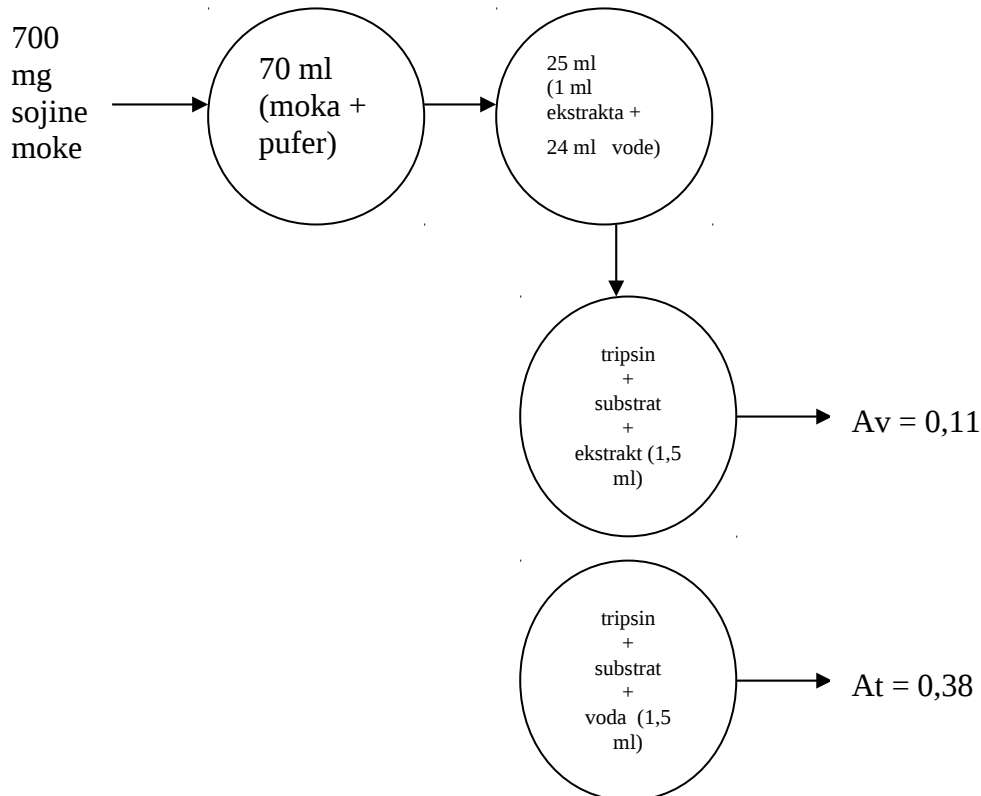


700 mg sojine moke suspendiraš v ekstrakcijskem puftru (skupen volumen suspenzije je 70 ml). Po končani ekstrakciji odvzameš 1 ml ekstrakta (suspenzije) in ga preliješ v 25 ml bučko ter razredčiš z destilirano vodo. Nato narediš test encimske aktivnosti tripsina (tripsin + substrat + voda) in primerjaš dobljeno absorbanco po desetih minutah z meritvijo kjer si poleg tripsina in substrata namesto vode dodal 1,5 ml razredčenega ekstrakta. V epruveti kjer si imel samo tripsin in substrat je absorbanca pri 410 nm 0,38. V primeru, ko si poleg encima in substrata dodal še ekstrakt je absorbanca pri 410 nm 0,11! Izračunaj koliko tripsinskih enot vsebuje 1 mg soje (TIU/mg)! Ali je meritev dobro izpeljana? Če so potrebne kakšne spremembe v izvedbi eksperimenta, predlagaj, kaj bi bilo potrebno narediti, da bi bil rezultat bolj pravilen?

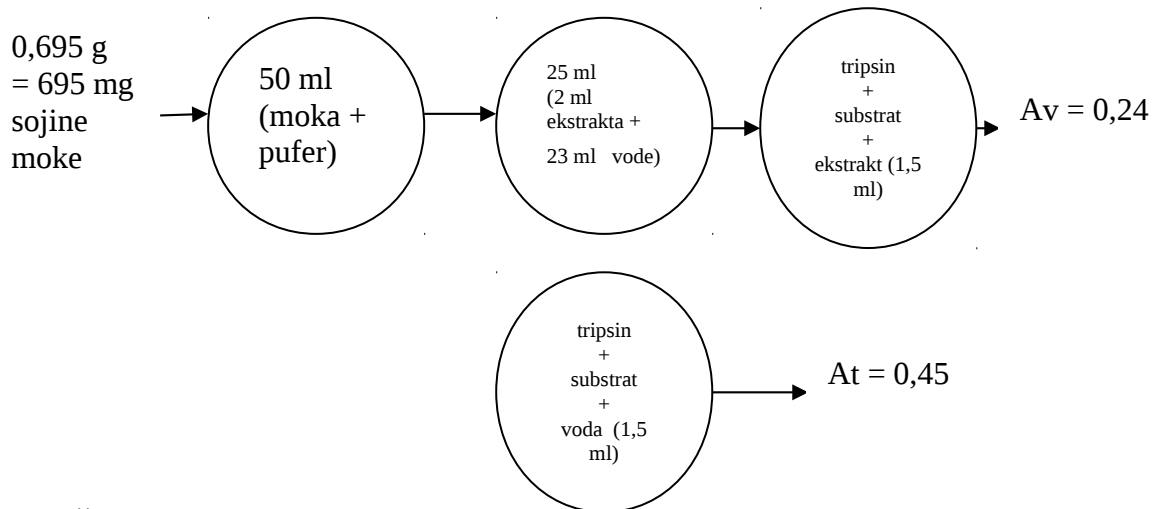


$$\begin{array}{l}
 1. \text{ Masa ekstrakta v 1,5 ml} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 700 \text{ mg} \dots\dots\dots 70 \text{ ml} \\ X \text{ mg} \dots\dots\dots 1 \text{ ml} \end{array} \right\} \begin{array}{l} X = (700 \text{ mg} \times 1 \text{ ml}) / 70 \text{ ml} \\ = 10 \text{ mg} \end{array} \\
 \\
 \left. \begin{array}{l} 10 \text{ mg} \dots\dots\dots 25 \text{ ml} \\ X \text{ mg} \dots\dots\dots 1,5 \text{ ml} \end{array} \right\} \begin{array}{l} X = (10 \text{ mg} \times 1,5 \text{ ml}) / 25 \text{ ml} \\ = 0,6 \text{ mg} \end{array}
 \end{array}$$

2. $TIU = (A_t - A_v) / 0,01 = (0,38 - 0,11) / 0,01 = 27$
3. $TIU/mg = (TIU) / mg = 27 / 0,6mg = 45 \text{ TIU/mg}$
4. Da bi bil rezultat še bolj pravilen bi morali ekstrakt še bolj razredčiti.

$$\begin{array}{l}
 \frac{TIU}{ml_{\text{nerazredčen}}} \rightarrow \frac{TIU_k}{V_k} = \frac{27TIU}{1,5ml} = 18 \frac{TIU}{ml} \xrightarrow{\times 25ml} 450TIU \xrightarrow{/1ml} 450 \frac{TIU}{ml} \\
 \xrightarrow{\times 70ml} \frac{31500TIU}{700mg} = 45 \frac{TIU}{mg}
 \end{array}$$

0,695 g sojine moke suspendiraš v ekstrakcijskem puftru (skupen volumen suspenzije je 50 ml). Po končani ekstrakciji odvzameš 2 ml ekstrakta (suspenzije) in ga preliješ v 25 ml bučko ter razredčiš z destilirano vodo. Nato narediš test encimske aktivnosti tripsina (tripsin + substrat + voda) in primerjaš dobljeno absorbanco po desetih minutah z meritvijo kjer si poleg tripsina in substrata namesto vode dodal 1,5 ml razredčenega ekstrakta. V epruveti kjer si imel tripsin in substrat je absorbanca pri 410 nm 0,45. V primeru, ko si poleg encima in substrata dodal še ekstrakt, je absorbanca pri 410 nm 0,24! Izračunaj koliko tripsinskih enot vsebuje 1 mg soje (TIU/mg)!



1. NAČIN

- | | | |
|---|---|---|
| 1. Masa ekstrakta v 1,5 ml → 695 mg 50 ml | } | $X = (695 \text{ mg} \times 2 \text{ ml}) / 50 \text{ ml}$ |
| X mg 2 ml | | |
| 27,8 mg 25 ml | } | $X = (27,8 \text{ mg} \times 1,5 \text{ ml}) / 25 \text{ ml}$ |
| X mg 1,5 ml | | |
- TIU = (At - Av) / 0,01 = (0,45 - 0,24) / 0,01 = 21
- TIU/mg = (TIU) / mg = 21 / 1,67 mg = 12,57 TIU/mg

2. NAČIN

$$\gamma_z = \frac{m_z}{V_z} = \frac{695 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 13,9 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \xrightarrow{\gamma \rightarrow \text{enaka}} m_{2 \text{ ml}} = \gamma_z \times V_{2 \text{ ml}} = 13,9 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 2 \text{ ml} = 27,8 \text{ mg}$$

$$\gamma_{2 \text{ ml}} = \gamma_{50 \text{ ml}}$$

$$\gamma_{25 \text{ ml}} = \frac{m_{50 \text{ ml}}}{V_{25 \text{ ml}}} = \frac{27,8 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} = 1,112 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \xrightarrow{\gamma \rightarrow \text{enaka}} m_{1,5 \text{ ml}} = \gamma_{25 \text{ ml}} \times V_{1,5 \text{ ml}} = 1,112 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,67 \text{ mg}$$

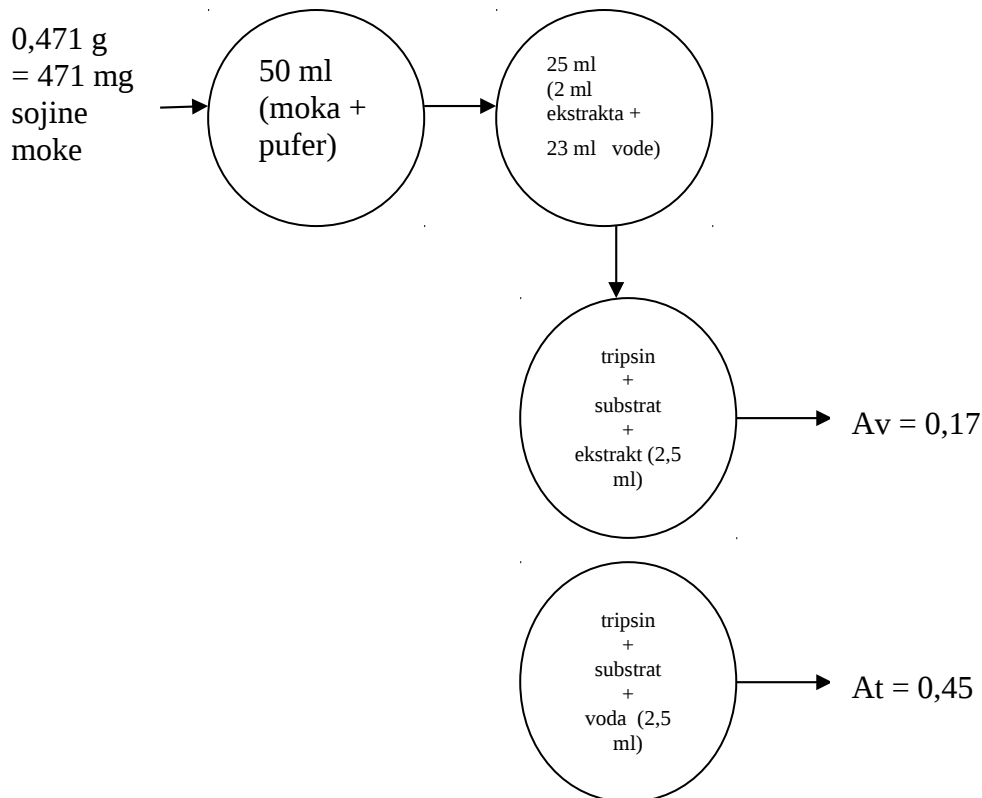
3. NAČIN (TIU/mg in TIU/ml)

$$\frac{\text{TIU}}{\text{ml}_{\text{nerazredčen}}} \rightarrow \frac{\text{TIU}_k}{V_k} = \frac{21 \text{ TIU}}{1,5 \text{ ml}} = 14 \frac{\text{TIU}}{\text{ml}} \xrightarrow{\times 25 \text{ ml}} 350 \text{ TIU} \xrightarrow{/ 2 \text{ ml}} 175 \frac{\text{TIU}}{\text{ml}}$$

$$\xrightarrow{\times 50 \text{ ml}} \frac{8750 \text{ TIU}}{695 \text{ mg}} = 12,59 \frac{\text{TIU}}{\text{mg}}$$

0,471 g sojine moke suspendiraš v ekstrakcijskem puftru (skupen volumen suspenzije je 50 ml). Po končani ekstrakciji odvzameš 2 ml ekstrakta (suspenzije) in ga preliješ v 25 ml bučko ter razredčiš z destilirano vodo. Nato narediš test encimske aktivnosti tripsina

(tripsin + substrat + voda) in primerjaš dobljeno absorbanco po desetih minutah z meritvijo kjer si poleg tripsina in substrata namesto vode dodal 2,5 ml razredčenega ekstrakta. V epruveti kjer si imel samo tripsin in substrat je absorbanca pri 410 nm 0,45. V primeru, ko si poleg encima in substrata dodal še ekstrakt, je absorbanca pri 410 nm 0,17! Izračunaj koliko tripsinskih enot vsebuje 1 mg soje? Eksperimentalni podatki kažejo na to, da bi bilo potrebno pri eksperimentu nekaj spremeniti. Pojasni kaj je narobe in kako bi to popravil!



$$4. \text{ Masa ekstrakta v 1,5 ml} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 471 \text{ mg} \dots\dots\dots 50 \text{ ml} \\ X \text{ mg} \dots\dots\dots 2 \text{ ml} \end{array} \right\} X = (471 \text{ mg} \times 2 \text{ ml}) / 50 \text{ ml} = 18,84 \text{ mg}$$

$$\left. \begin{array}{l} 18,84 \text{ mg} \dots\dots\dots 25 \text{ ml} \\ X \text{ mg} \dots\dots\dots 2,5 \text{ ml} \end{array} \right\} X = (18,84 \text{ mg} \times 2,5 \text{ ml}) / 25 \text{ ml} = 1,88 \text{ mg}$$

$$5. \text{ TIU} = (A_t - A_v) / 0,01 = (0,45 - 0,17) / 0,01 = 28$$

$$6. \text{ TIU/mg} = (\text{TIU}) / \text{mg} = 28 / 1,88 \text{ mg} = 14,89 \text{ TIU/mg}$$

7. Da bi bil rezultat še bolj pravilen bi morali ekstrakt še bolj razredčiti.

$$\frac{\text{TIU}}{\text{ml}_{\text{nerazredčen}}} \rightarrow \frac{\text{TIU}_k}{V_k} = \frac{28 \text{ TIU}}{2,5 \text{ ml}} = 11,2 \frac{\text{TIU}}{\text{ml}} \xrightarrow{\times 25 \text{ ml}} 280 \text{ TIU} \xrightarrow{/ 2 \text{ ml}} 140 \frac{\text{TIU}}{\text{ml}}$$

$$\xrightarrow{\times 50 \text{ ml}} \frac{7000 \text{ TIU}}{471 \text{ mg}} = 14,86 \frac{\text{TIU}}{\text{mg}}$$

Pojasni in izračunaj koliko inhibitornih enot tripsinske aktivnosti bi določil, če bi v 50 ml bučki razredčil 5 ml ekstrakta in ne volumna, ki si ga uporabljal na vajah!

Če vzamemo 5 ml ekstrakta je absorbanca manjša, ker nastane manj produkta in je tako TIU večja saj se nahaja v 5 ml veliko več tripsinskega inhibitorja kot v 1 ml in tako ta tripsinski inhibitor hitreje blokira tripsin, ki ga dodamo. Če bi želeli doseči podoben rezultat kot z 1 ml bi morali 5 ml dodati toliko več tripsina. Če pa vzamemo 1 ml kot na vaji, pa je več produkta in s tem večja absorbanca ter manjši TIU.

Podatki iz vaje: $V_z = 50 \text{ ml}$, 5 ml ekstrakta, $A_s = 0,501$ $A_v = 0,246$, 1 ml razredčitev končna

$$TIU = \frac{A_s - A_v}{0,01} = \frac{0,501}{0,01} = 50,1 TIU \quad (A_v \text{ zanemarimo})$$

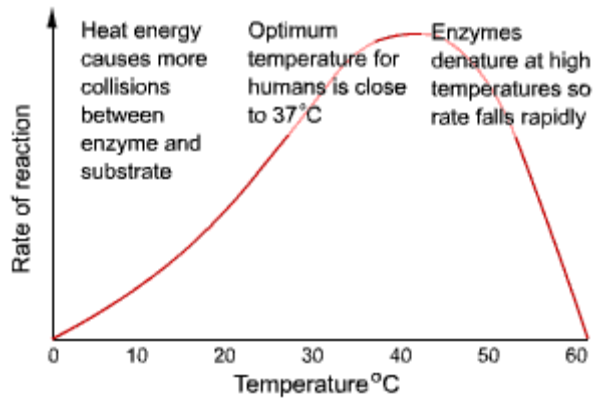
$$\frac{TIU}{ml_{\text{nerazredčen}}} \rightarrow \frac{TIU_k}{V_k} = \frac{50,1 TIU}{1 ml} = 50,1 \frac{TIU}{ml} \xrightarrow{\times 25 ml} 1252,5 TIU \xrightarrow{/ 5 ml} 250,5 \frac{TIU}{ml}$$

$$\xrightarrow{\times 50 ml} \frac{12525 TIU}{1000 mg} = 12,53 \frac{TIU}{mg} \quad (\text{npr. } 1 ml \text{ vsebuje pa } 31,9 \frac{TIU}{ml})$$

Označi ali je trditev pravilna ali ne!

	DRŽI	NE DRŽI
Tripsinski inhibitorji iz soje v prisotnosti tripsina razgrajujejo substrat BAPNA.		X
Praktično vsi tripsinski inhibitorji s toplotno obdelavo izgubijo učinek.	X	
Tripsin dodamo zato, da aktivira tripsinski inhibitor katerega določamo.		X
V slepem vzorcu, kjer bomo dodali očetno kislino pred tripsinom, bomo izmerili večjo absorbanco kot v vzorcu, kjer bomo zmešali substrat BAPNA, tripsin in tripsinski inhibitor ter šele nato dodali očetno kislino.		X
Tripsin je bolj aktiven v šibko bazičnem kot v šibko kislem okolju.	X	
Tripsinski inhibitor iz soje razgrajuje substrat BAPNA, vendar počasneje kot tripsin.		X
Tripsinski inhibitor je pomemben člen obrambe rastlin pred škodljivci.	X	
Tripsin je pomemben člen obrambe rastlin pred škodljivci.		X
Tripsinski inhibitor je protein.	X	
Tripsinski inhibitor je dober kelator za bakrove ione, ki so kofaktorji tripsina.		X
Tripsinski inhibitor je kovalentno modificirana aminokislina.		X
Del tripsinskih inhibitorjev iz soje se denaturira v kislem okolju. Če reakcijsko zmes v kateri so sojin ekstrakt, tripsin in BAPNA nakisamo z očetno kislino, bo nastalo več obarvanega produkta kot, če tega ne naredimo.		X

Kaj meniš koliko TIU bi določil v vzorcu v primerjavi s pravo vrednostjo, če bi reakcijo izvajal pri sobni temperaturi in ne pri 37 °C in če bi reakcijo izvajal pri 45 °C in ne pri 37 °C? Pri drugi možnosti predpostavljamo, da se tripsin in tripsinski inhibitor pri 45 °C ne denaturirata.



Če reakcijo izvajamo pri sobni temperaturi, kar pomeni, da delamo v okolju s temperaturo okoli 22 °C, je to temperatura, ki je nižja od 37 °C oz. človeške temperature. Ker ima temperatura na encime velik vpliv to za naš sistem pomeni, da bomo dobili v določenem času manj TIU v vzorcu, saj encimi počasneje delujejo to pa zaradi tega, ker ni toplotne energije, ki bi pospešila interakcije med encimom in substratom. Pri nižji temperaturi se encim in substrat težje najmeta.

Popolnoma drugače je, če temperaturo medija nekoliko dvignemo (ne preveč, da ne denaturiramo encimov) saj s tem dosežemo večjo aktivnosti encima in več interakcij med substratom in encimom. Tako bo nastalo več produktov in posledično višja absorbanca ter tako večje število TIU enot (ker se absorbanca poveča tako slepi probi kot vzorcu).

V soji določamo aktivnost tripsinskega inhibitorja na način, ki je opisan v skripti. Ali se izmerjena aktivnost tripsinskega inhibitorja v TIU razlikuje od prave vrednosti, če sojin ekstrakt poleg tripsinskih inhibitorjev vsebuje tudi encime, ki so podobni tripsinu in prav tako razgrajujejo substrat BAPNA, a niso inhibirani s tripsinskimi inhibitorji. Pojasni ali to vpliva na izmerjeno aktivnost tripsinskega inhibitorja in odgovor utemelji!

Ti drugi podobni encimi tripsinu vplivajo na rezultat TIU. Glavni razlog za napačen rezultat je v tem, da tripsinski inhibitor ne more inhibirati tega podobnega encima, kar pomeni, da se substrat nemoteno razgrajuje naprej in pri tem tvori še intenzivnejšo barvo produkta. Posledično izmerimo višjo absorbanco in tako določimo manjše število TIU v vzorcu kot jih v resnici je.

V soji določamo aktivnost tripsinskega inhibitorja na način, ki je opisan v skripti. Ali se izmerjena aktivnost tripsinskega inhibitorja v TIU enotah razlikuje od prave vrednosti, če sojin ekstrakt poleg tripsinskih inhibitorjev vsebuje tudi proteine, ki so podobni BAPNA substratu za tripsin. Peptidi, ki so produkti reakcije ne absorbirajo pri 410 nm

kjer merimo količino nastalega produkta iz substrata BAPNA. Pojasni ali to vpliva na izmerjeno aktivnost tripsinskega inhibitorja in odgovor utemelji.

Dodani peptidi vplivajo na določitev končnega TIU v vzorcu in sicer zaradi tega, ker povzročajo tripsinu dodatno delo, saj poleg osnovnega BAPNA substrata mora razgrajevati še te peptide. Posledično zaradi tega tripsin ne more v določenem času razgraditi toliko BAPNA substrata kot v odsotnosti teh peptidov. Ker ne uspe razgraditi toliko BAPNA substrata je v vzorcu tudi manj obarvanih produktov kar vpliva na nižjo absorbanco in posledično na število TIU enot. V tem primeru bi določili, da je v vzorcu veliko število TIU enot saj so hitro blokirali tripsin ta pa posledično ni več razgrajeval substrata na obarvane produkte vendar vemo, da to ni res, saj so analizo motili peptidi.

Pretvori!

$$1,43 \frac{mg}{ml} \xrightarrow{\frac{g}{m^3}} 1,43 \frac{10^{-3} g}{10^{-6} m^3} = 1430 \frac{g}{m^3} \xrightarrow{\frac{\mu g}{L}} 1430 \frac{10^6 \mu g}{10^3 L} = 1430000 \frac{\mu g}{L}$$
$$\xrightarrow{\frac{g}{\mu l}} 1430000 \frac{10^{-6} g}{10^6 \mu l} = 1,43 \times 10^{-6} \frac{g}{\mu l}$$