelheid chloroplasten in je monster.

Het chlorofylgehalte wordt gemeten door chlorofyl te extraheren met 80% aceton, en na filteren de extinctie te meten bij 652 nm. Chlorofyl a heeft een absorptiepiek bij 663 nm, en chlorofyl b bij 645 nm. We meten hier bij de golflengte waar beide typen even sterk absorberen, 652 nm. Het chlorofyl-gehalte wordt vervolgens uitgedrukt in mg chlorofyl per ml oplossing.

Varianten

In overleg met de practicum-assistent bij welke verschillende omstandigheden je de elektronen-overdracht en eventueel de ATP-vorming wilt meten. Ter controle moet dit in ieder geval gebeuren in aanwezigheid en afwezigheid van licht. Daarnaast kun je meten in aanwezigheid van een remmer (DCMU) en/of een ontkoppelaar. Ook variatie van de belichtingstijd en het gebruik van verschillende intensiteiten en kleuren licht behoort tot de mogelijkheden. Alle metingen worden in principe in duplo gedaan. Zorg bij het ontwerpen van je experiment dat je niet meer dan 32 buizen hebt per groep.

Handleiding

Isolatie van chloroplasten

Let op, om degradatie van chloroplasten te voorkomen moet de isolatie zoveel mogelijk op ijs gebeuren, en moeten de preparaten koud en donker worden bewaard! De isolatie wordt door 2 groepjes samen gedaan, waarna de chloroplast-suspensie over beide groepen wordt verdeeld.

- Verwijder de stelen en middenerven van stevige, groene en ongekneusde spinazieblaadjes (ongeveer 150 g).
- Was de blaadjes met koud demiwater (met een handje scherfijns). Laat de blaadjes uitlekken in een vergiet.
- Breng de blaadjes in de voorgekoelde beker van de blender, en voeg 100 ml koud isolatiemedium toe. Homogeniseer op maximaal toerental tot het mengsel "klotst" (ca. 10-20 seconden).
- Filtreer de brij door 4 lagen fijnmazig Perlon-gaas (uitknippen boven een trechter). Verdeel het filtraat over twee plastic 100 ml centrifugebuizen. Hou de buizen zo veel mogelijk op ijs!
- Tarreer de buizen (met filtraat of met isolatiemedium) en centrifugeer 3 minuten bij 4000 rpm (een RCF van ongeveer 3000 g) in een gekoelde centrifuge ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).
- Schenk het supernatant af en maak de pellets los in 1 ml isolatiemedium met behulp van een penseel. Zuid de suspensie daarna nog één of tweemaal in een pipet op, om te homogeniseren. Het totale volume van de geresuspendeerde pelletfractie (beide centrifugebuizen samen) moet ongeveer 4 ml zijn.
- Verdeel de suspensie over de 2 groepen, en bewaar deze in de koelkast in reageerbuizen omwikkeld met aluminiumfolie, en voorzien van je naam.

Bepaling van chlorofyl-gehalte

- Pipetteer 50 μl chloroplast-suspensie in een 10 ml reageerbuis. Vul de buis aan tot 10 ml met 80% aceton.
- Zorg dat de oplossing goed geschud is met parafilm, en laat de buis daarna 3 minuten staan.
- Filtreer de oplossing over een papierfilter.
- Verdeel de oplossing over drie glascuvetten van 3 ml. We gebruiken (dure!) glascuvetten, want plastic wegwerpcuvetten lossen op in aceton.

- Meet de extinctie bij 652 nm.
- Giet de aceton-oplossingen in het daarvoor bestemde afvalvat. Spoel de glascuvetten na met aceton, en daarna met demiwater. Zet de cuvetten omgekeerd terug in het rekje, zodat ze kunnen drogen.
- Het chlorofylgehalte ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in het isolatiemedium wordt nu gegeven door $A_{652} \times 5.55$. In deze factor is al rekening gehouden met de extinctiecoëfficiënten van chlorofyl a en b, de verdunningen en het molecuulgewicht.

De lichtreactie

We incuberen een aantal reageerbuizen in een verlichte bak. Bij het maken van de oplossingen moet weer koud en donker gewerkt worden. Dit is extra van belang nadat de elektron-acceptor ferricyanide is toegevoegd aan de oplossingen. In aanwezigheid van ferricyanide kan immers de elektronen-overdracht plaatsvinden, en moet dus niet alleen donker maar ook snel gewerkt worden. De reactie wordt gestopt door toevoeging van een sterk zuur, HClO_4 .

- Stel voordat je begint een pipetteerschema op voor de experimenten die je uit wilt voeren. Bedenk van tevoren hoe je het handigst te werk kunt gaan (in welke volgorde je handelingen uit moet voeren, met welke materialen, etc.).
- Om 40 ml reactiemedium te maken heb je nodig:
 - 30 ml incubatiemedium
 - 2.4 ml ferricyanide-oplossing (20 mM)
 - chloroplast-suspensie, zodat je ongeveer 1.2 mg chlorofyl hebt in 40 ml (of 0.3 mg per 10 ml)
 - indien je een ATP-bepaling gaat doen, 1.6 ml ADP (30 mM)
 - vul de oplossing aan tot 40 ml met incubatiemedium
- Je hebt 3 ml reactiemedium nodig per buis, dus als je meer dan 12-13 reageerbuizen nodig hebt voor je experiment dan moet je meer dan 40 ml oplossing maken.
- Na het maken van het reactiemedium moet je snel de reageerbuizen vullen. Een eenvoudig pipetteer-schema voor de reageerbuizen zou er bijvoorbeeld zo uit kunnen zien:

Buis	1	2	3	4	5	6	7	8
donker (buis in folie)	+	+	-	-	-	-	-	-
3 ml reactiemedium	+	+	+	+	+	+	+	+
10 μl ontkoppelaar	-	-	-	-	+	+	-	-
10 μl remmer (DCMU)	-	-	-	-	-	-	+	+

- Zorg dat je de buizen goed mengt (vortexen) na het toevoegen van stoffen zoals remmer of ontkoppelaar. Test voordat je gaat pipetteren ook of de donkere buizen met aluminiumfolie wel in de lichtbak passen.
- Als alle buizen gevuld zijn kun je ze in de lichtbak zetten en belichten (minimaal 3

minuten). Zorg uiteraard dat je de belichtingstijd bijhoudt en dat alle buizen ongeveer even lang belicht worden (tenzij je expres de belichtingstijd varieert).

- Om de lichtreactie te stoppen haal je de buizen uit de belichtingsbak en zet je ze op ijs. Hierna voeg je snel aan alle buizen 0.3 ml HClO_4 toe. Even vortexen, en neutraliseer vervolgens de oplossingen met 0.3 ml KOH. Daarna weer even vortexen, als het goed is slaan zuur en base nu samen neer. Pas op met HClO_4 en KOH, het zijn sterke zuren en basen in een hoge concentratie.

Bepaling elektronenoverdracht

- Centrifugeer de reageerbuizen 7 minuten in een tafelcentrifuge op maximale snelheid.
- Giet voorzichtig de supernatanten over in plastic cuvetten. Zorg dat er geen pellet meekomt.
- Check voor het meten of er geen condensvorming ontstaat op de cuvetten. Bij condensvorming moet je even wachten tot de oplossing in de cuvetten enigszins opgewarmd is, anders krijg je zeer eigenaardige meetresultaten.
- Meet de extinctie van ferricyanide in de cuvetten bij 420 nm. Gebruik incubatiemedium als referentie.
- Bewaar de cuvetten als je de concentratie ATP gaat bepalen.

ATP-bepaling

- Pipetteer 0.5 ml uit de cuvetten in een schone cuvet.
- Voeg 2.5 ml ATP-meetmedium toe, en meng met parafilm.
- Meet de extinctie van NADPH in de cuvetten bij 340 nm.
- Voeg 5 μl enzymesuspensie toe (hexokinase / G-6-P-DH). Meng met parafilm en laat minimaal 5 minuten reageren.
- Meet nogmaals de extinctie van NADPH in de cuvetten bij 340 nm.

Uitwerking

- Bereken voor iedere duplo de snelheid van elektronenoverdracht tijdens de lichtreactie (in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), per milligram chlorofyl.
- Indien je een op- of aflopende reeks hebt gemeten (belichtingstijd, lichtintensiteit), maak een grafiek van de meting.
- Trek conclusies op basis van je resultaten.

Rekentips

Rekentips elektronenoverdracht:

- Als extinctie-waarden gebruik je het gemiddelde van beide duplo's.
- Reken de extinctie-waardes om naar concentraties ferricyanide (FIC), mbv. de Wet van Lambert-Beer. De millimolaire extinctiecoëfficiënt (ϵ) van FIC bij 420 nm is $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- De concentratie FIC in de buizen is verdund door toevoeging van 0.3 ml KOH en 0.3 ml HClO₄ aan 3 ml oorspronkelijke oplossing. Bereken de concentraties FIC vóór deze verdunning.
- In de donkere buizen zou geen omzetting van FIC plaats hebben moeten vinden. We gebruiken de concentratie FIC in deze buizen dus als achtergrondconcentratie. Trek de eindconcentraties FIC in de andere buizen af van de achtergrondconcentratie. Het verschil is de omgezette hoeveelheid FIC in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ in de belichte buizen.
- Bereken hoeveel elektronen zijn overgedragen door de lichtreactie in de buizen (in μmol). Gebruik het feit dat omzetting van 1 mol ferricyanide \rightarrow ferrocyanide staat voor 1 mol overgedragen elektronen.
- Gebruik de belichtingstijd om het aantal overgedragen elektronen per minuut te berekenen. Dit is de snelheid van elektronenoverdracht (in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).
- Bereken de massa chlorofyl in de buizen (in mg).
- Bereken de gevraagde snelheid van elektronenoverdracht per milligram chlorofyl (in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Rekentips ATP-bepaling:

- Bij deze bepaling is ATP omgezet in NADPH.
- Trek de achtergrond-extinctie van iedere cuvet (eerste meting) af van de eind-extinctie (tweede meting) om de extinctie van de gevormde NADPH te krijgen.
- Neem het gemiddelde van de duplo's.
- Reken de extinctie-waardes om naar concentraties NADPH, mbv. de Wet van Lambert-Beer. De millimolaire extinctiecoëfficiënt (ϵ) van NADPH bij 340 nm is $6.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- Het aantal moleculen NADPH dat is gevormd na toevoeging van de enzymen, staat gelijk aan het aantal moleculen ATP dat aanwezig was in de oorspronkelijke oplossing. Echter, de concentratie NADPH is niet gelijk aan de oorspronkelijke concentratie ATP, want we hebben de oplossing verdund door toevoeging van 2.5 ml ATP-meetmedium aan 0.5 ml van de oorspronkelijke oplossing.
- Bereken aan de hand van de huidige concentraties NADPH wat de concentraties ATP waren vóór deze verdunning.
- De concentratie ATP in de oorspronkelijke buizen is verder verdund door toevoeging van 0.3 ml KOH en 0.3 ml HClO₄ aan 3 ml oorspronkelijke oplossing. Bereken de concentraties ATP vóór deze verdunning.
- Reken de verkregen concentraties ATP om naar een gevormde hoeveelheid ATP

moleculen (in μmol).

- Gebruik de belichtingstijd om te berekenen hoeveel ATP er is gevormd in 1 minuut. Dit is de snelheid van ATP-synthese (in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$).
- Bereken de massa chlorofyl in iedere buis (in mg).
- Bereken nu de snelheid van ATP synthese per milligram chlorofyl (in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Gebruikte oplossingen

Isolatiemedium	50 mM Tricine; 300 mM Sorbitol; 25 mM NaCl; 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 ; pH 7.8 (met NaOH)
Incubatiemedium	50 mM NaCl, 50 mM KCl, 15 mM Tricine, 2.5 mM MK_2HPO_4 , 5 mM MgCl_2 ; pH 8.0 (met NaOH)
ATP-meetmedium	7 mM MgCl_2 , 80 mM Tris, 1 mM glucose, 0.8 mM NADP (vers toevoegen). pH 7.6 (met HCl)
FIC	20 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
ADP	ADP, 30 mM; pH 7.5
HClO_4	35% (v/v) HClO_4 (ca. 6 M)
KOH	6 M KOH in Trisbuffer (1 M)
DCMU	1 mM DCMU (3-(3',4'-dichlorofenyl)-1-1-dimethyl ureum, opgelost in ethanol).
Aceton	80% (v/v) aceton

Referenties

Voet, Voet en Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd edition, Chapter 18

DEEL III – De glucose-spiegel in bloed

Hormonale regulatie van de glucose-spiegel in bloed: Glucose tolerantie test

II.1 Inleiding

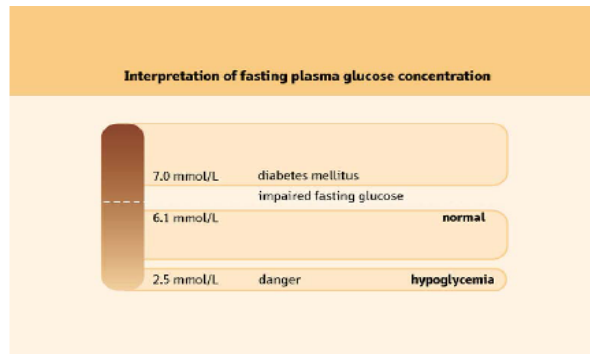
We zullen in dit experiment de regulatie bestuderen van het glucose-gehalte in bloed.

Het koolhydraat uit ons voedsel (zetmeel; glycogeen; laag-moleculaire sacchariden) wordt na de vertering in het spijsverteringssysteem in het bloed opgenomen in de vorm van glucose. Via de bloedbaan wordt het glucose getransporteerd naar lichaamscellen voor afbraak of opslag. De glucose-concentratie in het bloed (de bloedsuikerspiegel) wordt nauwkeurig gereguleerd door het metabolisme in de lever, in wisselwerking met o.a. de hormonen insuline en glucagon en afhankelijk van het gebruik door o.a. hersenen, erythrocyten, spierweefsel en vetweefsel. Bij een tekort aan insuline, zoals bij diabetes mellitus (suikerziekte), treedt een ernstige ontregeling op die alleen gecorrigeerd kan worden door de toediening van insuline.

Bij een gezond mens is de bloedsuikerspiegel in nuchtere toestand 3.3 – 5.6 mmol/l. Een waarde boven 6.0 mmol/l (**hyperglycaemie**) kan een aanwijzing zijn voor suikerziekte. Om een dergelijke stoornis in de glucosetofwisseling met zekerheid vast te stellen wordt in de kliniek vaak de glucose tolerantie-test of glucose belastingstest verricht. Bij de glucose tolerantie-test wordt aan een "nuchtere" patiënt een zekere hoeveelheid glucose oraal toegediend. Direct daarna bepaalt men de bloedsuikerspiegel (nog steeds in nuchtere toestand) en volgt die gedurende enige tijd door metingen op div. tijdstippen. Op die manier ontstaat een beeld van de grootte van de verstoring en van de snelheid van terugkeer naar de normaalwaarde. Daarmee wordt informatie verkregen over de ernst van de endocriene afwijking. Zie verder onderstaande figuur.



© Fleshandbones.com Baynes: Medical Biochemistry



© Fleshandbones.com Baynes: Medical Biochemistry

Bij gezonde personen doet glucose-belasting de bloedsuikerspiegel binnen een uur stijgen tot een maximale waarde van ca. 9.5 mmol/l, waarna binnen twee uur de nuchtere waarde weer wordt bereikt (of zelfs lager). De glucose belastingcurve van een diabeticus begint i.h.a. reeds vrij hoog en stijgt dan langer en hoger dan die van een gezond persoon, om vervolgens ook weer langzaam te dalen. De glucose-concentratie kan gemakkelijk boven de 10 mmol/l stijgen, waarmee de drempelwaarde van de nieren wordt overschreden (glycosurie). In de kliniek wordt dan ook altijd tevens de glucose bepaald in de urine, die gedurende het eerste deel van de belastingsproef is uitgescheiden. In dit experiment gebeurt dat niet, omdat we in principe met niet-diabetici te doen hebben.

Ook toestanden van **hypoglycaemie** (te lage glucose-spiegel) komen voor, al zullen zij tijdens dit praktikum niet snel worden waargenomen. Bloedsuikerspiegels van 2.5 mmol/l of lager kunnen leiden tot shock, en geven soms symptomen die van neuronale aard zijn

(neuroglycopenie = glucose-tekort in de neuronen). Hyperinsulinisme, waarvoor verschillende oorzaken bestaan, gaat gepaard met hypoglycaemie. Hypoglycaemie treedt bijv. op bij diabetici die zichzelf insuline toedienen zonder daarbij voor een voldoende voeding te zorgen. Een teveel aan circulerend insuline wordt ook wel waargenomen bij bepaalde adenomen en carcinomen van de pancreas. Ook bij verwijdering van (een deel van) de maag worden verschijnselen van hypoglycaemie waargenomen. Het voedsel passeert dan te snel, waardoor de insuline-secretie wel doch te laat op gang komt. Insuline verschijnt dan in het bloed 'als mosterd na de maaltijd'.

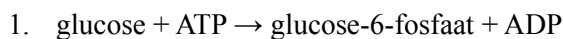
De glucose tolerantietest wordt bij voorkeur uitgevoerd op personen die 16 - 20 uur gevast hebben. Dit bevordert namelijk een snelle opname in de darm van glucose en voorkomt dat er nog invloeden van vorige maaltijden verstorend werken op de uitslag.

Omdat in dit geval enkele van u als proefpersoon zullen optreden wordt een compromis gesloten met de ideale situatie. Vóór 9:00 uur 's morgens mag een licht ontbijt worden genuttigd en in de loop van de ochtend is een kopje koffie zonder suiker/melk toegestaan. We zullen in de proef de invloed op de bloedsuikerspiegel volgen als antwoord op onder meer de belasting met glucose (1 g per kg lichaamsgewicht) of een equivalente hoeveelheid zetmeel (brood). Ter vergelijking wordt het bloed van een derde proefpersoon meegenomen, die normaal gegeten heeft.

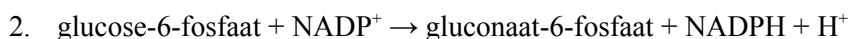
III.2 De glucose-bepaling

Er bestaan diverse methoden om glucose aan te tonen. "Klassieke" analytisch-chemische methoden zijn i.h.a. weinig specifiek. Daarom wordt vandaag de dag voornamelijk gebruik gemaakt van enzymatische technieken, bv. de hexokinase methode en de glucose-oxidase (GOD) methode. In de hexokinase bepaling wordt glucose eerst omgezet in glucose-6-fosfaat door het enzym hexokinase (HK), waarna in een tweede reactie NADPH gevormd wordt door het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase. De gevormde hoeveelheid NADPH is een directe maat voor de oorspronkelijke hoeveelheid glucose:

hexokinase

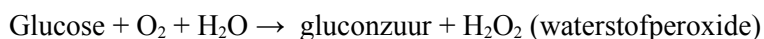


G-6-P-DH



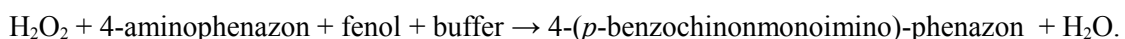
De **GOD** bepaling berust op de volgende reacties:

GOD



In een tweede reactie (Glucose-PAP bepaling; PAP = Puffer, 4-Aminophenazon, Phenol) wordt het hierbij gevormde H₂O₂ gebruikt om m.b.v. het enzym peroxidase (POD) en 4-aminophenazon en fenol om te zetten in 4-(*p*-benzochinonmonoimino)-phenazon, een rood gekleurd product:

POD



De hoeveelheid gekleurd product dat hierbij wordt gevormd is een maat voor de oorspronkelijke hoeveelheid glucose, en wordt m.b.v. de spectrofotometer gekwantificeerd bij 505 nm (zie ook BAYNES p. 134).

We zullen in dit experiment de bovenstaande methoden als volgt gebruiken:

- (1) Bij de "**droge**" **bepaling** wordt een druppeltje bloed direct op een stripje aangebracht dat reeds GOD en PAP bevat. De mate van verkleuring van dit stripje wordt rechtstreeks afgelezen in een speciaal meetapparaat, dat hieruit het glucose-gehalte berekent en weergeeft.
- (2) De "**natte**" **bepaling** is feitelijk ontworpen voor bepaling van glucose in bloed, serum, heparine plasma of EDTA plasma. Deze methode maakt gebruik van een commercieel verkrijgbaar glucose-reagens "Glucose-GOD-PAP", hetgeen wordt gemengd met onteiwit bloed of serum (in het practicum gebruiken we onteiwit bloed). Met enige aanpassingen kan deze methode eventueel ook gebruikt worden voor de analyse van urine. Net als bloed moeten urine-monsters eerst onteiwit worden. Dit kan geschieden door het eiwit neer te slaan o.i.v. de toevoeging van een $Zn(OH)_2$ gel gevolgd door verhitten.
- (3) In de "**COBAS**" **bepaling** wordt een manuele bepaling geautomatiseerd uitgevoerd m.b.v. de COBAS-Bio centrifugaal analysator. Dit apparaat is in gebruik in de kliniek, en bevat een kransvormige serie cuvetten van een speciale vorm. Reagens en monster (enkele μ l slechts !) worden door het apparaat in aparte compartimenten van de cuvet gepipetteerd, waarna er door centrifugeren menging optreedt en de reactie start. Nadat de te meten sera in het apparaat zijn gezet, en uiteraard ook de juiste reagens oplossingen zijn aangesloten, wordt er gestart. Pipetteren, menging door centrifugatie en meting van de absorptie geschiedt volautomatisch.
De cuvetten passeren een pulserende lichtbron die gekoppeld is aan een spectrofotometrische unit. Op deze wijze kan voortdurend de extinctie van alle cuvetten gemeten worden tegen de tijd. De $\Delta A/\text{min}$ wordt berekend en via een aangekoppelde computer kan elke gewenste berekening worden uitgevoerd en uitgeprint. Het apparaat kan zeer snel meten want alle cuvetten kunnen iedere 10 seconden worden doorgemeten.

In dit practicum zullen we geen glucose bepalingen uitvoeren mbv. de COBAS, maar in Exp. III zullen we de in dit experiment geïsoleerde lipiden mbv. de COBAS analyseren.

III.3 Vragen te beantwoorden voor de aanvang van het experiment

1. Hoe kun je onderzoeken of het nodig is om bloed en serum te onteiwitten voor de glucose-bepaling ?
2. Het meetapparaat met de stripjes bepaalt glucose in bloed. Zou het mogelijk zijn om het apparaat te ijken met een glucose-standaard opgelost in water ? Hoe zou je dit kunnen uittesten als je bloed of serum ter beschikking had ?
3. Wat voor verschil verwacht je te zien tussen de tolerantie test uitgevoerd door

toediening van glucose en die met zetmeel ?

4. Wat is hypoglycaemie ? Noem mogelijke oorzaken hiervan.
5. Noem mogelijke oorzaken van hyperglycaemie
6. Wat is glycolyse, en hoeveel ATP levert 1 glucose bij glycolyse ?
7. In welke weefsels levert glycolyse vooral lactaat als eindproduct ?
8. Hoe kan het optreden van glycolyse de gemeten glucose-waarden beïnvloeden ?
9. Beschrijf het principe van de COBAS-Bio centrifugaal analysator.
10. Noem 2 vormen van diabetes en beschrijf het verschil

III.4 Experimenteel gedeelte

De organisatie van de proef

Het is de bedoeling om het glucose-gehalte in het bloed te meten m.b.v. alle drie hierboven beschreven methodes. Per groep wordt een indeling gemaakt wie welk onderdeel gaat uitvoeren.

- a) Per assistentie-groep (12-15 studenten) worden minimaal vijf vrijwilligers gevraagd als proefpersonen op te treden. Vier van hen dienen zich te houden aan de dieetregels zoals in de inleiding beschreven. De vijfde moet gewoon gegeten hebben.
- b) De proefpersoon die glucose als belasting krijgt (1 g glucose per kg lichaamsgewicht) neemt een lunchpakket mee, waarna aan het eind van de proef een late lunch kan worden genuttigd. Eén persoon krijgt 2.5 g brood per kg lichaamsgewicht en "eet dus op kosten van de zaak". Andere personen krijgen 2 glazen Coca-Cola Classic of Diet-Coke. Andere variaties zijn mogelijk in overleg met de assistent.

Bloedmonsters worden genomen door middel van vingerprikjes. Er wordt gebruik gemaakt van prikapparatuur en naaldjes die een zeer geringe hoeveelheid bloed genereren. Hoewel de prik uiterst klein is, verdient het niettemin aanbeveling steeds de vinger van tevoren met een gereed staande alcoholoplossing te ontsmetten. De druppel bloed wordt direct op teststrips aangebracht (**III.4.1**) of dmv capilairtjes (**III.4.2 en III.4.3**) opgevangen volgens instructie die door de aanwezige assistentie wordt gegeven. Na afloop moeten gebruikte prikkertjes in speciaal daarvoor bestemde afvalbakjes worden gedeponerd..

Werken met humaan bloed

In dit practicum wordt gewerkt met humaan bloed afkomstig van de bloedbank. Wees bedacht op het niet-uitsluitbare risico van besmetting (bv. HIV, onbekende pathogenen), en werk heel zorgvuldig. Er wordt bij dit practicum ook bloed geanalyseerd dat via een vingerprikje wordt verkregen, zoals in de praktijk door diabetes patiënten zelf wordt gedaan. Dit is geheel vrijwillig! Zorg ervoor dat prikkertjes in de daartoe bestemde afvalbakjes worden gedeponerd. Daarnaast wordt een glucose bepaling uitgevoerd met (gecontroleerd) poolserum.

Belangrijke richtlijnen om evt. besmetting te voorkomen:

1. DENK NA BIJ WAT U DOET !!!!!
2. Wanneer men beschadigingen aan de handen heeft, wordt er met rubber handschoenen gewerkt om evt. besmetting te voorkomen. Wanneer met eigen bloed wordt gewerkt (vingerprikje), is dat uiteraard niet nodig.

3. Werk zorgvuldig, zodat geen bloed op tafel of apparatuur terecht komt
4. Bereid de proeven goed voor, zodat u precies weet waar u mee bezig bent

III.4.1. Glucose bepaling in bloed volgens de “droge methode”

Bij dit onderdeel wordt het bloedmonster op een stripje aangebracht volgens instructie van de assistent. In het stripje bevindt zich o.a. het enzym glucose oxidase. Het reactieproduct is snel na het aanbrengen van het bloeddruppeltje op de strip kwantificeerbaar. Nadat de reactie op de strip is voltooid wordt de glucosewaarde afgelezen. Het apparaat is tevoren geijkt met een strip waarop een glucose-oplossing van bekende concentratie is aangebracht. De concentratie wordt afgelezen in mM. Stripjes na afloop in het "biologische afval" emmertje deponeren.

De methode die hier wordt gebruikt wordt in de praktijk ook gebruikt door diabetici, die hiermee thuis zelf hun bloedsuikerspiegel in de gaten kunnen houden.

De test begint met de afname van het eerste bloedmonster bij drie tot vijf proefpersonen (in overleg met de assistent), en bepaling van de glucose concentratie. Dit geeft de uitgangskonzentratie van het glucose in het bloed aan. Vervolgens worden verschillende glucose belastingen uitgevoerd, en de glucose concentraties gemeten op verschillende tijdstippen na glucose-inname. Voor een vlotte gang van zaken zijn de "belastingen" reeds afgewogen, waarbij is uitgegaan van een lichaamsgewicht voor de vrouwen van 60 kg en van 70 kg voor de mannen. De glucose is opgelost in thee en de zoete smaak mag worden weggespoeld met een extra kop thee zonder suiker. Het brood dient binnen 5 minuten opgegeten te worden, waarbij eveneens suikervrije thee beschikbaar is: 2 kopjes pp. NOTEER DE TIJD ONMIDDELIJK NA DE BELASTING !!!

Meet nu het glucose-gehalte in het bloed op de tijdstippen 30, 60, 90 en 120 minuten. Wanneer hier per ongeluk van wordt afgeweken moet wel de dan geldende tijd worden genoteerd. Voor sommige glucose-bronnen is het beter om te meten na 15, 30, 45 en 60 minuten (overleg met assistent).

Tijdens de intervallen tussen de priktijden is er volop gelegenheid om over de theorie te spreken, en de voortgang van de andere bepalingsmethoden in de groep te volgen.

III.4.2 Glucose-bepaling in bloed volgens de "natte methode"

Ter vergelijking met de resultaten verkregen met het stripje wordt tevens rechtstreeks glucose bepaald in bloed, mbv de GOD bepaling. Als **monster** wordt **totaal bloed** genomen. Om de – onbekende- glucose concentratie in het bloed nauwkeurig vast te kunnen stellen wordt de methode tegelijkertijd toegepast op standaard-oplossingen met bekende concentratie glucose. Hiermee wordt een ijklijn gemaakt.

Vrijwilligers leveren 0.1 ml bloed (dit is de inhoud van 2 capillairtjes; de capillairtjes zijn gehepariniseerd om stolling te voorkomen) voor bepaling van de waarde op het tijdstip dat het glucose-gehalte maximaal is volgens de "droge" bepaling.

Om verlies van glucose te voorkomen is het vereist om bloed direct na afname (binnen 1 uur) te onteiwitten dan wel serum te bereiden (dus het bloed te ontdoen van de bloedcellen). Indien het nodig is om de monsters langere tijd te bewaren, dan moet direct na afname een remmer van de glycolyse worden toegevoegd (NaF of KF). Monsters waarin KF of NaF kunnen tot 24 h worden bewaard bij kamertemperatuur, of tot 1 week in een afgesloten buis bij 4°C. Ter

vergelijking is gepoold serum te krijgen dat lange tijd bewaard werd zonder fluoride, bij 4°C. **NB.** Indien onvoldoende bloed werd verkregen kan men uitgaan van 0.05 ml (één capillairtje), maar dan moeten natuurlijk ook de volumes NaOH en ZnSO₄ gehalveerd worden bij het onteiwitten (zie onder).

Onteiwitten van het bloed:

Breng in 5 glazen puntbuizen 0.1 ml 0.1 M NaOH en voeg vervolgens 0.5 ml 0.45% ZnSO₄-oplossing toe. Er ontstaat een gel. Voeg 0.1 ml toe van resp. bloed, bidest (blanco) en standaard oplossing (0.1 ml van 2.5, 5.0, en 10.0 mM glucose-oplossing in water). Plaats de buizen in een bekglas met kokend water, laat ze er 3 minuten instaan. Centrifugeer 5 min bij maximaal toerental in de tafelcentrifuge om het neergeslagen eiwit te verwijderen. Ga verder met het supernatant. (**Vraag:** waarom worden de blanco en de standaard oplossingen ook “onteiwit” ?)

Glucose-bepaling:

Pipetteer in duplo 0.05 ml onteiwit monster in een reageerbuis. Pipetteer in andere buizen 0.05 ml van elk van de "onteiwitten" glucose-standaarden, en in de "blanco" buis 0.05 ml "onteiwit" demiwater. Voeg aan alle buizen 2.0 ml glucose reagens toe (dit is een mengsel van GOD, POD and PAP, pH 7.0). Meng, en laat de buizen 30 min in het donker staan. Meet de absorptie van de monsters en de standaarden in de spectrofotometer bij 505 nm tegen de blanco. Maak een ijklijn waarin de concentratie glucose in de standaard wordt uitgezet tegen A_{505nm} . Bereken de concentratie van de glucose in bloed in mM, en vergelijk de uitkomst met die welke gevonden is met het teststrookje.

III.4.3. Verwerking van de resultaten

Zet in een grafiek de resultaten uit van alle experimenten die zijn uitgevoerd in uw groep, te weten:

- de belastingsproef met glucose
 - idem met brood
 - de belasting met Coca-cola in vergelijking met dieet coke
 - idem met Mars of Dextro
1. Bereken de controle glucose-concentratie in serum volgens de "natte" methode (de manuele bepaling). (**Vraag:** Moet men rekening houden met de verdunning die het serum evt. heeft ondergaan tijdens het onteiwitten?)
 2. Vergelijk met het resultaat verkregen in de glucose belastings-test. Vergelijk ook met de referentie-waarden (zie Inleiding)
 3. Vergelijk tenslotte de verkregen waarden. Bediscussieer het evt. verschil in gevoeligheid tussen de ‘droge’ methode en de ‘natte’ methode. Maak een schatting / berekening van de hoeveelheid bloed die elk van die methodes vereist om een betrouwbaar meetresultaat te verkrijgen.

Referenties

Voet, Voet en Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd edition, Section 21-4, pp. 778-782

Veiligheids- en Milieuvoorschriften

Neem kennis van de blauwe borden met voorschriften die op iedere practicumzaal hangen. Voor de volledige veiligheids- en milieuvoorschriften van dit practicum wordt verwezen naar de Blackboard-site voor deze cursus, onder *Cursusinformatie*. Op deze site is ook een instructievideo over laboratoriumveiligheid te vinden.

Bij calamiteiten

- Waarschuw altijd direct de practicumleiding of je assistent (ook bij kleine ongelukken)!
- **Het algemeen alarmnummer van de VU is: 222222**
Op iedere zaal hangt een telefoon waarmee je dit alarmnummer kunt bellen. Je wordt dan direct doorverbonden met de meldkamer, die eventueel hulpverleners kan sturen.
- In gevallen waarbij geen direct gevaar dreigt en de practicumleiding onbereikbaar is, kun je de facilitaire helpdesk bellen: 85888
- Bij de telefoon naast de ingang van de O-nul zaal hangt een lijst met tracer- of telefoonnummers van docenten/assistenten met een BHV/EHBO training.

Praktische informatie

- **Practicum-organisatie:**
 - Marijke Scholts (Structuurbiologie, FALW), 87167
 - Dr. Irma van Die (Glycoimmunologie Groep, VUMC), 48157
- **Contactpersonen veiligheid bij practica FALW:**
 - W.N.M. Reijnders (ARBO- en milieucoördinator), 77181
 - K. Raaijmakers (Hoofd Onderwijsbureau), 87167
- **Contactpersoon practicumzalen FALW:** Fred Wolff
- Je kunt met vragen uiteraard ook altijd terecht bij de practicum-assistenten.

