

# *Eesti koolinoorte 56. bioloogiaolümpiaad*

## *Lõppvooru biokeemia praktikum*

---



Eesnimi: .....

Perekonnanimi: .....

Juhendajad:

Andres Ainelo, Hanna Ainelo, Kristina Põšnograjeva (TÜ MRI)

Punktid: 37

### **Redutseerivate suhkrute kontsentratsiooni määramine**

Selles praktikumis on Sinu ülesandeks koostada suhkrute määramiseks kaliibergraafik ning määrata selle abil suhkrute kontsentratsioonid uuritavates proovides.

**NB!**

Enne töö alustamist loe kindlasti läbi automaatpipeti kasutamise õpetus! Pane tähele töös olevaid ohutust puudutavaid märkusi, mis on **paksus kirjas** välja toodud! Kontrolli kummagi töö juures olevat vahendite nimekirja ning kui Sinu töölaual miski puudub, anna assistendile kohe märku!

## **Automaatpipeti kasutamise õpetus**

Automaatpipetiga saab täpselt pipeteerida enda valitud mahtu vedelikku. Igal automaatpipetil on peal mahuvahemik, milles seda reguleerida saab. Vahemik on antud mikrolitrites. Mahtu reguleeritakse pipeti ülaosas musta ratast keerates. Valitud maht on näha aknakeses. Kriipsukesega on eraldatud kas mikrolitri komakoht (kõige alumine number) või milliliiter (kõige ülemine number). Näiteks: „100|0“ = 100,0 µl, kuid kui esimene number on kriipsu taga, siis „1|000“ = 1000 µl = 1 ml. Samamoodi „10|00“ = 10,00 µl. **Ole hoolas ja ära kunagi keera pipetti selle mõõtevahemikust välja! Võid pipeti rikkuda!**

**Pipetti kasutatakse alati koos vastava pipetiotsikuga:** kuni 1 ml võimaldavale pipetile sinised, väiksematele kollased. Otsiku võtmiseks suru pipett lihtsalt otse karbis oleva otsiku külge. Pärast pipeteerimist vajuta pipetinupu juures olevale klahvile, et otsik prüginousse lasta. Ära otsikut käega puutu! **Laboriassistendid jälgivad selle punkti täitmist eriti rangelt! Ilma otsikuta reostad pipeti!**

Otsik on ühekordseks kasutamiseks, eriti kui kasutad seda mingi alglahuse võtmiseks. Kui näiteks võtad ühe otsikuga valguvärvi, pipeteerid selle valguproovi sisse ja seejärel sama otsiku uuesti värvinoosse paned, reostad värvi ja Su edasise töö täpsus kannatab.

Pipeteerimiseks kasuta nuppu pipeti otsas. Nupp liigub alla kahes järgus: esmalt kuni mõõdupunktini ja siis juba raskemalt edasi tühjendamispunktini. Valitud ruumala sisse võtmiseks vajuta nupp kõigepealt mõõdupunktini alla, pane otsik vedelikku ja lase nupp sujuvalt üles. Vedeliku välja laskmiseks teise tuubi vajuta nupp sujuvalt täiesti alla. Mõõdupunktist üle vajutamine tühjendab otsiku täielikult.

## **Üldised töövahendid:**

### **Ühised:**

- spektrofotomeeter
- kaal
- destilleeritud vee pudel (pesuks)
- jääkide anum
- kuivatuspaber
- 100 °C termostaat

### **Tehnilised vahendid (Sinu laual):**

- 10-100 või 20-200 µl automaatpipett
- 100-1000 µl automaatpipett
- kollased pipetiotsikud
- sinised pipetiotsikud
- plastküvett
- tühjad mikrotuubid
- millimeetripaber
- marker
- vortex-segaja
- jääkarp

## Töö 1. DNS reaktiivi kalibreerimine glükoosiga.

Keemiliste ainete hulga määramiseks lahuses on mugav kasutada kolorimeetrilisi reaktsioone. Nende üldvalemiks on:



Kui reaktiivi A on reaktsioonisegus ülehulgas, siis sõltub tekkiva värvilise molekuli A\* hulk otseselt alguses proovis olnud uuritava aine B kogusest. Tekkiva värvilise molekuli kogust on lahuses kerge mõõta spektrofotomeetriga kindlal valguse lainepikkusel.

Suhkrukonsentratsiooni määramiseks kasutame DNS reaktiivi ehk 3,5-dinitrosalitsüülhapet. DNS reaktiiv reageerib redutseerivate suhkrutega, ehk suhkrutega, millel on vaba aldehüüd- või ketorühm. Selle reaktsiooni produktiks on 3-amino-5-nitrosalitsüülhape, mis neelab valgust lainepikkusel 540 nm.

### Millist värvi on 3-amino-5-nitrosalitsüülhape? (1 p)

---

Kuna spektrofotomeeter annab meile teada vaid reaktsioonil saadud lahuse optilise tiheduse, tuleb meil tundmatute suhkrulahuste kontsentratsioonide määramiseks esmalt teha seeria kaliiberreaktsioone. See tähendab DNS reaktsiooni läbiviimist rea teadaoleva kontsentratsiooniga suhkrulahustega. Nii saame hiljem vastavusse viia spektrofotomeetri näidud ja alglahuse suhkrusisaldused.

### Vahendid:

- Glükoos, 10 mM
- Vesi (H<sub>2</sub>O)
- DNS reaktiiv
- Tundmatu kontsentratsiooniga glükoosilahus X

### Töö käik:

Esmalt tuleb Sul valmistada rida teadaoleva kontsentratsiooniga glükoosilahuseid. **Arvuta ning kanna allolevasse tabelisse, mitu µl glükoosi ja vett pead iga kaliiberlahuse valmistamiseks võtma, kui proovi lõppmaht on 500 µl. (4 p)**

Glükoosi, mM	Vett, µl	glükoosilahust, µl
0		
0,2		
0,6		
1,0		
1,4		
1,8		
2,0		

Täidab assistent!		
	+/-	Allkiri
1		
2		

**Enne jätkamist kutsu laboriassistent oma tulemusi kontrollima.**

Kui kõik on õigesti arvatud, annab assistent Sulle selle kohta allkirja ja Sa võid edasi töötada.

Kui arvutustes on vigu, märgib assistent selle ära ja sa võid kas ühe korra uuesti proovida (sellisel juhul saad arvutuse eest maksimaalselt 3 p) või kohe õiged vastused saada (sellisel juhul arvutuse eest punkte ei saa).

Kui teisel korral samuti vale tulemus on, annab assistent jätkamiseks õiged vastused.

**Kui õiged vastused on käes, pipeteeri mikrotuubidesse kokku kaliiberlahused.**

DNS reaktsiooni läbi viimiseks lisa igale omatehtud glükoosiproovile ja ka tundmatule X proovile 500 µl DNS reaktiivi. **NB! Reagent määrab nii sind kui pipette! Kasuta DNS reaktiivi pipeteerimiseks filtriga otsikuid (eraldi karbis)!** Loksuta tuube, et reaktiiv ja glükoosilahus korralikult seguneksid.

**Käivita reaktsioon, asetades tuubid 100 °C termostaati.** Reaktsioon peab käima 5 minutit, seejärel tõsta proovid jääkarpi jahtuma. **Oluline on, et kõik kaliiberproovid ja ka hiljem mõõdetavad proovid saaksid võimalikult võrdse aja kuumutatud!** Kui proovid jäävad kauemaks termostaati, märgi endale kuumutusaeg üles ja kasuta ka järgnevate proovidega sama aega.

Kui proovid on jahtunud, mõõda spektrofotomeetriga kõigi proovide neelduvus lainepikkusel 540 nm (täpsem juhised on järgmisel leheküljel).

Spektrofotomeetri kasutamiseks tuleb masin esmalt nullida õhu vastu. Selleks tuleb veenduda, et masinas ei oleks küveti sees ning siis vajutada küveti ikooniga nuppu. Seda protseduuri tuleb korrata, kui tühja masina näit ei ole null.

Proovi mõõtmiseks vala lahus küveti. Kogu küvetti ei pea täis saama ja kogu lahust ei pea ära valama. Piisab, kui küveti kitsam osa on täidetud. Seejärel aseta küvetti spektrofotomeetrisse nii, et valguskiir tabaks kolmnurgaga tähistatud külge, milles on kitsas läbipaistev aken. Näidu lugemiseks sulge aparadi kaas ning märgi tulemus allolevasse tabelisse. Kalla mõõdetud proov jääkide anumasse, loputa küveti destilleeritud veega ning kuivata paberiga. Kuna spektrofotomeetrid on labori peale ühised ning on kõik õhu vastu nullitud, ei pea Sa kõiki oma proove järjest mõõtma. Sel ajal, kui Sina oma küveti puhastad, võib teine õpilane oma proovi mõõta.

**Kanna tulemused tabelisse ja arvuta ka glükoosi kontsentratsioon ühikutes g/l (glükoosi molekulmass on 180 g/mol (6 p))**

Kontsentratsioon, mM	Kontsentratsioon, mg/l	Optiline tihedus ( $A_{540}$ )
0		
0,2		
0,6		
1,0		
1,4		
1,8		
2,0		
<b>X</b>	tundmatu	

**Koosta teadaolevate kontsentratsioonidega proovide tulemuste põhjal millimeetripaberile kaliibergraafik, millel kujutad  $A_{540}$  sõltuvust glükoosi kontsentratsioonist proovis (mg/l!). Tõmba graafikule lineaarne kalibratsioonisirge. Kui kõige lahjema ja kõige kangema proovi andmepunktid ei asu teistega ühel sirgel, siis ära neid kalibratsioonisirge joonistamisel arvesta. NB! Märgi kindlasti millimeetripaberile oma nimi! (6 p)**

Leia kaliibergraafikut kasutades glükoosi kontsentratsioon proovis **X**. (5p)

**Proovi X kontsentratsioon on .....**

## Töö 2. Glükoositableti ja mee monosahhariidide sisalduse mõõtmine.

### Vahendid:

- 2 tühja 50 ml tuubi
- vesi (H<sub>2</sub>O)
- DNS reaktiiv
- glükoositablett
- mesi

Esmalt kaalu kumbki tuub koos korgiga ära, märgi kaal allolevasse tabelisse

Ühte tuubi aseta üks glükoositablett ja teise vala väike sorts vedelat mett (50 ml tuubi umbes koonilise osa poole peale; 1-2 g piisab). Kaalu tableti ja meega tuubid ära, kanna tulemus tabelisse. Vala kummassegi tuubi vett 40 ml-ni.

**Lahusta mesi ja glükoositablett.** Selleks võid kasutada laual olevat vortex-segajat. Glükoositabletist jääb tuubi valgeid lahustumatuid helbeid, need ei sega mõõtmist. Peamine, et tableti põhiosa oleks lahustunud. **Arvuta mee ja glükoositableti massid ning saadud lahuste kontsentratsioonid. (2 p)**

	tühi tuub, g	täis tuub, g	aine mass, g	konts. g/l
MESI				
TABLETT				

Lahjenda kumbki lahus esmalt kontsentratsioonini 5 g/l. Saadud lahjendusi lahjenda omakorda kontsentratsioonini 0,2 g/l. Esmalt tee allpool vajalikud arvutused ja seejärel valmista lahjendused.

500 µl 5 g/l lahuse saamiseks (lõppmaht vali ise vastavalt vajadusele ja võimalustele) vajan: (3 p)

meelahust \_\_\_\_\_ µl ja vett \_\_\_\_\_ µl

glükoositabletilahust \_\_\_\_\_ µl ja vett \_\_\_\_\_ µl

Saadud lahjenduse edasiseks lahjendamiseks 0,2 g/l-ni (lõppmahuga 500 µl) vajan: (1 p)

5 g/l lahust \_\_\_\_\_ µl ja vett \_\_\_\_\_ µl

Saadud 500 µl 0,2 g/l lahustele lisa 500 µl DNS reaktiivi ja vii seejärel läbi kuumtöötlus samamoodi nagu kaliibergraafiku valmistamisel. Mõõda saadud lahuste optilised tihedused lainepikkusel 540 nm ning määra kaliibergraafikult proovide redutseerivate sahhariidide sisaldus g/l! (6 p)

	A <sub>540</sub>	Suhkrute kontsentratsioon g/l
Mesi		
Glükoositablett		

Arvuta mee ja glükoositableti protsentuaalne suhkruisaldus! Eelda, et kõik suhkrud neis on redutseerivad sahhariidid. (2 p)

Mee suhkruisaldus on \_\_\_\_\_%

Glükoositableti suhkruisaldus on \_\_\_\_\_%

Otsusta, millised väited mee kohta on tõesed. Tõesed tähistä +, väärä –. (2 p)

Väide	Otsus
Mesi on mesilase metabolismi jääkprodukt	
Mesilased kannavad kogutud nektari tarru maos	
Mesilased töötlevad mee toorainet ensüümidega ja aurustavad sellest enamiku vett	
Mett kogutakse taru soojaisolatsiooniks	
Meele annavad magususe monosahhariidid fruktoos ja glükoos	