

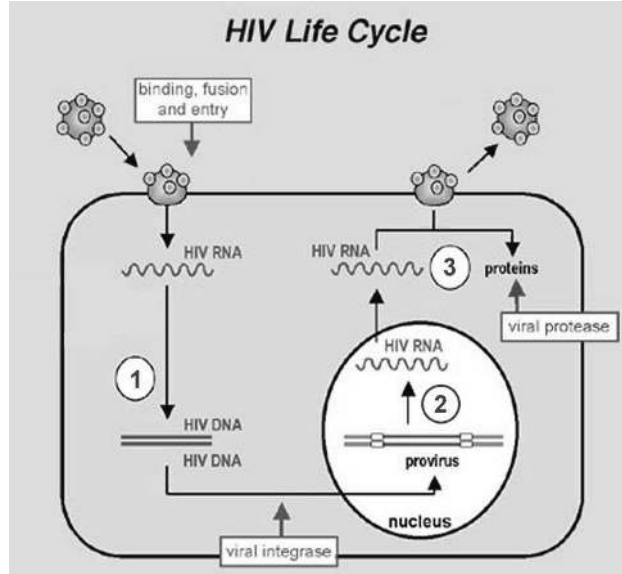
Mi a számmal (1, 2, 3) jelzett folyamatok neve?

Milyen enzim katalizálja az egyes reakciókat?

Milyen építőkövekre van szükség az egyes reakciókhoz?

- 1) reverz transzkripció
enzim: reverz transzkriptáz
építőkövek: nukleotidok (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 2) transzkripció
enzim: RNS polimeráz
építőkövek: nukleotidok(dATP, dGTP, dCTP, dUTP)
- 3) transláció
enzim: riboszóma (azon belül is: ribozim)
építőkövek: aminosavak (+ tRNS, translációs faktor, ATP, tRNS-aminoacil szintetizáló enzim)

A HIV vírus életciklusa:



Egy enzimreakcióban csak a termék nyel el 410 nm-en. A termék esetén $\epsilon_{410} = 25\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, az abszorbancia a reakció kezdetén 0.002-t változik másodpercenként 2 mm-es küvettában. Mennyi a kezdeti reakciósebesség (v_0) ?

Lambert-Beer törvény

$$A = \epsilon c l$$

ahol:

A az abszorbancia

ϵ a moláris abszorbancia $\left[\frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{m}}\right]$

l a fény által az anyagban megtett távolság $[m]$

c a koncentráció $\left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}\right]$

Megoldás:

$$\epsilon = 25\,000 \frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}}$$

$$\Delta A = 0,002 \frac{1}{s}$$

$$l = 2\text{ mm} = 0,2\text{ cm}$$

$$v_0 = ?$$

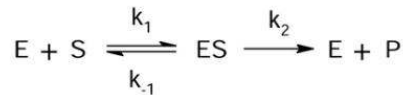
$$v_0 = \dot{c} = \frac{d}{dt} c$$

$$\Delta A = \frac{d}{dt} A = \epsilon \cdot l \cdot v_0 \rightarrow v_0 = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l}$$

$$v_0 = \frac{0,002 \frac{1}{s}}{25\,000 \frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}} \cdot 0,2\text{ cm}} = 4 \cdot 10^{-7} \frac{\text{M}}{s}$$

Mi a Michaelis-Menten modell (a mechanizmust leíró reakcióegyenlet)?
Mit jelent ebben a modellben az egyensúlyi állapoton alapuló (steady-state) közelítés ?

Az enzim és a szubsztrát egyidejű jelenlétéből kiinduló reakció végállapotában az enzim és a produktum található meg. Ez a reakció két elemi lépésen keresztül játszódik le:

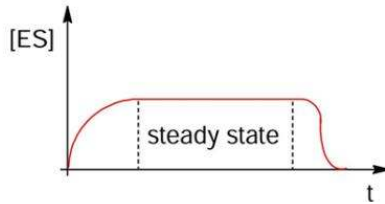


Ebből a reakciósebesség egyenlő a koncentrációváltozással, vagyis

$$V = \frac{d}{dt}[P] = k_2[ES]$$

$$\frac{d}{dt}[ES] = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

A reakció során az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja időben változik, azonban egy bizonyos (közbülső) szakaszon állandónak tekinthető. Ezen a szakaszon tehát $\frac{d}{dt}[ES] = 0$, ami steady-state közelítés, és ez a modell alapja.



Teljes levezetés (szerintem csak a színes képleteket kell tudni/érteni):

$$v = \frac{d}{dt}[P] = k_2 \cdot [ES]$$

$$\frac{d}{dt}[ES] = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - (k_2 + k_{-1}) \cdot [ES] = 0 \ll \text{Steady - state feltevés}$$

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_{-1}) \cdot [ES] \gg [E] \cdot [S] = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \cdot [ES]$$

$$k_M := \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \gg [E] \cdot [S] = k_M \cdot [ES]$$

$$[E]_T = [E] + [ES] \text{ (Ahol } [E]_T \text{ az enzim kiindulási koncentrációja)}$$

$$\gg [E] = [E]_T - [ES]$$

$$([E]_T - [ES]) \cdot [S] = k_M \cdot [ES]$$

$$[E]_T \cdot [S] - [ES] \cdot [S] = k_M \cdot [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{k_M + [S]}$$

Ha $[S] \gg k_M$, vagyis nagy szubsztrátfelesleg esetén:

$$[ES] = [E]_T \gg v = \frac{d}{dt}[P] = k_2 \cdot [E]_T = v_{max} \gg [E]_T = \frac{v_{max}}{k_2}$$

$$v = \frac{d}{dt}[P] = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot \frac{[E]_T[S]}{k_M + [S]} = \frac{v_{max}}{k_M} \cdot \frac{[S]}{k_M + [S]}$$

vagyis: $v_0 = v_{max} \cdot \frac{[S]}{k_M + [S]}$

Ha $[S] \ll k_M$, vagyis k_M -nél jóval kisebb szubsztrát koncentráció esetén:

$$v_0 = \frac{k_2}{k_M} \cdot [E]_T[S] \gg \text{lineáris közelítés kis szubsztrát koncentrációra}$$

$$\text{Ha pedig } [S] = k_M, \text{ akkor } v_0 = v_{max}/2$$

Mi a Michaelis-Menten egyenlet? Mit jelentenek az állandók? Mikor lesz a reakciósebesség a maximális sebesség fele?

$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

ahol:

V_0 a kezdeti sebesség $\left[\frac{M}{s}\right]$

V_{max} a kezdeti reakciósebességek maximuma

K_m a Michaelis-konstans $[M]$ mely a fenti reakcióegyenlet állandóiból: $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

$[S]$ a szubsztrát koncentráció $[M]$

A reakciósebesség akkor lesz a maximális sebesség fele, ha $[S] = k_M$

Az alábbi adatokat kaptuk 1 cm-es küvettában:

$$[S] = 20 \mu\text{M} \rightarrow dA/dt = 0.00118 \text{ s}^{-1}$$

$$[S] = 40 \mu\text{M} \rightarrow dA/dt = 0.00223 \text{ s}^{-1}$$

$$[S] = 60 \mu\text{M} \rightarrow dA/dt = 0.00335 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{termék: } \epsilon_{410} = 25\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

enzim: 1 $\mu\text{g/mL}$, MW = 25 kDa (MW = moláris tömeg \gg 25 kDa = 25 000 g/mol)

$K_M \gg [S]$ feltételezéssel élve mennyi a k_{cat}/K_M ? Számoljuk ki a standard deviációt is.

$$\frac{k_{cat}}{k_M} \text{ a katalitikus hatékonyság, esetünkben ez: } \frac{k_{cat}}{k_M} = \frac{k_2}{k_M}$$

$$\text{Lambert-Beer: } A = \epsilon \cdot c \cdot l \gg \frac{d}{dt} A = \frac{d}{dt} (\epsilon \cdot c \cdot l) = \epsilon \cdot l \cdot \frac{d}{dt} c = \epsilon \cdot l \cdot v_0 \text{ (mivel } \epsilon \text{ és } l \text{ konstansok)}$$

$$\text{Lambert-Beer + Michaelis-Menten: } \frac{d}{dt} A = \epsilon \cdot l \cdot \left(v_{max} \cdot \frac{[S]}{k_M + [S]} \right) \text{ és } k_2 \cdot [E]_T = v_{max} \gg \frac{d}{dt} A = \epsilon \cdot l \cdot k_2 \cdot [E]_T \cdot \frac{[S]}{k_M + [S]}$$

$$K_M \gg [S] \text{ feltételezéssel élve: } \frac{d}{dt} A = \epsilon \cdot l \cdot k_2 \cdot [E]_T \cdot \frac{[S]}{k_M} = \epsilon \cdot l \cdot [S] \cdot [E]_T \cdot \frac{k_2}{k_M} \gg \frac{k_2}{k_M} = \frac{\frac{d}{dt} A}{\epsilon \cdot l \cdot [S] \cdot [E]_T}$$

$$\epsilon_{410} = 25\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \rho_c = 1 \mu\text{g/mL}, l = 1 \text{ cm} \gg \text{mértékegységek átváltására figyelni kell!!!}$$

Azt hiszem a következő mértékegységekre kell átváltani: cm, g, g/mol, M (vagyis mol/dm³), M⁻¹cm⁻¹

$$[E]_T = \frac{1 \mu\text{g/mL}}{25\,000 \text{ g/mol}} = \frac{0,000001 \text{ g/mL}}{25\,000 \text{ g/mol}} = 0,025 \text{ mol/L}$$

$$[S] = 20 \mu\text{M} \rightarrow \frac{d}{dt} A = 0.00118 \text{ s}^{-1} \gg \frac{k_2}{k_M} = \frac{0.00118}{25\,000 \cdot 1 \cdot 0,00002 \cdot 0,025} = 9,44 \cdot 10^{-2}$$

$$[S] = 40 \mu\text{M} \rightarrow \frac{d}{dt} A = 0.00223 \text{ s}^{-1} \gg \frac{k_2}{k_M} = \frac{0.00223}{25\,000 \cdot 1 \cdot 0,00004 \cdot 0,025} = 8,92 \cdot 10^{-2}$$

$$[S] = 60 \mu\text{M} \rightarrow \frac{d}{dt} A = 0.00335 \text{ s}^{-1} \gg \frac{k_2}{k_M} = \frac{0.00335}{25\,000 \cdot 1 \cdot 0,00006 \cdot 0,025} = 8,93 \cdot 10^{-2}$$

Kapott eredmények számtani átlaga: $9,06 \cdot 10^{-2}$

$$\text{Ehhez képest a standard deviáció (tapasztalati szórás, korrigált empirikus szórás): } s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n \cdot x_{\text{átlag}}^2}{n-1}} = 9,83 \cdot 10^{-3}$$

A foszfo-glicerát kináz által katalizált reakció: BPG + ADP \rightleftharpoons PG + ATP

Az ATP hidrolízis standard szabadentalpia változása: $\Delta G^0 = -30.5 \text{ kJ/mol}$ \gg reakcióegyenlet: ATP \rightleftharpoons ADP + P

A BPG hidrolízis standard szabadentalpia változása: $\Delta G^0 = -49 \text{ kJ/mol}$ \gg reakcióegyenlet: BPG \rightleftharpoons PG + P

R = 8.31 J / (mol · K), **PG**: 3-foszfo-glicerát, **BPG**: 1,3-bisz-foszfo-glicerát

Mennyi a BPG + ADP \ll PG + ATP reakció standard szabadentalpia változása?

0.1 mol/l BPG és 0.1 mol/l ADP összekeverése esetén mi lesz a reaktánsok és a termékek egyensúlyi koncentrációja 37 °C-on ?

	BPG	+	ADP	\rightleftharpoons	PG	+	ATP
Kiindulási állapot	0,1 M		0,1 M		0		0
Végállapot	0,1 M - x		0,1 M - x		x		x

$$\Delta G^0 = -\Delta G_{ATP \text{ hidrolízis}}^0 + \Delta G_{BPG \text{ hidrolízis}}^0 = -18,5 \text{ kJ/mol}$$

megjegyzés: $\Delta G_{ATP \text{ hidrolízis}}^0$ előtt azért van negatív előjel, mert nekünk a másik irány kell, nem a hidrolízis

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K) = -18\,500 \text{ J/mol}$$

megjegyzés: fontos az átváltás!!

$$-R \cdot T \cdot \ln(K) = -18\,500 \text{ J/mol} \text{ képletből kiszámolható: } K = 1310,21.$$

$$\text{Tudjuk: } K = \frac{[PG][ATP]}{[BPG][ADP]} = \frac{x^2}{(0,1-x)^2} = \left(\frac{x}{0,1-x} \right)^2,$$

$$\text{amiből: } x = [PG] = [ATP] = 0,097 \text{ és } (0,1-x) = [BPG] = [ADP] = 0,0026$$

Vagyis lényegében tökéletesen végbemegy a reakció.

Proton motive force (PMF): $\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{[H^+]_{belső}}{[H^+]_{külső}}\right) + z \cdot F \cdot \Delta U$

$\Delta G = -8,314 \cdot 310 \cdot \ln(26) + 1 \cdot 96\,485 \cdot (-0,15) = -22\,869,97\text{ J}$

$\frac{-22\,869,97\text{ J}}{-47\,000\text{ J}} \cdot 0,7 = 0,34 \gg \mathbf{3\ db\ proton\ visszajutása\ fedezi\ egy\ ATP\ szintézisét.}$

Egy 5 kbp méretű plazmidon található gént szeretnénk PCR segítségével felszaporítani. Összesen 80 pg plazmidunk van. A gén mérete 1000 bp. (pg = pikogramm, 1pg = $1 \cdot 10^{-12}\text{ g}$, bp = bázispár, kbp = kilobázispár)

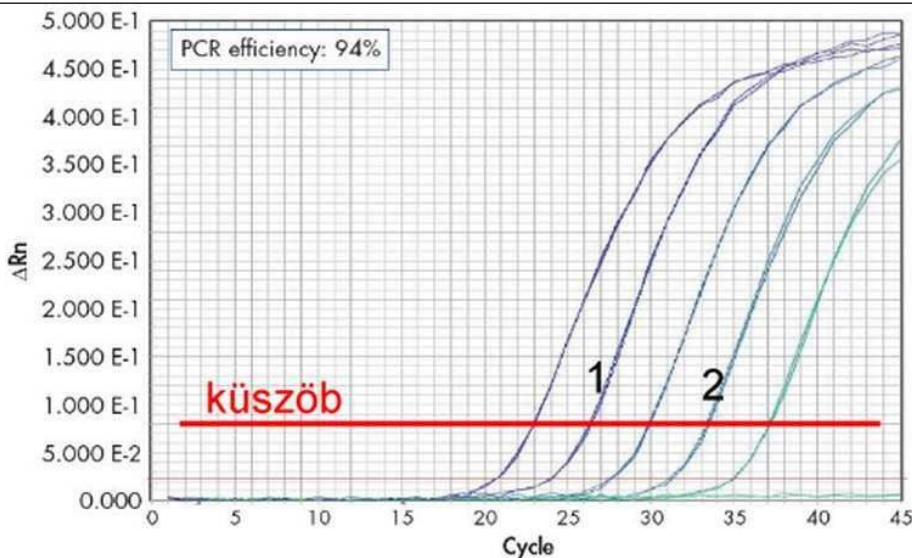
Hány PCR ciklusra van szükség **legalább** 1 μg DNS előállításához az adott génből, ha feltételezzük, hogy a PCR hatásfoka minden ciklusban 100%?

Milyen anyagokra van szükségünk a PCR reakcióhoz?

$m_{gén} = 80 \cdot 10^{-12}\text{ g} \cdot \frac{1000}{5000} = 16 \cdot 10^{-12}\text{ g}$

$m_{DNS} = 1\mu\text{g} = 1 \cdot 10^{-6}\text{ g} = 16 \cdot 10^{-12}\text{ g} \cdot 2^x \gg x = \log_2\left(\frac{1 \cdot 10^{-6}\text{ g}}{16 \cdot 10^{-12}\text{ g}}\right) = 15,93$

100% - os hatásfok mellett **16 PCR ciklusra van szükség** 1 μg DNS előállításához



a) Becsülje meg az 1-es és 2-es PCR reakció ciklusszámát a küszöb értéknél.

b) 100% PCR hatékonyságot feltételezve hányszor több anyag volt az 1-es mintában?

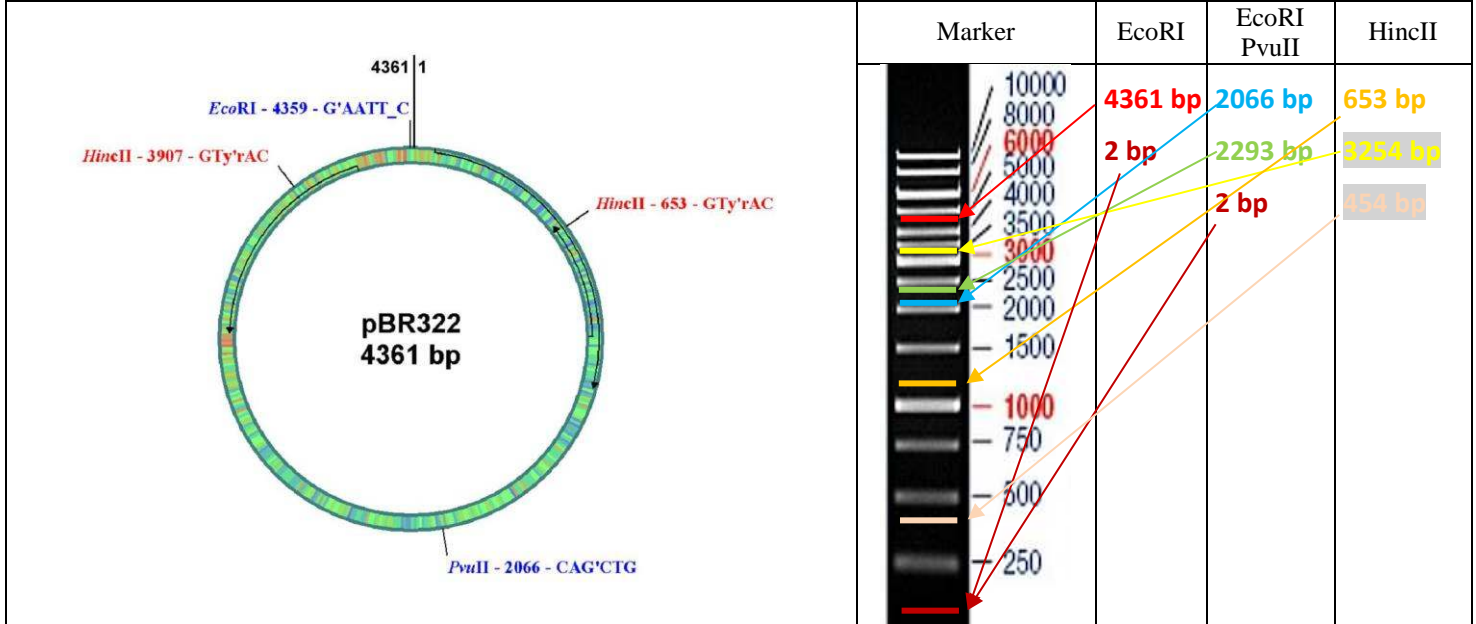
c) 94% PCR hatékonyságot feltételezve hányszor több anyag volt az 1-es mintában?

a) 1. minta \gg 26 ciklus, 2. minta \gg 33 ciklus (a piros vonal és a görbék metszéspontjának helye az x tengelyen)

b) $1 = \frac{x \cdot 2^{33}}{y \cdot 2^{26}} = \frac{x}{y} \cdot \frac{2^{33}}{2^{26}} = \frac{x}{y} \cdot 2^{33-26} = \frac{x}{y} \cdot 2^7 = \frac{x}{y} \cdot 128 \gg y = x \cdot 128$, vagyis **128 - szor több anyag volt az 1 - es mintában**

c) ugyanez 94%-os hatásfok mellett: $1 = \frac{x \cdot 1,94^{33}}{y \cdot 1,94^{26}} = \frac{x}{y} \cdot 1,94^7 = \frac{x}{y} \cdot 103,42 \gg \mathbf{103,42 - szer\ több\ anyag\ volt\ az\ 1 - es\ mintában}$

Az alábbi plazmidot vetjük alá restrikciós emésztésnek és agaróz gélelektroforézissel analizáljuk az emésztett DNS-eket. Számolja ki a fragmentumok méretét és jelölje be a DNS markerhez viszonyítva. (3-féle emésztés!)



A membrándiffúziót leíró egyenlet: $s = (4 \times D \times t)^{1/2}$

s: átlagosan megtett távolság, $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (diffúziós állandó), t: idő

Átlagosan mennyi idő szükséges egy $3 \mu\text{m}$ átmérőjű sejt esetén egy lipid molekulának, hogy a sejt egyik végéről átérjen a sejt ellentétes oldalára? Tételezzük fel, hogy a sejt gömbalakú.

$$d = 3 \mu\text{m} = 3 \cdot 10^{-6} \text{m} \gg r = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{m}$$

$$\Delta s = r \cdot \pi = (4 \cdot D \cdot t)^{1/2}$$

$$t = \frac{r^2 \cdot \pi^2}{4 \cdot D} = 5,55 \cdot 10^{-6} \text{s}$$

$5,55 \cdot 10^{-6} \text{s}$ szükséges egy lipid molekulának,
hogy a sejt egyik végéről átérjen az átellenes oldalra

