

KURSKOMPENDIUM

BI 1001

CELLE- OG MOLEKYLÆR BIOLOGI



VÅREN 2013

**INSTITUTT FOR BIOLOGI
NORGES TEKNISK-
NATURVITSKAPELEGE UNIVERSITET**



Innhold

FORORD	4
KURSPLAN VÅREN 2013	5
REGLAR PÅ LABORATORIET	8
SIKKERHEIT PÅ LABORATORIET	9
NATURVITSKAPLEG METODE	11
SKRIVING AV LABRAPPORTAR I BI1001.....	13
REFERANSAR.....	15
ANDRE DETALJAR SOM KAN VERE GREITT Å VITE NÅR EIN SKRIV VITSKAPLEGE TEKSTAR	17
NAMN PÅ FILA	17
REGLAR FOR BRUK AV VITSKAPLEGE NAMN (NOMENKLATUR)	17
KORLEIS LAGE EIN GOD FIGUR?	17
INNLEVERINGSFRISTAR	18
PLAGIERING	18
FRÅVER.....	18
MIKROSKOPET SI OPPBYGGING OG BRUK	19
BRUK AV ZEISS KF2 KURSMIKROSKOP	21
GODE RÅD VED BRUK AV MIKROSKOP	22
OPPGÅVE 1 – PLANTECELLA.....	23
OPPGÅVE 1A – PLASMASTRØYING I HÅRCELLER FRÅ CUCURBITA PEPO (GRASKAR)	24
OPPGÅVE 1B – PLASMASTRØYING I BLADCELLER FRÅ ELODEA Densa (VASSPEST).....	24
OPPGÅVE 1C – PERMEABILITET I BLADCELLER FRÅ ELODEA Densa (VASSPEST)	24
ALTERNATIVE OPPGÅVER – LYSMIKROSKOPI OG PLANTECELLA.....	24
OPPGÅVE 2 – MIKROBIOLOGI	26
DIAGNOSTIKK AV BAKTERIAR.....	26
FARGING AV LEVANDE PREPARAT	27
UV-BESTRÅLING	27
ANTIBIOTIKARESISTENS.....	28
OPPGÅVE 2A – VERKNAD AV UV-BESTRÅLING PÅ BAKTERIEKULTUR.....	29
OPPGÅVE 2B – MIKROSKOPERING AV LEVANDE BAKTERIAR	29
OPPGÅVE 2C – GRAMFARGING AV BAKTERIAR	30
OPPGÅVE 2D – VERKNAD AV ANTIBIOTIKA PÅ BAKTERIEKULTUR.....	30
OPPGÅVE 2E – KVA FINN VI AV BAKTERIAR I KVARDAGEN?	30
ALTERNATIVE OPPGÅVER – MIKROBIOLOGI.....	31
OPPGÅVE 3 – MITOSE HOS PLANTECELLER	33
OPPGÅVE 3A – ROTSPISS AV VICIA FABA (BØNNEVIKKE).....	35
OPPGÅVE 3B – KROMOSOMFARGING – FRAMSTILLING AV "SQUASH"-PREPARAT	35
ØVING I PIPETTERING	35
ALTERNATIVE OPPGÅVER – MITOSE HOS PLANTECELLER	37
OPPGÅVE 4 – BLOD	38
BLODET SI SAMANSETNING OG FUNKSJON	38
BLODPLASMA	38
BLODCELLER.....	39
STAMCELLER OG FORNYING AV BLODCELLENE	41
BETENNELSE.....	41
BLODUTSTRYK.....	43
OPPGÅVE 4A – MIKROSKOPERING AV BLOD FRÅ MENNESKE	43
OPPGÅVE 4B – TILLAGING OG MIKROSKOPERING AV BLODUTSTRYK	43
4C – OSMOSE I BLODCELLER.....	44
ALTERNATIVE OPPGÅVER – BLOD	45
OPPGÅVE 5 – CELLULÆR RESPIRASJON	46

OPPGÅVE 5A – PRODUKSJON AV CO ₂ UNDER FERMENTERING	47
OPPGÅVE 5B – OKSYGENOPPTAK UNDER AEROB RESPIRASJON	48
ALTERNATIVE OPPGÅVER – CELLULÆR RESPIRASJON	49
OPPGÅVE 6 – KARBOHYDRAT	51
KARBOHYDRAT	51
STIVELSE OG GLUKOSE	51
JOD-KALIUMJODIDTEST FOR PÅVISING AV STIVELSE	52
SPEKTROFOTOMETRI	52
PÅVISING AV STIVELSESENNEHALD I MJØL VED HJELP AV GOPOD-METODEN OG SPEKTROFOTOMETRI	53
OPPGÅVE 6 – PÅVISING AV STIVELSE OG GLUKOSE I MJØLPRØVER	54
FRAMGANGSMÅTE DEL 1	55
FRAMGANGSMÅTE DEL 2	56
KORLEIS LAGE STANDARDKURVE I EXCEL OG BEREKNE GLUKOSEKONSENTRASJONEN I MJØLPRØVENE UT IFRÅ DENNE:	57
ALTERNATIVE OPPGÅVER – KARBOHYDRAT	58
OPPGÅVE 7 – NUKLEINSYRER	60
ISOLERING AV DNA	60
KROMATOGRAFI	60
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	61
AGAROSE GELELEKTROFORESE	62
OPPGÅVE 7A – ISOLERING AV DNA FRÅ LAKSEMJØLKE OG PÅVISING AV BASAR	64
LABDAG 1: ISOLERING AV DNA FRÅ LAKSEMJØLKE	64
LABDAG 2: SYREHYDROLYSE OG BASEPÅVISING	65
OPPGÅVE 7B – PÅVISING AV INTRON I GENOMISK DNA	66
LABDAG 1: PCR	66
LABDAG 2: AGAROSE GELELEKTROFORESE	67
ALTERNATIVE OPPGÅVER – NUKLEINSYRER	67
OPPGÅVE 8 – PROTEIN	69
EFFEKT AV PH OG TEMPERATUR PÅ MYROSINASEAKTIVITET	69
DIALYSE	70
COMBUR-TEST	70
ENZYMTEST	70
INNLEIING OPPGÅVE 8 – EKSTRAHERING AV PROTEIN FRÅ FRØ	70
OPPGÅVE 8A – PÅVISING AV PROTEIN I MJØL FRÅ KVITSENNEP	71
OPPGÅVE 8B – DIFFUSJON GJENNOM MEMBRANAR	71
OPPGÅVE 8C – TEST AV MYROSINASEAKTIVITET	72
DIALYSE AV RÅEKSTRAKT	72
A. ENZYMAKTIVITET VED VARIERANDE pH	72
B. ENZYMAKTIVITET VED VARIERANDE TEMPERATUR	73
ALTERNATIVE OPPGÅVER – PROTEIN	73

FORORD

Det praktiske laboratoriekurset i BI 1001 går over 10 dagar og behandlar 8 tema. Kurset er delt inn i ulike emne: lysmikroskopi, plantecella, mikrobiologi, mitose, blodceller, respirasjon, karbohydrat, nukleinsyrer og enzym. I tillegg blir det gjeve ei kort innføring i "Sikkerheit på laboratoriet". Både det teoretiske stoffet og dei praktiske oppgåvene blir rekna som pensum i BI1001. Grundig arbeid med labrapportane vil òg gje ei djupare forståing av dei ulike emna som blir forelest. Labkompendiet vil berre finnest som PDF-dokument på It's learning, så dette må studentane skrive ut sjølv.

For å få høgast utbytte av kurset må ein ha lese gjennom oppgåvene på førehand.

Kurset vil vere ei innføring i korleis ein rapporterar forsøksresultat i celle- og molekylærbiologi. Rapportane bør i store trekk følgje ei fast inndeling, som skildra under "Skriving av labrapportar i BI1001".

Oppmøte er obligatorisk alle kursdagar, berre fråver i samband med sjukdom eller dødsfall er akseptert. Dette må kunne dokumenterast neste labdag

Kvar student skal skrive sin eigen rapport som leverast på It's learning innan ei veke etter fullført labforsøk. Alle rapportane MÅ vere godkjente for å få gå opp til eksamen.

På grunn av sikkerheita og plassmangel på undervisningslabene er det ikkje tillate å ta med ytterklede og vesker/sekkar/bager inn. Det finst garderobeskap i DU3 (hugs hengelås) som er reservert biologistudentar.

Det einaste som skal vere med på laben er labfrakk, vernebriller, labkompendium og naudsynte skrivesaker.

Det er obligatorisk med labfrakk (kjøp hos Tapir eller linjeforeningane) og vernebriller (kr 50 første labdag)

KURSPLAN VÅREN 2013

LABKURS BI1001-vår 2013

Parti A og B: tirsdager kl. 10.15-13.00

Parti C og D: tirsdager kl. 13.15-16.00

Parti E og F: torsdager kl. 09.15-12.00

Parti A - Cellebio.lab. (D1-124)

Labdag	Ukedag	Dato	Uke nr.	Tid	Oppgave
1	Tirs.	22.jan	4	10.15-13.00	Lysmikroskopi. Plantecellen (D1-114)
2	Tirs.	29.jan	5	10.15-13.00	Mikrobiologi
3	Tirs.	05.feb	6	10.15-13.00	Mitose
4	Tirs.	12.feb	7	10.15-13.00	Blodceller
5	Tirs.	19.feb	8	10.15-13.00	Respirasjon
6	Tirs.	26.feb	9	10.15-13.00	Karbohydrater
7	Tirs.	05.mar	10	10.15-13.00	DNA med PCR-teknikk (del 1) (D1-114)
8	Tirs.	12.mar	11	10.15-13.00	DNA med PCR-teknikk (del 2) (D1-114)
9	Tirs.	19.mar	12	10.15-13.00	Enzym (del 1)
10	Tors.	21.mar	12	09.15-12.00	Enzym (del 2)

Parti B - Plantefys.lab. D1-114

1	Tirs.	29.jan	5	10.15-13.00	Lysmikroskopi. Plantecellen
2	Tirs.	05.feb	6	10.15-13.00	Mikrobiologi
3	Tirs.	12.feb	7	10.15-13.00	Mitose
4	Tirs.	19.feb	8	10.15-13.00	Blodceller
5	Tirs.	26.feb	9	10.15-13.00	Karbohydrater
6	Tirs.	05.mar	10	10.15-13.00	Respirasjon (D1-124)
7	Tirs.	12.mar	11	10.15-13.00	Enzym (del 1) (D1-124)
8	Tors.	14.mar	11	09.15-12.00	Enzym (del 2) (D1-124)
9	Tirs.	19.mar	12	09.15-12.00	DNA med PCR-teknikk (del 1)
10	Tirs.	09.apr	15	10.15-13.00	DNA med PCR-teknikk (del 2)

Parti C - Cellebio.lab. (D1-124)

1	Tirs.	22.jan	4	13.15-16.00	Lysmikroskopi. Plantecellen (D1-114)
2	Tirs.	29.jan	5	13.15-16.00	Mikrobiologi
3	Tirs.	05.feb	6	13.15-16.00	Mitose
4	Tirs.	12.feb	7	13.15-16.00	Blodceller
5	Tirs.	19.feb	8	12.15-15.00	Respirasjon
6	Tirs.	26.feb	9	13.15-16.00	Karbohydrater (D1-114)
7	Tirs.	05.mar	10	13.15-16.00	DNA med PCR-teknikk (del 1) (D1-114)

8	Tirs.	12.mar	11	13.15-16.00	DNA med PCR-teknikk (del 2) (D1-114)
9	Tirs.	19.mar	12	13.15-16.00	Enzym (del 1)
10	Tors.	21.mar	12	14.15-17.00	Enzym (del 2)

Parti D - Plantefys.lab. D1-114

1	Tirs.	29.jan	5	13.15-16.00	Lysmikroskopi. Plantecellen
2	Tirs.	05.feb	6	13.15-16.00	Mikrobiologi
3	Tirs.	12.feb	7	13.15-16.00	Mitose
4	Tirs.	19.feb	8	13.15-16.00	Blodceller
5	Tirs.	26.feb	9	13.15-16.00	Karbohydrater
6	Tirs.	05.mar	10	13.15-16.00	Respirasjon (D1-124)
7	Tirs.	12.mar	11	13.15-16.00	Enzym (del 1) (D1-124)
8	Tors.	14.mar	11	14.15-17.00	Enzym (del 2) (D1-114)
9	Tirs.	19.mar	12	12.15-15.00	DNA med PCR-teknikk (del 1)
10	Tirs.	09.apr	15	13.15-16.00	DNA med PCR-teknikk (del 2)

Parti E - Cellebio.lab. (D1-124)

Labdag	Ukedag	Dato	Uke nr.	Tid	Oppgave
1	Tors.	24.jan	4	09.15-12.00	Lysmikroskopi. Plantecellen (D1-114)
2	Tors.	31.jan	5	09.15-12.00	Mikrobiologi
3	Tors.	07.feb	6	09.15-12.00	Mitose
4	Tors.	14.feb	7	09.15-12.00	Blodceller
5	Tors.	21.feb	8	09.15-12.00	Karbohydrater
6	Tors.	28.feb	9	09.15-12.00	Respirasjon
7	Tors.	07.mar	10	09.15-12.00	DNA med PCR-teknikk (del 1) (D1-114)
8	Tors.	14.mar	11	09.15-12.00	DNA med PCR-teknikk (del 2) (D1-114)
9	Tirs.	09.apr	15	09.15-12.00	Enzym (del 1)
10	Tors.	11.apr	15	09.15-12.00	Enzym (del 2)

Parti F - Plantefys.lab. D1-114

1	Tors.	31.jan	5	09.15-12.00	Lysmikroskopi. Plantecellen
2	Tors.	07.feb	6	09.15-12.00	Mikrobiologi
3	Tors.	14.feb	7	09.15-12.00	Mitose
4	Tors.	21.feb	8	09.15-12.00	Blodceller
5	Tors.	28.feb	9	09.15-12.00	Respirasjon
6	Tors.	07.feb	10	09.15-12.00	Karbohydrater (D1-124)
7	Tirs.	19.mar	12	15.15-18.00	Enzym (del 1)
8	Tors.	21.mar	12	09.15-12.00	Enzym (del 2)

9	Tors.	11.apr	15	09.15-12.00	DNA med PCR-teknikk (del 1)
10	Tors.	18.apr	16	09.15-12.00	DNA med PCR-teknikk (del 2)

	Thuy Nguyen (koord)	thuy.nguyen@bio.ntnu.no
MF	Marian Førde	marian.forde@bio.ntnu.no
MO	Marianne Olufsen	marianne.olufsen@bio.ntnu.no
RR	Randi Røsbak	randi.rosbak@bio.ntnu.no
TS	Torfinn Sparstad	torfinn.sparstad@bio.ntnu.no
JN	Javad Najafi	javad.najafi@bio.ntnu.no
MFA	Mohsen Falahati-Anbaran	mohsen.falahati@bio.ntnu.no
DS	Dagfinn B Skomsø	dagfinnb@stud.ntnu.no
MB	Marit Bakke	maritoie@stud.ntnu.no
GB	Gunn Broli	gunnb@stud.ntnu.no
	Ingeborg Husby (tekniker)	ingeborg.husby@bio.ntnu.no

REGLAR PÅ LABORATORIET

ORDEN

Alle er til ei kvar tid ansvarlege for å halde orden på laben.

Dette inneber at alle skal:

- rydde og vaske eget labutstyr og eigen benkeplass.
- rydde og gjere reint etter seg så snart arbeid på fellesområde er avslutta.

GENERELL SIKKERHEIT

- Arbeide med giftige eller illeluktande stoff skal alltid gå føre seg i avtrekk.
- Bruk vernebriller, hanskar, verneforkle og munnbind kor det trengst.
- Det er PÅBODE å bruke labfrakk og vernebriller.
- Ikkje slå sterkt giftige eller brennbare kjemikaliar i vasken. Dette skal samlast i eigne avfallsflasker.
- Søl med vatn eller kjemikaliar skal fjernast med éin gong.
- Hanskar skal byttast ofte. Om du har søl eller mistankar om søl på hanskane skal dei byttast med éin gong.

ETING, DRIKKING, BRUK AV SNUS OG SMINKING PÅ LABORATORIET ER FORBODE!

AVFALL

- Risikoavfall, for eksempel bakterierestar eller anna biologisk materiale, skal leggst i eigne risikoavfallsboksar.
- Glas og stikkande avfall skal leggst i eigen boks merka med glasavfall.
- Vanleg avfall som hanskar, papirtørk, eingongsplast (som ikkje er kontaminert med biologisk materiale) skal kastast i vanleg avfall (svartsekk).

VIT KVA DU HELD PÅ MED!

- Les teori og laboppskrifter nøye før du startar.
- Sjekk HMS datablad til reagensane du skal bruke.
- Sett deg inn i korleis utstyret skal brukast.
- Marker alltid reagensrør/eppendorfrør og liknande så du alltid har kontroll på kva dei inneheld.

DET ER BETRE Å SPØRRE EIN GONG FOR MYKJE ENN EIN GONG FOR LITE!

SIKKERHEIT PÅ LABORATORIET

Dei vanlegaste årsakene til ulykker på laben er brann og sprut av kjemikaliar.

Les **BRANNINSTRUKSEN** som finst i korridoren, og gjer deg kjent med kor du finn:

- Brannalarm
- Brannslökkingsapparat (CO₂, pulver, brannslange)
- Brannteppe
- Naudutgang
- Nauddusj
- Augeskyljeflaske
- HMS datablad. Disse er til for å slå opp i viss du ikkje veit om det du jobbar med er farleg. Kartotek over kjemikaliar finst på laben eller på NTNU's HMS-side på web: <http://www.nt.ntnu.no/adm/hms/>

BRUK AV KJEMIKALIAR

Dei viktigaste farane er:

- Etseskader
- Akutt forgifting
- Kronisk forgifting
- Mutagen/karsinogen (kreftframkallande) verknad

For mange kjemikaliar er farane kjent, MEN det blir stadig laga nye kjemikaliar med ukjente verknader, og det blir ofte oppdaga at kjente kjemikaliar er farlegare enn ein først var klar over.

DERFOR: GENERELL FORSIKTIGHEIT ER VIKTIG!



Adressa, 11.12.2009:

Omkom da tyggisen eksploderte i munnen

En ukrainsk kjemistudent omkom da tyggisen eksploderte i munnen på ham, opplyser politiet.

25 år gamle Vladimir Likhonos, som studerte kjemi ved Kievs polytekniske institutt, skal ved en tabbe ha dyppet tyggisen sin i et eksplosivt pulver. Da han stappet den i munnen smalt det.

Likhonos fikk halve kjeven og ansiktet revet av i den kraftige eksplosjonen, og livet hans sto ikke til å redde.

25-åringen trodde angivelig at han dyppet tyggisen i sitronsyre, noe han ofte gjorde for å forlenge smaken. I stedet dyppet han den i et betydelig mer eksplosivt pulver som han hadde på laboratoriebenken.

Politiet fant rundt 100 gram av det eksplosive pulveret, som av utseende lignet på sitronsyre.
- Alle kunne ha tatt feil av dem, sier politiets talskvinne Elvira Biganova.

DAGENS FARESYMBOLER	NYE FARESYMBOLER
SYMBOLER FOR FYSIKALSK-KJEMISKE EGENSKAPER	
 <p>MEGET BRANNFARLIG EKSTREMT BRANNFARLIG</p>	
 <p>OKSIDERENDE EKSPLOSIV</p>	
SYMBOLER FOR HELSEFARE	
 <p>MEGET GIFTIG GIFTIG</p>	 <p>(Akutt helsefare) (Kronisk helsefare)</p>
 <p>HELSESKADELIG IRRITERENDE</p>	
 <p>ETSENDE</p>	
SYMBOL FOR MILJØFARE	
 <p>MILJØSKADELIG</p>	

NATURVITSKAPLEG METODE

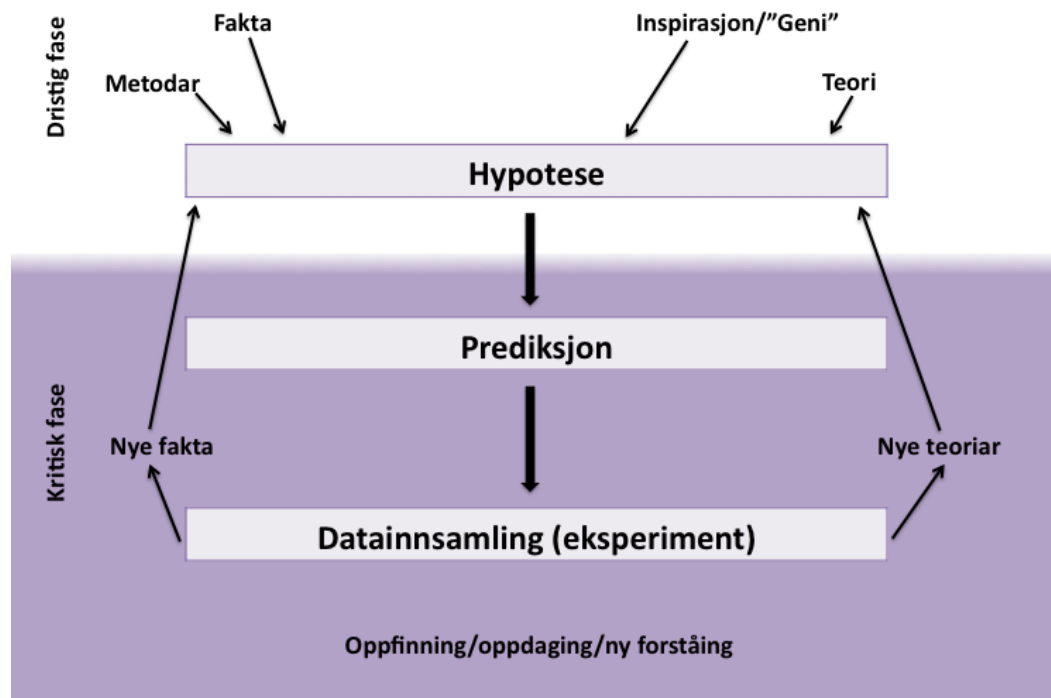
Eit viktig mål med labkurset er at studentane skal få kjennskap til den naturvitskaplege metoden, også kalla den hypotetisk-deduktive metoden. For å skjønne korleis metoden er bygga opp er det viktig å forstå korleis ein formar hypotesar og konklusjonar gjennom **induktiv** og **deduktiv resonnering**. **Induktiv resonnering** betyr at ein baserer hypotesane på spesifikke observasjonar som leiår til generelle konklusjonar. Viss ein for eksempel har observert månen i eit år formar ein kanskje hypotesen "det er fullmåne ein gong i månaden". Dette er kanskje den vanlegaste måten å forme hypotesar og konklusjonar på i kvardagen [1].

Deduktiv resonnering blir vanlegvis brukt etter at ein har forma ein hypotese. Frå generelle premissar predikerer (reknar seg til på førehand/"spår") ein kva spesifikke resultat ein kan forvente seg dersom premissane er sanne. Viss alle organismar er bygd opp av celler (premiss 1), og menneske er organismar (premiss 2), då vil menneske vere bygde opp av celler (deduktiv prediksjon om eit spesifikt tilfelle). Det er deduktiv resonnering som ligg til grunn for den naturvitskaplege metoden [1].

Viss ein observerer at ei lommelykt ikkje lyser kan hypotesen for eksempel vere "lommelykta lyser ikkje fordi batteria er tomme" eller "lommelykta lyser ikkje fordi pæra har gått." Det normale vil då vere å prøve ut både nye batteri og ny pære for å få lommelykta til å lyse igjen. Vi seier at ein prøver å falsifisere hypotesane. Viss lykta framleis ikkje lyser sjølv om ein skiftar batteri er hypotesen om at batteria er tomme falsifisert. Viss lykta lyser etter å ha skifta pære er hypotesen om at pæra var gått **ikkje falsifisert** [1]. Det er denne tankegangen ein nyttar i naturvitskapleg forskning – ein formar alternative hypotesar, deretter prøver ein å falsifisere dei. Viss ein ikkje klarer å falsifisere ein hypotese betyr det ikkje at ein har bevist at hypotesen er sann. Sjølv om lykta lyste når ein skifta pære er det ikkje sikkert at den gamle pæra eigentleg hadde gått – kanskje ho berre var sett inn feil! Ein vil aldri kunne teste absolutt alle alternative hypotesar, og ein kan derfor ikkje vere sikker på at ein hypotese er sann. Ein kan derimot gjennomføre forsøk som **støttar** hypotesen [1].

"The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact."
(Thomas Huxley 1825-95)

For at ein hypotese skal vere vitskapleg må to krav vere oppfylt: han må vere mogeleg å teste, og han må vere mogeleg å falsifisere [1]. Karl Popper har hevda at viss ein hypotese ikkje kan falsifiserast er ho heller ikkje vitskapleg. På denne måten kan ein skilje vitskap frå pseudovitskap/liksomvitskap. Popper hevda vidare at det vi ser på som "fakta" er hypotesar som har motstått stadige forsøk på falsifisering. Den naturvitskapelege metoden kan delast inn i to fasar: den dristige (idémyldring, utforme hypotesar) og den kritiske (analysere, falsifisere). Den første fasen er kreativ og oppfinnsam **tenking** medan den andre er systematisk og velorganisert **testing** [2]. Metoden er oppsummert i figur 1.



Figur 1. Standardmodellen for naturvitskapleg forskning. Biologisk kunnskap blir kumulativ og utviklar seg innanfor rammene av denne modellen. Tidlegare forskning og teoriar legg grunnlaget for nye hypotesar, og ein prøver å få ny kunnskap om naturen ved å gå gjennom kontrollerte undersøkingar [3].

Litteratur:

1. Campbell, N.A. Biology. 9. utgåve. San Fransisco, USA: Benjamin Cummings; 2011
2. Sjøberg, S. Naturfag som allmenndannelse. 3. utgåve. Oslo: Gyldendal Akademisk Forlag; 2009
3. Strømme, A., (2008). Hva er egentlig biologi? I: van Marion, P. & Strømme, A. (red.), Biologididaktikk. Kristiansand: Høyskoleforlaget; 2008, s. 36

SKRIVING AV LABRAPPORTAR I BI1001.

I arbeidslivet er det vanleg å kommunisere/formidle det arbeidet ein utfører i ein skriftleg rapport. Innan vitenskap er det særskild viktig at forskingsarbeid blir presentert på ein riktig måte: **kort – konsis – kritisk**. Ein skal ikkje skrive for å bruke flest mogeleg ord, men for å få fram forsøket ein har gjort på best mogeleg måte. Vitenskaplege oppdagingar blir sjeldan halde hemmelege, men dei blir vurdert kritisk av kollegaer og av andre forskarar innanfor same fagfelt. Eit av måla med laboratoriekurset er å utvikle skriveferdigheite til studentane ved hjelp av obligatorisk rapportering av oppgåver utført på laboratoriet.

Rapporten skal innehalde følgjande delar:

- **Overskrift:** Same som i laboratorieheftet.
- **Innleiing:** Innleiinga skal KORT samanfatte kva oppgåva går ut på og kva metodar som blei brukt. Maks 3 setningar.
- **Hypotese:** Her skal ein på EIT FAGLEG GRUNNLAG danne ei hypotese for kva ein meiner kjem til å skje i eksperimentet.
- **Teori:** Denne delen skal gi ein KORT faglig bakgrunn for oppgåva som er utført. Viss ein for eksempel har gjort eit forsøk kor ein har utsett plantar for ulik eksponering for lys kan det vere relevant å skrive om fotosyntese, har ein gjort forsøk om fermentering (gjæring) kan det vere relevant å skrive om for eksempel glykolysen. Som regel er det fleire relevante tema som bør vere med i teori. Her er det lov å sette ting i ein større samanheng. Teorien bør heller ikkje vere for lang, maks 1 side eksklusiv bilete (1,5 i linjeavstand, Times New Roman, str. 12).

I teorien er det viktig å bruke kjeldetilvisingar sånn at ein lesar kan leite seg tilbake til kor fagstoffet kjem ifrå. For nærmare forklaring på korleis ein refererar i teksten, sjå avsnittet "Referansar".

- **Materialar og metodar:** Her skal forsøket skildrast på ein slik måte at det kan repeterast. Skildre kort og konsist kva som blei gjort i fortid/preteritum, passiv form. Dette vil seie at ein bør unngå personlege pronomen (eg, vi, meg, oss, osv.). Ein bør òg unngå å starte setningar med "så", "til slutt" osv. Det går faktisk an å få en god flyt i teksten likevel, berre tenk **kort og konsist**:

"det blei blanda 0,5 g sukrose i 2 ml gjærløysing. Utviklinga av gass blei registrert".

Det er VIKTIG at eventuelle endringar i utføring, avvik frå det som står skildra i kompendiet blir tatt med i denne delen. IKKJE diskuter utføringa av forsøket i denne delen av rapporten. Det kan være lurt å starte med denne delen av rapporten sidan ein blir påminna ein del detaljar rundt forsøket. Maks 1/2 side.

- **Resultat:** Skildre resultata som blei oppnådd under forsøket så nøyaktig som mulig; kva blei observert / kva blei målt / analyseresultat. Start med ein innleiande tekst om kva resultat som blei funne. Sjølve resultata bør fortrinnsvis presenterast ved figurar (grafar, diagram, bilete, teikningar) og tabellar dersom mogeleg. ALLE figurar og tabellar skal nummererast (f. eks Tabell 1/Figur 1), og det skal refererast til alle slike objekt i sjølve teksten. Tabellar skal ha ein kort tekst OVER sjølve tabellen som

skildrar innhaldet i tabellen. Figurar skal ha ein kort tekst UNDER figuren som skildrar det figuren viser.

Ein skal IKKJE tolke/diskutere i resultatdelen, berre skildre kva ein fann.

- **Diskusjon:** Diskusjonen er den viktigaste delen av ein rapport, og det er her du verkeleg viser om du har forståing for eksperimentet som er gjennomført. I diskusjonsdelen skal ALLE resultata frå sjølve forsøket analyserast og tolkast. IKKJE gjenta resultata her, referer heller til resultatdelen med figurar og tabellar etc. Forklar på bakgrunn av teorien du har skrive om resultata var som forventa eller ikkje (for eksempel: "det blei utvikla gass i løysinga av sukrose og gjær. Dette stemmer overeins med at gjær gjer seg nytte av energien i sukker ved anaerob celleanding og omdannar det til karbondioksid"). Kva var årsaka til at resultata blei/ikkje blei som forventa? Viss ein har mistankar om at noko gjekk galt som påverka forsøket skal dette diskuterast (for eksempel: "det blei ikkje gassutvikling i gjærløysinga. Grunnen til dette kan vere at sukker blei bytta ut med salt ved ei feiltaking"). Ein skal ikkje diskutere feilkjelder viss ein ikkje har mistanke om at det har skjedd noko feil. Maks 1 side.
- **Konklusjon:** Diskusjonen skal logisk lede fram til ein kort og presis konklusjon av det ein har kome fram til. Konklusjonen blir dermed ei slags oppsummering av resultat og diskusjon. Maks 3 setningar.
- **Litteraturliste:** Viss ein brukar etternamn som kjeldetilvisingar i teksten skal kjeldelista stå i alfabetisk rekkefølge etter førsteforfattar. Viss ein brukar nummerering skal kjeldelista kome i den rekkefølga ein brukte kjeldene i (altså: start med kjelde 1, fortsett med nr. 2, osv.). For meir utfyllande detaljar og eksempel kan VIKO sine sider for referering sjekkast [1].
- **Hugs å skrive namn, parti og nummer på arbeidsbenken i rapporten. Før dette i topptekst/botntekst (header/footer)**

REFERANSAR

I sjølve rapportteksten skal ein bruke kjeldetilvisingar for å vise kor ein har henta fagstoffet ifrå. I dette labkurset skal det brukast Vancouver-stil på referering for å vise til kjeldelista (1). Vær konsekvent og hald same stil gjennom heile rapporten. Ein skal ALLTID starte med kjelde nr. 1 viss ein brukar nummer (deretter nr 2, 3, osv.). Kjeldetilvisingane skal alltid kome til slutt i teksten som er henta frå ei kjelde (referansar skal IKKJE samlast opp i overskrifter, men flettast inn der dei er brukt). Dette kan vere midt inni ei setning, på slutten av ei setning eller på slutten av fleire setningar. Nokre gongar brukar ein same kjelde for eit heilt avsnitt, og då treng ein berre kjeldetilvising på slutten av avsnittet. Tommelfingerregelen er at ein avsluttar kvart avsnitt med ei kjeldetilvising sjølv om du nyttar same kjelde vidare i neste avsnitt. Viss ein brukar figurar skal ein sjølvstøtt ha kjeldetilvisingar på desse òg. Dei skal kome på slutten av figurteksten. Kjeldene skal òg kome FØR punktum, og det skal vere eit mellomrom før kjelda sånn at ho ikkje står rett oppi ordet som kom før, til dømes slik (nr på kjelde). For meir informasjon sjekk VIKO sine sider for referering i Vancouver-stil (2).

For seks eller færre forfattarar skal alle førast opp. Ved fleire enn seks forfattarar: før dei seks første, skriv deretter et al. (dette betyr "med flere")

Bok:

Forfattar(ar) (Etternamn, initial, eventuelt neste forfattar osv.). Tittel på bok. Utgåve – viss tilgjengeleg Stad: Forlag; årstal

Eksempel: Sjøberg, S. Naturfag som allmenndannelse. 3. utgåve. Oslo: Gyldendal Akademisk Forlag; 2009

Antologi (bok med ein redaktør og kor kapitla er skrive av ulike forfattarar)

Forfattar(ar) (Etternamn, initial, eventuelt neste forfattar osv.). Namn på kapittel. I: forfattar. red. Tittel på bok. Stad: Forlag; årstal

Eksempel: Strømme, A. Hva er egentlig biologi? I: van Marion, P. & Strømme, A. (red.), Biologididaktikk. Kristiansand: Høyskoleforlaget; 2008

Tidsskriftartikkel

Forfattar(ar) (Etternamn, initial, eventuelt neste forfattar osv.). Tittel på artikkel. Tittel på tidsskrift/eller forkorting. År;volum(nummer):sidetal. DOI – viss tilgjengeleg

Eksempel: Koag, M.C., Wilkens S., Fenton, R.D., Resnik, J., Vo. E., & Close, T.J. The K-segment of Maize DHN1 Mediates Binding to Anionic Phospholipid Vesicles and Concomitant Structural Changes. Plant Physiology 2009;150:1503-1514

Nettsider:

Forfattar(ar), (Etternamn, initial, eventuelt neste forfattar osv.). Tittel på nettsida [Internett]. Stad: Utgjevar; Publiseringsdato [oppdatert dato; sitert dato]. Tilgjengeleg frå: <http://...>

Eksempel: Fugelsnes, E. (2004). Oppvarmet støv kan gi økte helseplager. Oslo: forskning.no ; 22.03.2004 [22.03.2004; 26.11.2011] Lasta ned 26.11.2011, frå <http://www.forskning.no/Artikler/2004/mars/1079517069.32>

Ofte er ikkje all slik informasjon tilgjengeleg for nettreferansar, men ein må føre opp all informasjon ein har tilgang på!

Bruk av kjelder frå Internett

På Internett kan ein finne uanta mengder med spanande og lett tilgjengeleg informasjon som kan vere nyttig i rapportskrivinga. MEN det er viktig å hugse at informasjonen som ein finn i lærebøker etc. har vore utsett for kritisk vurdering av fagfolk før dei blei utgjeve. Dette gjeld IKKJE for mykje av informasjonen som finnest på Internett. Derfor er det viktig at ein er kritisk til den informasjonen ein finn på nettet. Desse reglane kan hjelpe i vurderinga om informasjonen ein finn held mål [2]:

1. **Autoritet.** Kven er det som står bak nettsida? Det gjeld både forfattar og organisasjon. Har organisasjonen ei adresse? Kan forfattar nåast via e-post, telefon, etc.? kva for kvalifikasjonar har forfattaren? Er innhaldet under copyright?
2. **Nøyaktigheit.** Er innhaldet på nettsida presentert på ein profesjonell måte? Er det masse skrivefeil? Er informasjonen som blir presentert sitert/referert?
3. **Objektivitet.** Er innhaldet presentert som ei offentlig teneste utan reklame? Viss det er reklame på sida, er han separert frå informasjonen? Gjev informasjonen uttrykk for berre å representere meiningane til forfattaren/organisasjonen?
4. **"Datostempel".** Er det lenge sidan informasjonen på nettsida blei oppdatert? Noter alltid datoen for når informasjon frå ei nettside blir lasta ned.
5. **Fagleg dekning.** Er informasjonen komplett? Eller er det oppsummering av informasjon som er publisert andre stadar?

Litteratur:

1. Tangen, L. Referanseliste i Vancouver-stil [Internett]. Trondheim: VIKO; 25.08.2011 [25.08.2011; 22.11.2011]. Tilgjengeleg frå:
<http://www.ntnu.no/viko/oppgave/vancouverliste>
2. Tangen, L. Regler for Vancouver-stil i løpende tekst [Internett]. Trondheim: VIKO; 24.08.2011 [24.08.2011; 22.12.2011]. Tilgjengeleg frå
<http://www.ntnu.no/viko/oppgave/vancouverregler>
3. Tate M. & Alexander J. Teaching critical evaluation skills for World Wide Web Resources. Computers in Libraries; 1996. Kan finnast på University of Auckland (2009). Evaluating websites [Internett]. Auckland: University of Auckland; 28.05.2009 [28.05.2009; 05.12.11]. Tilgjengeleg frå
<http://www.library.auckland.ac.nz/instruct/evaluate.htm>

ANDRE DETALJAR SOM KAN VERE GREITT Å VITE NÅR EIN SKRIV VITSKAPLEGE TEKSTAR

NAMN PÅ FILA

Når ein skal lagre ein rapport for levering via It's learning tenkjer dei fleste at det er logisk å bruke namnet på forsøket som filnamn. Problemet med dette er at den som skal rette risikerer å få 20 filer som heiter "Mikrobiologi.doc". Bruk i staden etternamnet ditt (**utan æ, ø eller å**, It's learning vil ikkje alltid laste opp desse filene) etterfølgd av namnet på den aktuelle oppgåva. Viss du for eksempel heiter Løken til etternamn skal det sjå slik ut for oppgåve 2:

Løken Mikrobiologi.doc

REGLAR FOR BRUK AV VITSKAPLEGE NAMN (NOMENKLATUR)

I utgangspunktet er det berre latinske namn som skal stå i *kursiv*. Når namn som til dømes *Vicia faba* eller *Escherichia coli* blir nemnt for første gong skal namnet skrivast fullt ut. Slektssnamnet (det første namnet) skal ha stor bokstav sjølv om det står midt inni teksten, og epitetet/artsnamnet (det andre namnet) skal alltid ha liten bokstav. Når ein skriv eit latinsk namn for andre gong skal slektssnamnet forkortast, medan epitetet/artsnamnet skrivast fullt ut, slik:

V. faba og *E. Coli*

Viss de berre har slektssnamnet (til dømes *Neisseria* sp.) skal det ikkje forkortast sjølv om de brukar det fleire gongar. Viss ein berre kan ta organismen til slekt skrivast det dessutan "sp." bak for å indikere dette.

I mange høve har de norske namn som de kan bruke. Då veljar de sjølv om de vil bruke det norske eller det latinske namnet, men ta gjerne med det andre namnet i parentes første gong de nemnar arten, til dømes slik:

Vasspest (*Elodea densa*)

Eventuelt

Elodea densa (vasspest)

KORLEIS LAGE EIN GOD FIGUR?

Ein god figur har ein figurtekst som skildrar nøyaktig det figuren viser. Ein skal gå rett på sak, og ikkje starte med frasar som "figuren viser", "dette er", eller liknande.

Dårleg figurtekst: "Standardkurve"

God figurtekst: "Standardkurve for kjente konsentrasjonar av glukose målt ved 510 nm"

Ein god figur har benevning på begge aksane. Dessutan er det ikkje overdrive bruk av fargar med mindre dei har ein funksjon. Det ryddigaste er å halde figuren i svart og kvitt. Ein kan gjerne droppe gridlines og legend med mindre dei har ein funksjon.

INNLEVERINGSFRISTAR

Rapporten skal normalt leverast INNAN EI VEKE frå dagen eit labforsøk blei avslutta. Ved særskilte tilfelle kan anna frist avtalast med labassistent.

Viss ein får "om" på rapporten (ikkje godkjent rapport), er frist for andre innlevering ei veke etter at ein fekk rapporten igjen. Det er derfor viktig at studentane sjekkar It's learning med jamne mellomrom. Etter dette får ein ikkje fleire mogelegheiter til å ferdigstille rapporten.

Alle rapportar må vere godkjente for å kunne gå opp til eksamen!

Gjer grundig arbeid før første innlevering av kvar rapport – dette fører til mindre arbeid både for studenten og den som skal rette. Les alltid gjennom rapporten før du leverer. Datamaskina rettar ikkje alle feil...

PLAGIERING

NTNU bruker gode program for å avdekke plagiering, så det er viktig at ein brukar eigne ord når ein skal skrive labrapport. Programmet sjekkar både opp mot Internett og andre innleveringar, så viss to studentar leverer (delar av) same rapport vil dette bli registrert. Plagiat er IKKJE AKSEPTERT og fører til at ein ikkje får godkjent rapporten. I verste fall risikerer ein ikkje å få gå opp til eksamen.

FRÅVER

I nokre høve kan ein ikkje møte på lab (sjukdom, dødsfall i familien etc.). Ein må i slike tilfelle vise gyldig attest for fråveret neste labdag. I staden for å levere rapport får ein svare på spørsmål knyta til teori som er relevant for forsøket. Desse spørsmålet finst på slutten av kvar laboppgåve og skal leverast til same frist som for resten av labpartiet eller etter avtale med labassistent.

MIKROSKOPET SI OPPBYGGING OG BRUK

Lysmikroskopet sine to funksjonar, oppløysingsevne og forstørringsevne, varierer uavhengig av kvarandre. Oppløysingsevna er evna til å gje klare bilete, medan forstørringa er evna til å forstørre eit bilete som ikkje nødvendigvis treng å ha klare detaljar.

Ved å bruke olje mellom objektivet og preparatet kan det oppnåast ei betre oppløysingsevne. Objektiv som er berekna for bruk med olje blir kalla oljeimmersjons-objektiv, og dei har gjerne den høgste forstørringa, vanlegvis 100x. På kursmikroskopa frå Zeiss som blir brukt i BI1001 har vi objektiv med forstørring 10x, 40x og 63x. Vi har utelate 100x oljeimmersjons-objektiv, men desse finnest ved andre mikroskop ved instituttet. Objektiva er det viktigaste for kvaliteten på mikroskopet.

Den totale forstørringa i eit mikroskop er lik produktet av objektivet og okulalet si eigaforstørring. Ei auke av okulalet si forstørring vil ikkje auke oppløysingsevna, då okulalet ikkje kan forbetre kvaliteten av biletet som blir gjeve av objektivet.

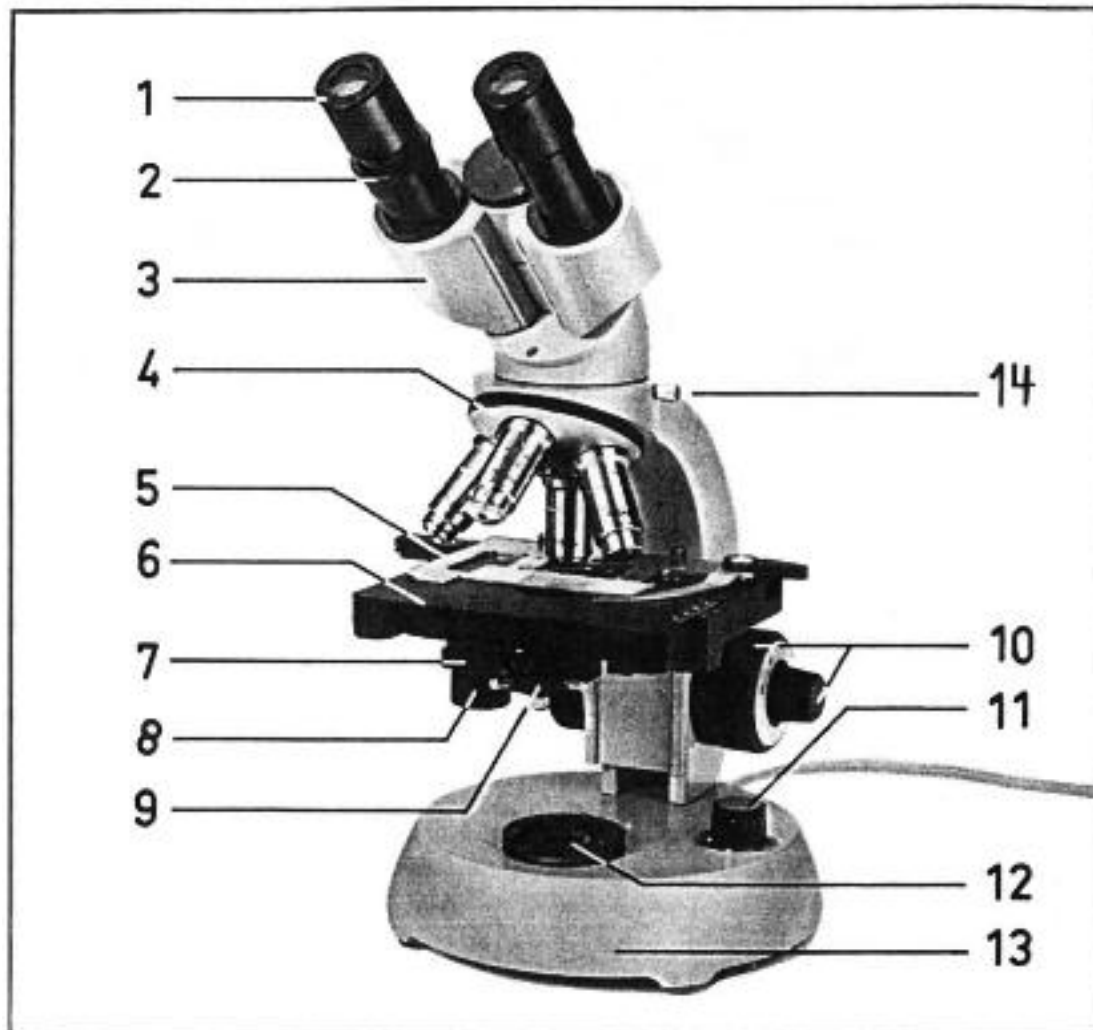
Objektiva sitt i ei revolverfating sånn at det er lett å skifte storleik. Dei fleste mikroskop har to okular (binokular tubus) slik at begge auga kan brukast ved mikroskopering. Eitt av okulara har ei justering ved basisen slik at ein kan etterstille fokuset i okulalet viss ein ikkje har same syn på begge auga.

Mikroskopet har ei regulerbar belysning bygd inn i foten (6V 10W halogen). Kondensoren som er plassert like under bordet inneheld ein apperturblendar (kondensorblendar) som regulerer opninga av kondensoren. Blendaren skal ikkje brukast til justere lysstyrka, det blir gjort med lysknappen på foten av mikroskopet. Opninga av kondensorblendinga er avgjerande for oppløysinga (sjå neste side).

Mikroskopiske preparat blir laga på objektglas og blir dekkja med eit tynt dekkglas. Objektet blir lagt i ein væskedrope på objektglas, og ein legg dekkglaset forsiktig på så færrast mogeleg luftboblar oppstår. Monteringsvæska kan vere vatn, men andre væsker kan òg vere aktuelle.

Mikroskopet er eit kostbart og følsamt instrument som må haldast reint og i orden. Støv og skit er den verste fienden til mikroskopet. Pass òg på at det ikkje kjem væske på frontlinsa i objektivet, då dette i så fall vil tilsløre biletet. Sjå vidare på "Gode råd ved bruk av mikroskop".

Zeiss KF2 kursmikroskop



1. Okular 10x/18Br
2. Regulerbar okulartubus
3. Regulerbar binokular tubus
4. Revolverfatting med objektiv 10x, 40x Ph, 63x Ph
5. Preparathaldar
6. Objektbord
7. Arm for regulering av kondensorblendar og innstilling av faskontrast (Ph)
8. Regulering av objektbordet
9. Kondensor
10. Grov- og finfokuseringsknapp
11. Lysbrytar og lysregulering
12. Beskyttelsesglas
13. Mikroskopfot
14. Skrue for feste av binokulartubus

BRUK AV ZEISS KF2 KURSMIKROSKOP

1. Legg preparatet på mikroskopbordet med dekkglasets opp. Preparatet skal holdast på plass av ei fjørbelasta klemme.
2. Skru på lyset med intensitetsknappen på høgre side på foten av mikroskopet. Mikroskopet har halogenbelysning. Ikkje bruk sterkare lys enn naudsynt.
3. Start med det minste objektivet, 10x.
4. Skarpstill preparatet med fokuseringsskruane. Vanlegvis er det nok å skru på finfokus (den vesle skruen).
5. Skift til 40x-objektivet og fokuser med finfokus skruen. VIKTIG: IKKJE bruk grovfokus på 40x og 63x-objektiva. Då er objektivet så nærme preparatet at ein risikerer å knuse både preparat og objektiv.
6. Skift eventuelt til 63x-objektivet og fokuser med finfokus skruen.
7. Skru ned intensiteten med justeringsknappen og slå av mikroskopet når det ikkje er i bruk. Sett inn det minste objektivet, 10x.

Ved mikroskopering av våte preparat må ein passe på at det ikkje kjem væske frå preparatet over på objektivet.

A. Lysfelt

For å få maksimal oppløysing av preparatet må kondensorblendaren stillast slik:

1. Kondensorblendaren må først stillast på største opning. Armen vil då peike omtrent rett fram.
2. Juster armen litt mot venstre (blendaren blir lukka) til biletet får maksimal oppløysing. Juster samstundes lyset med intensitets skruen.

10x-objektivet skal ha omtrent $\frac{1}{2}$ opning

40x og 63x-objektiva skal ha omtrent $\frac{3}{4}$ opning

Du ser opninga av kondensorblendaren ved å ta ut eit av okulara og sjå ned i okulartubusen med eitt auge i ein avstand av omtrent 10 cm frå opninga.

B. Fasekontrast

Fasekontrast er berekna på preparat som er utan farge som gjev dårleg kontrast i vanleg lysfelt. På dette mikroskopet er det berre 40x og 63x-objektiva som gjev fasekontrast. Objektiva er merka med Ph 2.

Det er ei fasettplate inne i objektivet som saman med ein ringblendar i kondensor gjev fasekontrasteffekten.

1. Still først inn med 10x-objektivet på vanleg lysfelt.
2. Skift til 40x og eventuelt 63x-objektiva.
3. Før armen for kondensorblendaren heilt over til høgre slik at faseblendaren i kondensoren kjem inn i lysgangen.
4. Fasekontrast treng mykje lys, så **auk lysintensiteten**.

GODE RÅD VED BRUK AV MIKROSKOP

1. Hald mikroskopet reint, særskilt linsene i okulalet, objektivet og kondensoren. Berre bruk linsepapir eller bomullspinnar til reingjering av linsene.
2. Ta aldri med fingrane på linsene.
3. Bruk alltid dekkglas når du studerer fersk materiale. Viss det kjem vatn frå preparatet på objektivet vil det tilsøre biletet.
4. Kontroller preparatet så du er sikker på at dekkglaset vender opp før du plasserer det på objektbordet. Legg preparatet på bordet når du skal pusse det.
5. Bruk alltid objektivet med den minste forstørringa først for å lokalisere preparatet. Sentrer og skarpstill preparatet før du skiftar til objektiv med større forstørring.
6. Juster høgda på kondensoren slik at baklinsa av objektivet blir fullt utlyst. Ved låge forstørringar må topplinsa eventuelt takast bort (kan ikkje gjerast på Zeiss KF2).
7. Kondensorblendaren skal innstillast på $\frac{1}{2}$ opning for objektiv opp til 10x og på $\frac{3}{4}$ for objektiv frå 40x til 100x.
8. Ha alltid ei hand på finjusteringsskruen slik at du kan forandre fokus medan du studerer materialet.
9. Bruk av oljeimmersjons-objektiv krev særskilt instruksjon (det er ikkje oljeimmersjons-objektiv på Zeiss KF2)
10. Når mikroskopet blir sett bort etter bruk skal det svakaste objektivet stå i synsfeltet og vere fokusert. Kondensoren skal vere innstilt for vanleg gjennomlys, og blendaren skal vere open. Kondensoren skal stå i øvre stilling (Zeiss KF2 har fast kondensor og kan ikkje regulerast i høgde). Sjå etter at okulartubusen er godt festa til stativet og at det ikkje ligg igjen preparat på objektbordet. Leidninga skal rullast godt saman om mikroskopstativet, og støvhetta skal settast på.

OPPGÅVE 1 – PLANTECELLA

Den levande plantecella

Eit av dei karakteristiske trekka for alt levande er evna til rørsle. Det levande protoplasmaet er ikkje urørleg, men strøymar rundt i cella i ei rørsle som kallast plasmastrøyming. Strøyminga er avhengig av viskositeten i cytoplasmaet. Temperatur, lys og mekaniske impulsar påverkar strøyminga. Strøyminga aukar for eksempel når temperaturen aukar. Ved altfor høge temperaturar minkar strøyminga på grunn av at protoplasmaet tek skade. Ved mekanisk påverking, for eksempel trykk, kan strøyminga stoppe.

Det er skildra ulike typar plasmastrøymingar:

1. **Rotasjon.** Heile protoplasmaet strøymar i same retning innanfor celleveggen. Organellane følgjer altså med i rørsle
2. **Sirkulasjon.** Cytoplasmaet strøymar i ulike "spor" (plasmatråder) og i ulike retningar inne i cella. Store organellar som for eksempel plastidar beveger seg saktare enn resten av organellane.
3. **Plutselege organellerørsler.** Enkelte organellar flyttar seg rykkvis. Ein antek at det er mikrotubuli som forårsakar denne rørsle.

Utanom plasmastrøymingar kan ein i lysmikroskop sjå at visse organellar inne i cella står og dirrar. Dette er skulda Brownske molekylrørsler og har ingenting med plasmastrøyming å gjere. Dette er eit synleg uttrykk for molekyla si eiga rørsle. Molekyl i alle stoff er i rørsle og har fri kinetisk energi. Molekyla (som vi ikkje ser) "kjem borti" organellar (som vi kan sjå nokre av), og støytar dei hit og dit. Det er denne molekylrørsle som er årsaka til diffusjon og konsentrasjonsutjamning.

Ein viktig del av den levande plantecella er vakuolesystemet. I unge celler som nettopp har delt seg består dette av saftfylte holrom. Dei er små og finnest i store mengder. Etter ei tid strekk cella seg. Vegg og vakuole aukar i storleik medan plasmamengda er konstant og blir spreidd ut til eit tynt lag langs vegg og tynne trådar (plasmatrådar) gjennom vakuolen. Dyreceller har ikkje denne typen strekkingsvekst, men veks berre ved at plasmaet aukar.

OPPGÅVE 1A – PLASMASTRØYMING I HÅRCELLER FRÅ *CUCURBITA PEPO* (GRASKAR)

1. Gjer eit lite snitt i bladstilken eller stengelen hos graskar med eit barberblad/skalpellblad og trekk av eit lite stykke epidermis med pinsett.
2. Legg stykket i ein vassdrope på eit objektglas og legg eit dekkglas over.
3. Sjå etter hår som stikk ut til sida for epidermiscellene. Håra er danna av fleircellige epidermale celler.
4. Observer plasmastrøymingane. Strøymingane sjåast ofte lettast i dei basale cellene i håra. Bruk fasekontrast (40x og 63x-objektiva)

OPPGÅVE 1B – PLASMASTRØYMING I BLADCELLER FRÅ *ELODEA Densa* (VASSPEST)

I Noreg er det berre hopplanten av *E. densa* som finnest, og då utelukkande i Sør-Noreg. Det har vore mogeleg å kjøpe *E. densa* i akvarieforretningar inntil nyleg, men planten har vorte svartelista [1] og er derfor ikkje i sal lenger. Det er derfor viktig ikkje å ta med blad ut frå laben eller å skylje dei ned i vasken.

1. Legg eit heilt blad i ein drope vatn på eit objektglas, legg dekkglas over og mikroskop med vanleg lysfelt.
2. Prøv ved hjelp av "optiske snitt" å slå fast kor mange cellelag tjukt bladet er, og vurder storleik og form på cellene i dei ulike laga.

OPPGÅVE 1C – PERMEABILITET I BLADCELLER FRÅ *ELODEA Densa* (VASSPEST)

1. Legg eit heilt blad i ein drope vatn på eit objektglas og legg eit dekkglas over. Finn fokus i mikroskopet.
2. Tilsett nokre dropar sukrose (1M) på den eine sida av dekkglaset og legg ei tynn remse filterpapir langs kanten på motsett side av dekkglaset. Trekk sukkerløysinga inn under dekkglaset ved hjelp av filterpapiret. Pass på så det ikkje kjem sukkerløysing på frontlinsa til objektivet.
3. Observer bladcellene og sjå når det skjer ei forandring. Sjå etter forandringar i plasmaet nærmast celleveggen

ALTERNATIVE OPPGÅVER – LYSMIKROSKOPI OG PLANTECELLA

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Skildre kva ein må tenkje på når ein skal bruke mikroskop.
2. Korleis er ei plantecelle bygd opp. Forklar og bruk gjerne ein figur (hugs figurtekst og kjelde til figuren).
3. Kva er årsakene til dei ulike typane plasmastrøymingar vi kan sjå i planteceller? Kva kan påverke desse strøymingane og korleis?

Tabell 2. Utstyr og materialar**Oppgåve 1A**

Frøplante av <i>Cucurbita pepo</i> (graskar)	Dekkglas
Gjennomlysmikroskop	Barberblad
Objektglas	Pinsett

Oppgåve 1B

<i>Elodea densa</i> (vasspest)	Objektglas
Gjennomlysmikroskop	Dekkglas

Oppgåve 1C

<i>Elodea densa</i> (vasspest)	Dekkglas
Gjennomlysmikroskop	Filterpapir
Objektglas	Sukrose (1M)

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering
Skalpellblad/barberblad	Stikkande, skjærande avfall
Objektglas	Glasavfall
Dekkglas	Glasavfall
Pipettar	Vanleg søppel
Bladmateriale	Vanleg søppel
Sukrose	Avløp

Litteratur:

1. Artsdatabanken. Norsk svarteliste 2007. Økologiske risikovurderinger av fremmede arter [Internett]. Trondheim: Artsdatabanken; 2007 [10.02.2011; 26.11.2011]
Tilgjengeleg frå <http://www.artsdatabanken.no/artArticle.aspx?m=172&amid=2581>

OPPGÅVE 2 – MIKROBIOLOGI

Mikrobiologi er læra om organismar som er så små at ein må bruke mikroskop for å kunne observere dei. Mikrobiologien omfattar:

- Bakteriologi (læra om bakteriar)
- Virologi (læra om virus)
- Mykologi (læra om dei mikroskopiske soppane)
- Protozoologi (læra om dei eincella dyreorganismene)

Sjukdommar er ofte forårsaka av mikroorganismar (patogene mikroorganismar), men i hovudsak er desse små enkle organismene ufarlege. Dei er faktisk heilt essensielle for alt liv på jorda. Dei lever i symbiose med mange artar:

- *Rhizobium* sp. lever i rotknollar hos artar i erteblomfamilien kor dei omdannar N_2 frå atmosfæren til sambindingar plantar bruker i proteinsyntese.
- *Escherichia coli* produserer vitamin K i tarmen hos pattedyr.
- Lav er samansett av Cyanobakteriar og sopp som lever i symbiose.
- Normalflora i tarm, på slimhinner og hud hindrar kolonisering av patogene artar.

I tillegg er mikroorganismar viktige for resirkulering av biologisk materiale (nedbryting av avfall), produksjon av O_2 (Cyanobakteriar), og dei er næring for større organismar. Fleire greiner av biologien dreg nytte av mikroorganismar i forskinga si (for eksempel økologi, evolusjonsbiologi og bioteknologi).

Prokaryote mikroorganismar er omfatta av to hovudgrupper, **erkebakteriar** og **bakteriar**. I dette kurset skal vi sjå på bakteriar, vi skal sjå på diversitet i utsjånad og rørsle (2A), ulik oppbygging av cellevegg (2B), effekten av UV-lys (2C), biokjemiske eigenskapar (2D) og nærværet av bakteriar i kvardagen (2E).

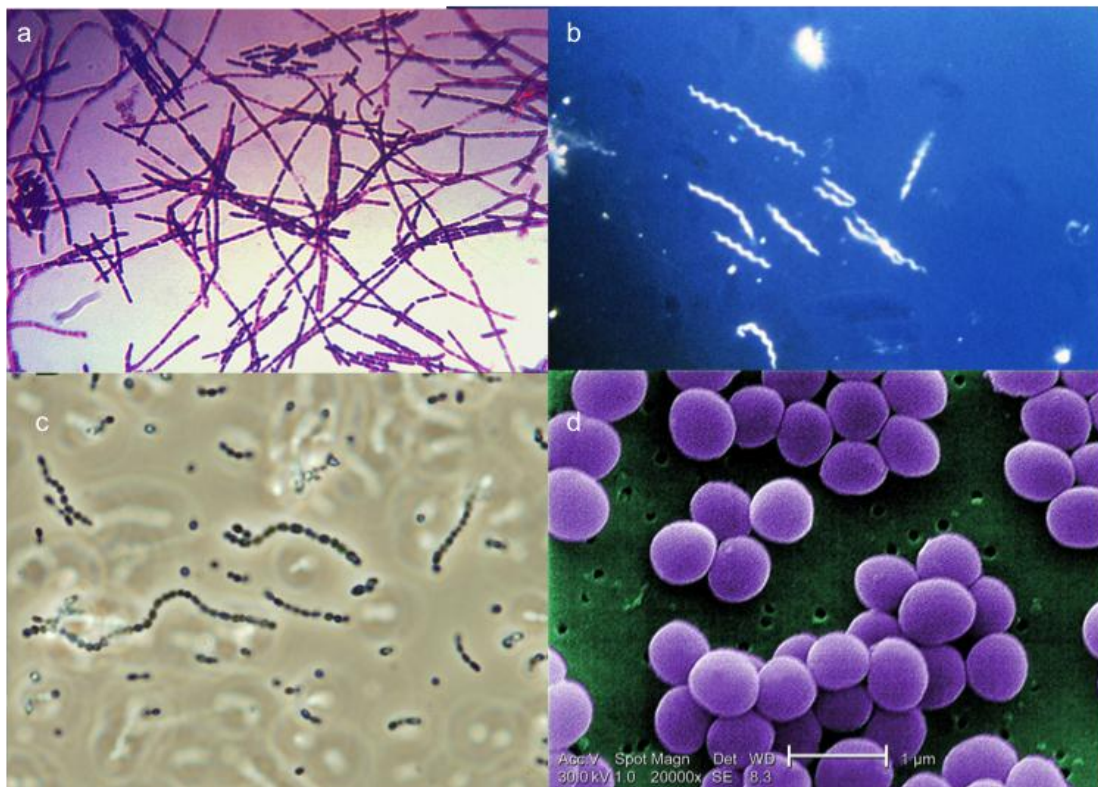
DIAGNOSTIKK AV BAKTERIAR

Ein kan ikkje sjå ein enkelt bakterie utan mikroskop, men dei formerar seg ved celledeling og i løpet av nokre timar kan éin gje opphav til fleire millionar ved gode vekstforhold. Dersom ein bakterie delar seg kvart 20. minutt vil ein ha 2^{36} (68 719 476 736) stk etter 12 timar. Bakteriar kan dyrkast i eit medium som inneheld næringsstoff, vatn og ulike salt. Ein brukar enten medium i væskeform eller eit som inneheld agar som gjev mediet ein gele-aktig konsistens

Ulike metodar blir brukte for å avgjere kva bakteriar ein har med å gjere. Først er det viktig å merke seg **kor bakterien blei isolert ifrå**. Ein vil ikkje finne dei same bakteriane i jord som i vatn, og bakteriar ein finn i ei pussprøve vil ein ikkje finne på plantar. For å diagnostisere kva bakterie ein står ovanfor bruker ein kunnskap ein har om kjente bakteriar. Nokre gongar er eigenskapar karakteristiske for ein enkelt bakterie, andre gongar indikerer dei kva gruppe bakteriar det er snakk om. Nokre av eigenskapane kan observerast i mikroskop, medan andre må testast for:

- Form og organisering (stavar, kokkar, spiralar, kjeder, klasar) (Sjå figur 1)
- Rørsle? (indikerer om bakteriane har flagellar)
- Oppbygging av celleveggen (gram +/-)
- Type respirasjon (aerob/anaerob)
- Vekstvilkår (krav til næring, pH og temperatur)
- Biokjemi (for eksempel antibiotikaresistens, nedbryting av ulike sukkerartar)

- Nærvær av antigen på overflata
- Utsjånad og lukt av kolonien



Figur 1. Ulike former for bakteriar: a) Stavar (*Bacillus* sp.), b) Spiral (*Borrelia* sp.), c) Kokkar i kjede (*Streptococcus* sp.) d) Kokkar i klasar (*Staphylochooccus aureus* = gule stafylokokkar) (1)

FARGING AV LEVANDE PREPARAT

I eit levande preparat er ein først og fremst interessert i å observere morfologi og rørsle (med eller utan flagellar). Ein vil få fram morfologien betre om ein fargar bakteriane. Til dette blir det nytta ein metode kalla Gramfarging. Gramfarging har hatt stor betyding i bakteriologien. På basis av denne metoden kan ein dele bakteriane inn i to hovudgrupper: Gram-positive (Gram+) og Gram-negative (Gram-). For å hindre at cellene løysar under prosedyren blir dei fikserte (festa) til underlaget med varme. Gramfarging tek utgangspunkt i peptidoglykan som finst i celleveggen til bakteriar. Gram+ har eit tjukt lag peptidoglykan utanfor celleveggen, medan Gram- har eit tynt lag peptidoglykan mellom plasmamembranen og ein ytre membran. Krystallfiolett bind seg til peptidoglykan, og jod-kaliumiodid fikserer fargen så bakteriane bli **fiolette/lilla**. Avfarging med alkohol fjernar krystallfiolett frå det tynne peptidoglykanlaget i Gram-, men ikkje i det tjukke laget hos Gram+-bakteriar. Safranin fargar dei fargelause Gram- bakteriane **raude/rosa**.

UV-BESTRÅLING

Ultrafiolett lys (UV) er ein viktig miljøfaktor som påverkar heile biosfæren frå bakteriar til menneske. Ein trudde lenge at det var UV-B-delen av solstrålinga (280-320 nm) som var den viktigaste årsaka til stråleskade. No viser derimot ny forskning at UV-A-komponenten (320-400 nm) kan vere vel så viktig. Intensiteten av solstrålinga ved jordoverflata er ca. 1000 gongar større i UV-A- enn i UV-B-området. 90 % av hudkrefttilfella som blir registrert kjem på hudområde som har vore utsett for sollys.

UV-bestråling er elektromagnetisk stråling med bølglengde 100-400 nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$), det vil seie mellom røntgenstråling og synleg lys. UV-bestråling kan gjennomførast med kvikksølvlamper der stråling blir frambrakt ved elektriske gassutladingar. UV-stråling skadar bakteriar og virus ved å øydeleggje nukleinsyrene (DNA og RNA). Graden av skade er avhengig av stråledose.

ANTIBIOTIKARESISTENS

I kampen for tilværa har mikroorganismar utvikla metodar for å slå "knockout" på konkurrentar. Blant dei mikroorganismene som finnest i jord (sopp og bakteriar) finn ein fleire artar som produserer kjemikaliar (antibiotika) som har evna til å drepe eller å hemme veksten av konkurrerende artar. I 1928 oppdaga Alexander Flemming at soppen *Penicillin sp.* produserte ein substans som hemma vekt av enkelte bakteriar. Dette revolusjonerte moderne kirurgi og medisin. Den dag i dag blir det oppdaga nye antibiotika blant mikroorganismar, i tillegg har ein òg utvikla mange syntetiske antibiotika for medisinsk bruk. På NTNU jobbar ei gruppe ved Institutt for bioteknologi med eit antifungicid, Nystatin, som bli produsert av jordbakterien *Streptomyces noursei*.

Som tidlegare nemnt hemmar eller drep antibiotika konkurrerende artar, men skadar ikkje produsenten. Resistens mot antibiotika kan skuldast at produsenten manglar angrpspunktet for det aktuelle antibiotikumet (for eksempel eit overflatemolekyl) eller at organismen samstundes produserer enzym som kan uskadeleggjere stoffet. Ved diagnose av patogene bakteriar kan ein teste kva for antibiotika som vil ha størst effekt på bakterien. Fortynna løysing med bakterie blir overført til ei agarplate, deretter blir det lagt antibiotikatablettar med ulike antibiotika oppå plata. Etter eit døger vil ein sjå vekst av bakteriar i område utan antibiotika og klare sonar rundt antibiotikatablettar som hemmar eller drep bakterien (Figur 2). Viss bakteriane veks heilt inntil antibiotikatabletten betyr det at dei er resistente mot denne typen antibiotikum.



Figur 2. Bakteriar som har fått vokse på agarplate med antibiotika (1)

1. Wikimedia Commons; 20.11.2011 [20.11.2011; 27.11.2011]. Tilgjengeleg frå http://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page

OPPGÅVE 2A – VERKNAD AV UV-BESTRÅLING PÅ BAKTERIEKULTUR

Lag først ei fortynna kultur av *E. coli* i fysiologisk saltvatn (0,9 %) på følgjande måte

1. Ta ein *E. coli*-koloni med ei podenål. Bakteriene er belegget på toppen av mediet, så ikkje grav nedi agaren.
2. Løys bakteriane i nokre dropar fysiologisk saltvatn (0,9 %) og fyll deretter på med ca. 5 ml (ca 3 cm opp) fysiologisk saltvatn

Kulturen du har laga skal no fordelast på tre agarskåler. To av dei skal bestrålast med UV-lys, medan den siste skal brukast i oppgåve 2D.

MERK både botna og lokka av skålane før bakteriar blir tilsett:

Første skål: Benkenummer (lag), parti, strålingstid I (finn tider for ditt lag i Tabell 1)

Andre skål: Benkenummer (lag), parti, strålingstid II

Tredje skål: Benkenummer (lag), parti

Dei tre agarskålane skal lagast på følgjande måte:

1. Bruk ei gradert plastpipette og overfør 1,5 ml av den fortynna kulturen til kvar av skålene. Rør på skåla så løysinga flyt jamt utover. Viss det ikkje er nok kultur til å dekke agaren, tilfør litt ekstra.
2. Vipp skålene litt på kanten og sug av den overskytande væska med pipetten.
3. Tørk skålene i varmeskap ved 37 °C med lokket litt over i omtrent 30 minutt.
4. To skålar frå kvart lag blir bestråla med UV-lys i ein LAF (laminar air flow)-sterilbenk etter følgjande skjema (blir utført av kursassistentane):

Tabell 1. Oversikt over periodar med UV-bestråling.

Lag (benkenr.)	Bestråling skål I	Bestråling skål II
1 og 2	15 sek.	30 sek.
3 og 4	1 min.	2 min.
5 og 6	5 min.	7,5 min.
7 og 8	10 min.	15 min.
9 og 10	20 min.	0 min.
11 og 12	40 min.	0 min.

Punkt 5-8 blir utført av kursassistentane:

5. Forsegle skålene med parafilm. Dette for at dei ikkje skal tørke ut i varmeskapet.
6. Sett skålene med lokket ned i varmeskap ved 37 °C og lat det stå i 18 timar. Skåla blir sett med lokket ned for at kondens ikkje skal dryppe ned på agaren.
7. Sett bakteriane i kjøleskap til neste labdag

Punkt 7 skal utførast av studentane neste labdag

8. Tel bakteriekoloniar. Sett opp resultata i ein tabell som er felles for heile labpartiet. I resultatdelen **skal du bruke resultat frå heile partiet.**

OPPGÅVE 2B – MIKROSKOPERING AV LEVANDE BAKTERIAR

1. Slem opp noko av dei fire forskjellige bakteriekoloniane frå bakterieskålene i litt fysiologisk saltvatn (0,9 %) i kvar sitt reagensrør

2. Undersøk dei ulike bakteriane i lysmikroskopet ved å leggje ein drope frå kvar av løysingane på kvar sitt objektglas med dekkglas over. Bruk både vanleg gjennomlys og fasekontrast.
3. Observer og teikne bakteriane sine formar og rørsler. **Dette skal inn i rapporten.**

OPPGÅVE 2C – GRAMFARGING AV BAKTERIAR

1. Ta ein drope av den utleverte blandinga bakteriekultur (inneheld både Gram+ og Gram-) og stryk det ut over eit ca. 1,5 cm² stort område. Bruk podenåla eller ein pipette. Lat preparatet tørke heilt ved romtemperatur.
2. Fikser preparatet ved å føre objektglaset med preparatsida **ned**, raskt 3 gongar gjennom den øvre delen av ein blå flamme.
3. Farg preparatet med **krystallfiolett i 1 min.**
4. Skyl preparatet raskt og forsiktig med **destillert vatn** frå spruteflaske. Vasstrålen bør ikkje treffe sjølv preparatet.
5. Farg med **jod-kaliumiodid i 1 min.**
6. Hell avfargingsvæske (**etanol, 96 %**) på preparatet. Beveg glaset frå side til side så væska renn fram og tilbake over preparatet. Meir avfargingsvæske kan eventuelt hellast på. Hald fram til det ikkje vaskast ut meir farge. Dette tek ca. ½ - 1 minutt.
7. Skyl forsiktig med **destillert vatn** på same måte som i punkt 4.
8. Farg preparatet med **safranin i ca. ½ minutt.**
9. Skyl preparatet i vatn.
10. Tørk preparatet i luft.
11. Drypp på ein drope vatn, legg på dekkglas og studer i mikroskop. Teikne kva du ser.

Lokaliser først eit område på preparatet kor bakteriane ikkje ligg for tett med 10x eller 40x-objektivet. Sett deretter inn 63x-objektivet. Bruk vanleg gjennomlys, då fasekontrast ikkje vil vise fargane rett.

OPPGÅVE 2D – VERKNAD AV ANTIBIOTIKA PÅ BAKTERIEKULTUR

Bruk agarplata som blei laga i oppgåve 2A (mediet må vere tørka omtrent ½ time utan lokk ved 37 °C). Pass på at skåla er merka med parti og lagsnummer.

1. Plasser antibiotikatablettar og kjemoterapeutikum ned i mediet. Pass på at du ikkje trykkar for hardt, då kan tablettane knekke. Tabletten skal akkurat så langt nedi at han sitt fast når skåla vendast opp-ned.
2. Forsegle plata med parafilm og sett ho med lokket ned i varmeskap ved 37 °C.
3. Etter eitt til to døger sett labpersonale platene i kjøleskap. Observer eventuelle hemmingssonar og storleiken (diameter) av desse neste labdag.

OPPGÅVE 2E – KVA FINN VI AV BAKTERIAR I KVAR DAGEN?

Bruk fantasien og finn ein stad de vil teste for bakteriar. Ein kan enten bruke ei podenål og dyppe/berøre staden ein vil teste (for eksempel munn, negl, dørhandtaket hos instituttleiar, etc.) og deretter stryke nåla forsiktig fram og tilbake over ei agarplate. Eventuelt kan ein late agarplata stå open på ein stad i 5-10 minutt. Forsegle deretter plata og merk ho med **part, lag og kor bakteriane er henta ifrå**, inkuber ved 37 °C i 1-2 dagar (platene blir sett i kjøleskap etter dette). Tel koloniane neste dag, og undersøk om dei ser like/ulike ut (same farge?)

ALTERNATIVE OPPGÅVER – MIKROBIOLOGI

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Skildre kva ein kan gjere for å skilje ulike bakteriar ifrå kvarandre
2. Bruk data som partiet ditt fekk i UV-bestråling av *E. coli* (leggast ut på It's learning av kurspersonale etter andre labdag). Lag ein figur som viser vekst av bakteriar for ulike strålingsdosar og forklar figuren.

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgåve 2A	
2 sterile petriskåler med næringsmedium <i>Escherichia coli</i> 0,9 % NaCl (autoklavert) Podenål	Pasteurpipette Parafilm Varmeskap, 37 °C Sterilskap med UV-lys
Oppgåve 2B	
<i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus sp.</i>	Gjennomysmikroskop Objektglas Dekkglass 0,9 % NaCl (autoklavert)
Oppgåve 2C	
Gram+/Gram- -bakteriar Gjennomysmikroskop Objektglas Dekkglass Gassflaske, eventuelt spritbluss Pipettar med smukk	Fargeløysingar - Krystallfiolett - Jod-kaliumjodid - Safranin Avfargingsvæske (etanol 96 %)
Oppgåve 2D	
1 steril petriskål med næringsmedium <i>Escherichia coli</i> 0,9 % NaCl (autoklavert) Antibiotika/kjemoterapeutikum	Pasteurpipette Parafilm Varmeskap, 37 °C
Oppgåve 2E	
1 steril petriskål med næringsmedium Podenål	Innsamla bakteriar Varmeskap, 37 °C

Antibiotika-tablettar:

Ampicilin
Netilmicin
Nitrofurantoin
Sulphonamides (kjemoterapeutikum)

Bakteriar:

Escherichia coli
Neisseria sp.
Staphylococcus aureus (gule stafylokokkar)
Streptococcus sp. (grøne streptokokkar)

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Objektglas/dekkglas	Autoklavposar for glas ved levande bakteriar Glasavfall ved fikserte bakteriar	
Podenål	Autoklavposar	
Bakteriar	Autoklavposar	
0,9 % NaCl	Avløp	
JKJ-løysing	Konsentrert: Risikoavfall Fortynna: vask i avtrekk	Skadeleg ved søl i auga og på huda, skadeleg ved inhalasjon og svelging. Jod er giftig og etsande. Jobb i avtrekksskap, bruk vernebrillar og hanskar
Antibiotika	autoklavposar	Lat antibiotikaen bli verande på agarplata og autoklaver alt saman
Krystallfiolett	Eigen behaldar	Helsefarleg. Farleg ved innanding og svelging. Irriterer slimhinner.
Safranin	Eigen behaldar	Irriterande
96 % sprit	Vask i avtrekk	GIFTIG! Kan vere livstruande viss svelga. Skadeleg viss inhalert eller absorbert via hud.
Hansker og liknande	Vreng og kast i vanleg søppel om dei ikkje er kontaminert med bakteriar. I så fall: kast i autoklavpose.	

OPPGÅVE 3 – MITOSE HOS PLANTECELLER

Gjennom den største delen av livet til ei celle er ikkje kromosoma synlege i mikroskopet. Cella er då i **interfasen**, som er perioden mellom to celledelingar. Replikasjon av DNA går føre seg i denne perioden. **Mitosen** blir innleia ved at kromosoma svakt kjem til syne (kondensering), og nukleolus (område av kjerna kor ribosomalt RNA blir danna og subeiningane i ribosoma blir sett saman) tek til å bli utydeleg. Dette stadiet av celledelingsprosessen blir kalla **profasen**.

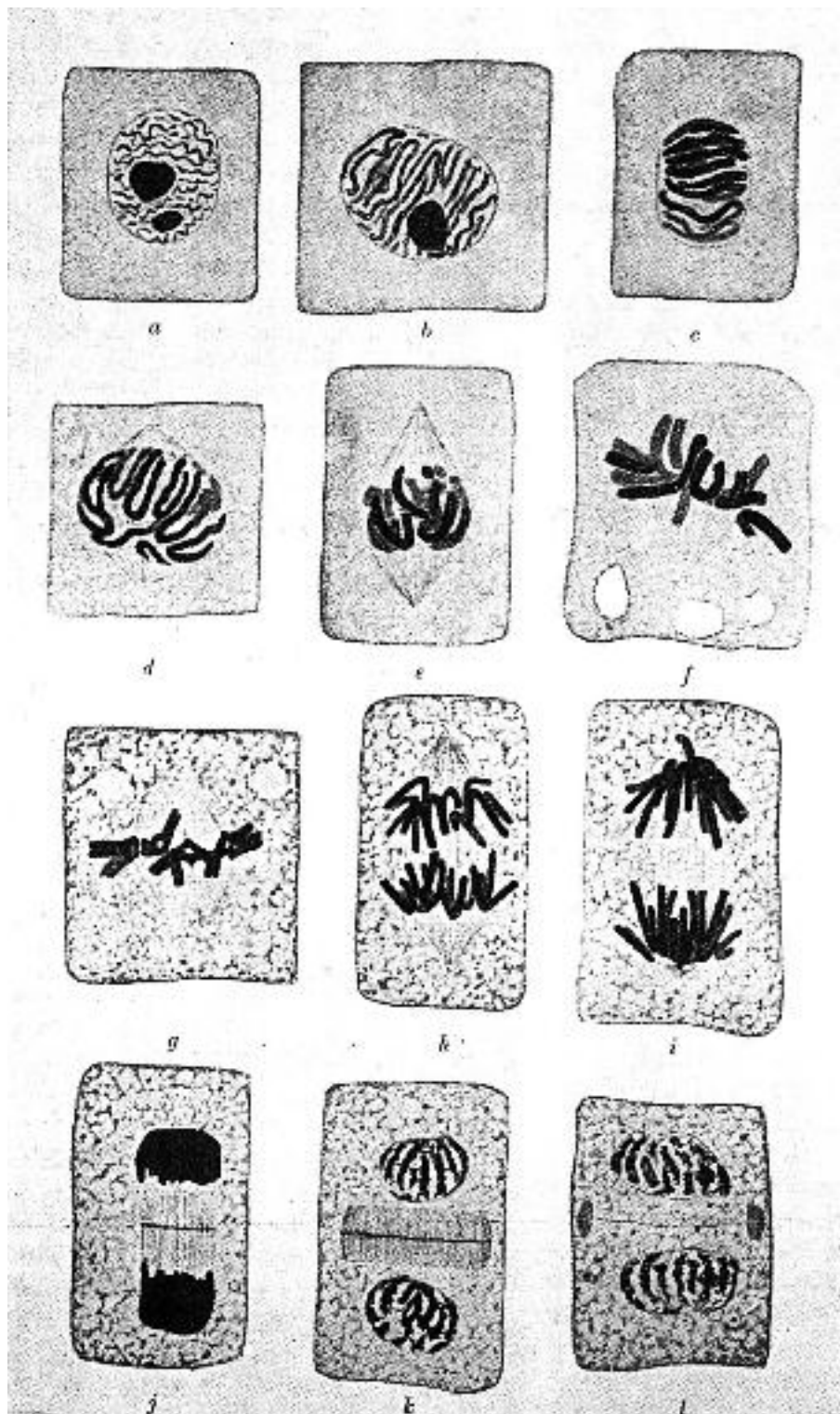
I den neste fasen, **prometafasen**, har kromosoma trukke seg ytterlegare saman. Kromosoma ser ut til å vere delte på langs i identiske halvdelar. Desse blir kalla kromatid. Membranen rundt kjerna blir fragmentert og nukleolus forsvinn.

Deretter, i **metafasen**, vandrar kromosoma til det såkalla ekvatorialplanet. Kromosoma beveger seg langs dei tynne fibrane som danner sambindingslinja mellom dei to polane, den såkalla spindelen. Fibrane blir kalla spindelfibrar og består av mikrotubuli. Dei to kromatida i kvart sitt kromosom heng no saman berre i eit særskilt kromosomsegment som blir kalla centromeren.

I **anafasen** deler centromeren seg sånn at kvart kromatid får sin eigen centromer. Dei to søskenkromatida fjernar seg deretter frå kvarandre ved hjelp av spindelen og vandrar til kvar sin pol. Kromatida kan no sjåast på som nye kromosom som ved slutten av anafasen ligg samla ved polane. Anafasen er det kortaste stadiet av mitose

I den siste fasen, **telofasen**, blir nukleoli i dei to dottercellekjernane danna, og nye kjernar blir forma. Kromosoma blir lengre og tynnare og får til slutt den dekondenserte forma dei har i interfasen

Hos høgare plantar ser det ut til å vere ein funksjonell samanheng mellom mitosen, som òg blir kalla karyokinese (deling av kjernematerialet) og cytokinesen. Før dei nye kjernemembranane er danna i telofasen vil det i spindelen samlast små vesiklar, Golgiapparat, ER og mikrotubuli. Samlinga av desse strukturane blir kalla fragmoplast. Fragmoplasten danner celleplata, som vil skilje dei to nye cellene ifrå kvarandre. Celleplata veks vanlegvis frå sentrum av cella og ut mot sidene, kor ho smeltar saman med celleveggen i morcella. Celleplata blir seinare til midtlamellen i den nye celleveggen mellom dottercellene.



Figur 1. a, Interfase; b-d, profase; e, prometafase; f-g, metafase; h-i, anafase; j-l, telofase. I figuren kjem det til uttrykk at mitose er ein kontinuerleg prosess, så det er viktig å ha i minne at det kan vere glidande overgangar mellom fasane. Likevel er fasane relativt karakteristiske (1).

Litteratur:

1. Müntzing, A. Arflighetsforskning. . Stockholm, Sverige: Lts Förlag; 1960

OPPGÅVE 3A – ROTSPISS AV *VICIA FABA* (BØNNEVIKKE)

1. Mikroskopier det utleverte ferdiglaga lengdesnittet av *V. faba* og teikne ei skisse av rotspissen. Sett namn på dei ulike sonene (rotkappe, apikalt meristem, celledelingszone, elongeringszone, vaskulært vev, cortex).
2. Finn ulike delingsfasar i meristemet og karakteriser desse.

OPPGÅVE 3B – KROMOSOMFARGING – FRAMSTILLING AV "SQUASH"-PREPARAT

1. (Gjort av kurspersonale) Vanleg lauk frå butikken (kepalauk, *Allium cepa*) blei dyrka ved først å fjerne det yttarste brune skalet. Deretter blei røtene til lauken skrapa for møkk og sett i vatn (det blei brukt glas som berre lét røtene å kome ned i vatnet). Dette stod mørkt i 2 døger ved 20 °C til rotspissane var ca. 1 cm lange
2. Kutt rotspissane til omtrent 5 mm og plasser det i eit 5 minutt i ei blanding av 45 % eddiksyr: 1 M HCl (forholdet 9:1, løysinga er ferdigblanda) ved 50 °C. Bruk Eppendorf-rør. Denne fikseringa blautgjer vevet.
3. Skyl rotspissane 2 gongar à 5 minutt i destillert vatn.
4. Plasser ein rotspiss på eit objektglas og skjær vekk mesteparten sånn at berre 1-2 mm av spissen er igjen. Tilfør ein droppe orcein, vent 30-60 sekund og legg på eit dekkglas.
5. Varm objektglaset forsiktig ved at det førast fram og tilbake over ein spritflamme (temperaturen MÅ IKKJE OVERSTIGE 60 °C. Viss væska koker blir preparatet øydelagt).
6. Bank forsiktig med den butte enden av ein blyant eller kulepenn for å spreie cellene.
7. Plasser objektglaset i bretten på eit filterpapir og press hardt over dekkglaset med tommelfingeren (men ikkje så hardt at dekkglaset knusast). Kast filterpapiret i avtrekk.
8. Mikroskopier preparatet, skisser synlege celledelingsfasar og karakteriser desse.

ØVING I PIPETTERING

Denne oppgåva skal ikkje inn i rapporten

I fleire av oppgåvene som kjem seinare er det viktig å kunne pipettere nøyaktig. Lableiar vil demonstrere korleis ei handterer ein pipette, deretter får de sjølv øving i å bruke pipette korrekt. Dette skal gjerast ved ein enkel test, kor vatn skal pipetterast på eit vegeskip på ei vekt. ALLE skal gjennomføre denne oppgåva, ein lærar ikkje å bruke pipette ved å sjå på andre.

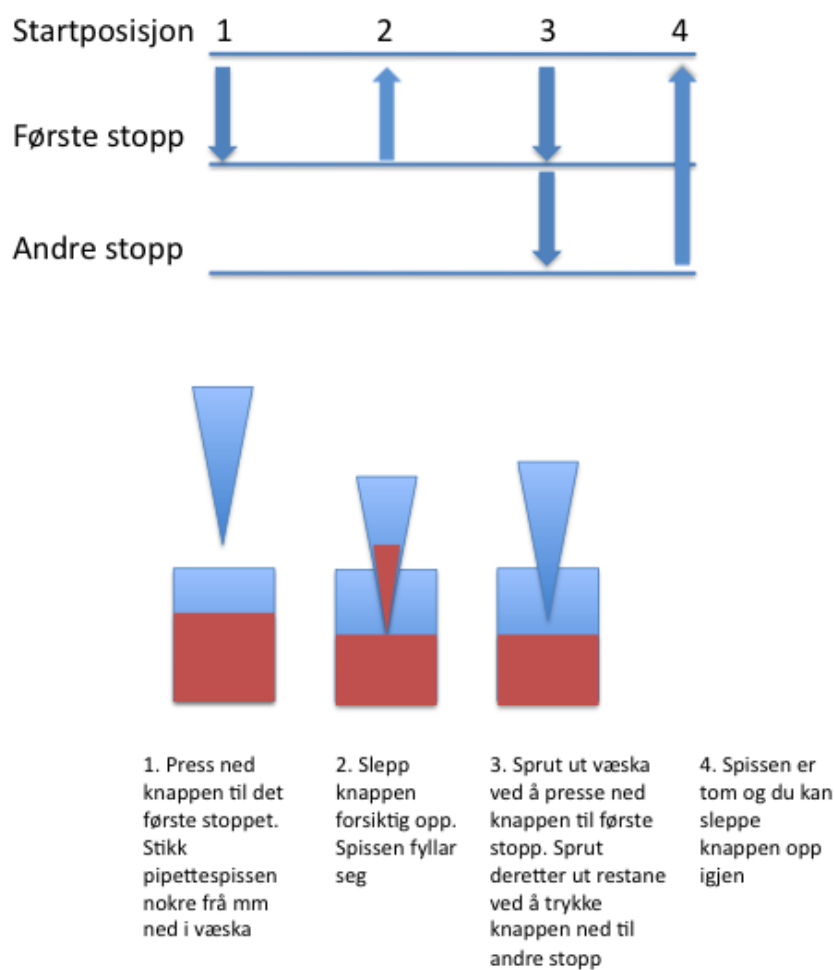
Kvart volum skal pipetterast 3 gongar, deretter samanliknar de dei 3 parallellane med kvarandre. avviket i vekt bør ikkje vere for stort. Sjekk gjerne med kurspersonalet at avviket ikkje er for stort. Farga på pipettane = farga på toppen av pipettane. Pipette med blå topp passar til dei blå spissane, den gule til dei gule spissane og den kvite til dei kvite spissane. Pipetter som vist i tabell 1:

Tabell 1. Øving i pipettering

Type pipette	Mengde å pipettere	Tilsvarende vekt	Resultat
Gul pipette (10-100 μl)	100 μl	100 mg	
Blå pipette (100-1000 μl)	500 μl	500 mg	
Blå pipette (100-1000 μl)	1000 μl	1000 mg	

Øv i tillegg på å bruke den kvite pipetten (0,5-10 μl), men dette trengst ikkje gjerast på vekt. Prøv ulike volum og observer kor høgt vatnet kjem i pipettespissen. Sprut vatnet ut i vegeskip og sjekk at alt vatnet har kome ut av pipettespissen

TIPS: Ein vassdrope er på omtrent 20 μl . Ved lågare volum må ein sannsynlegvis sette pipettespissen inntil veggen på eppendorf-røret (eller andre behaldarar) for å få væska ut av pipettespissen.



Figur 2. Illustrasjon av korrekt pipettebruk.

ALTERNATIVE OPPGÅVER – MITOSE HOS PLANTECELLER

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Forklar korleis cellesyklusen går føre seg.
2. Karakteriser dei ulike fasane i mitose.
3. Kva er viktig å tenkje på når ein skal bruke ein automatpipette?

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgåve 3A	
Gjennomlysmikroskop	Snittpreparat av <i>Vicia faba</i> (bønnevikke)
Oppgåve 3B	
Gjennomlysmikroskop	Skalpellblad
Varmeskap, 50 °C	Filterpapir
Eppendorf-rør	Sprittbrennar
Røter av <i>Allium cepa</i> (kepalauk)	Orceinløysing
Pinsett	Destillert vatn
Objektglas	1 M HCl
Dekkglas	45 % eddiksyre
Øving i pipettebruk	
Automatpipette (blå, gul og kvit)	Vatn
Vegeskip	Vekt

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Dyrka kepalauk	Vanleg søppel	
Skalpellblad	Stikkande, skjærande avfall	
Objektglas	Stikkande, skjærande avfall	
Dekkglas	Stikkande, skjærande avfall	
Eppendorf-rør	Vanleg søppel	
Pipettespisser	Vanleg søppel	
Vegeskip	Vanleg søppel	
45 % eddiksyre : 1 M HCl	Glasavfallsflaske for syreavfall	Hald i avtrekk! Kan gje alvorleg vevsskade på auge/hud og ved innånding/svelging. Etsande og giftig
Orceinløysing	Risikoavfall	Hald i avtrekk! Kan irritere hud, age, løftrør og spiserør

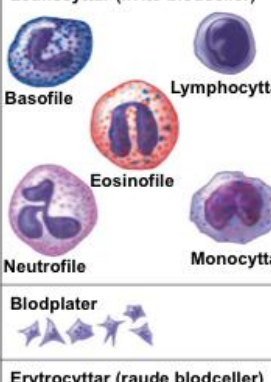
OPPGÅVE 4 – BLOD

BLODET SI SAMANSETNING OG FUNKSJON

Blodet består av fleire ulike celletypar som flyt i ei væske vi kallar plasma (Figur 1). Etter at ei blodprøve er teke kan celler separerast frå væskefasen ved sentrifugering. Då vil cellene (som utgjer omtrent 45 % av blodvolumet) samle seg i botna av sentrifugerøret/blodprøverøret. Cellefraksjonen kan sjåast som ein raud klump (pellet), medan plasma kan sjåast som den klare, gulaktige væska over.

BLODPLASMA

Blodplasmaet består av omtrent 90 % vatn. Her finn vi løyste uorganiske salt på ioneform (blodelektrolyttar). Iona opprettheld osmotisk balanse i blodet, og dei bidreg til å halde pH stabil. Dette gjer at blodet fungerer som ein buffer, og normal pH ligg mellom 7,35 og 7,45.

Plasma 55%		Cellulære komponentar 45%		
Komponent	Hovudfunksjonar	Celletype	Talet per μl (mm^3) blod	Funksjonar
Vatn (90 % av plasma)	Solvent ("løsemiddel") For frakt av ulike substansar		5 000–10 000	Immunforsvar
Ion (blod-elektrolyttar) Natrium Kalium Kalsium Magnesium Klor Bikarbonat	Osmotisk balanse, pH-bufing, og regulering av membran permeabilitet			
Plasmaprotein Albumin	Osmotisk balanse, pH-bufing			
Fibrinogen	Koagulering			
Immunoglobulin (antistoff)	Forsvar			
Substansar transportert av blod Næringsstoff Avfallsprodukt Respiratoriske gassar Hormon		Blodplater	250 000–400 000	Blod-koagulering
		Erytrocyttar (raude blodceller)	5–6 millionar	Transport av O_2 og noko CO_2

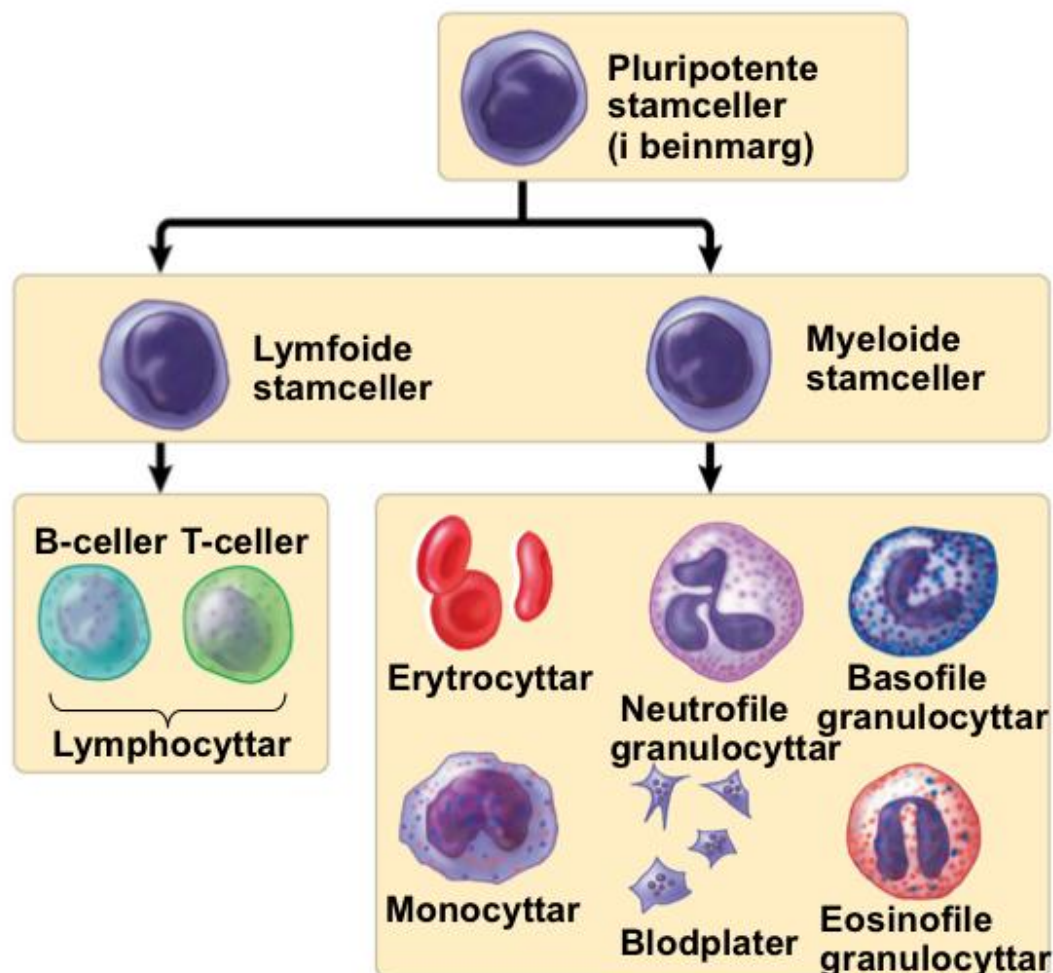
Figur 1. Samansetning av blod hos pattedyr (1).

Ei anna viktig klasse løyste stoff i plasma er plasma proteina. Desse bidreg til å halde pH stabil, oppretthalde osmotisk balanse mellom blod og interstitiell væske (ørsmå volum væske mellom celler), samt å bidra til viskositeten til blodet. Dei enkelte plasma proteina har dessutan spesialiserte funksjonar: dei bind opp og fraktar fettstoff/lipid og andre stoff som vanskeleg løysast i vatn. Ei anna klasse er immunoglobulina (antistoff) som hjelper til med å kjempe mot virus og andre framandekam som invaderer kroppen. Vidare finn vi fibrinogen – protein som tettast igjen hol i blodkar og er ansvarlege for koaguleringa/levringa av blodet ved sårskade. Viss vi fjernar fibrinogenfraksjonen frå blodet (let blodet koagulere og fjernar koagelet) står vi igjen med ein væskefraksjon vi kallar (blod)serum.

Blodet utgjer dessutan eit transportmedium for stoff som er på veg frå ein stad i kroppen til eit anna: næringsstoff, avfallsstoff, respiratoriske gassar og hormon. Blodplasma og interstitiell væske er like i samansetning, bortsett frå at plasma inneheld mykje høgare konsentrasjonar av protein.

BLODCELLER

Fritt i blodet finnest to hovudgrupper med celler (Figur 2): dei raude blodcellene (erytrocyttar) som transporterer oksygen, og dei kvite blodcellene (leukocyttar) som er involverte i immunforsvaret. Ein tredje komponent er blodplatene (trombocyttar), som er små cellefragment som er involverte i å tette igjen skadde blodkar (danning av blodpropp/trombe).



Figur 2. Cellene i blodet. Nokre av dei pluripotente stamcellene utviklar seg til lymfoide stamceller som igjen differensierer seg til B- og T-celler. Alle andre blodceller stammer frå myeloide stamceller (1).

Erytrocyttar

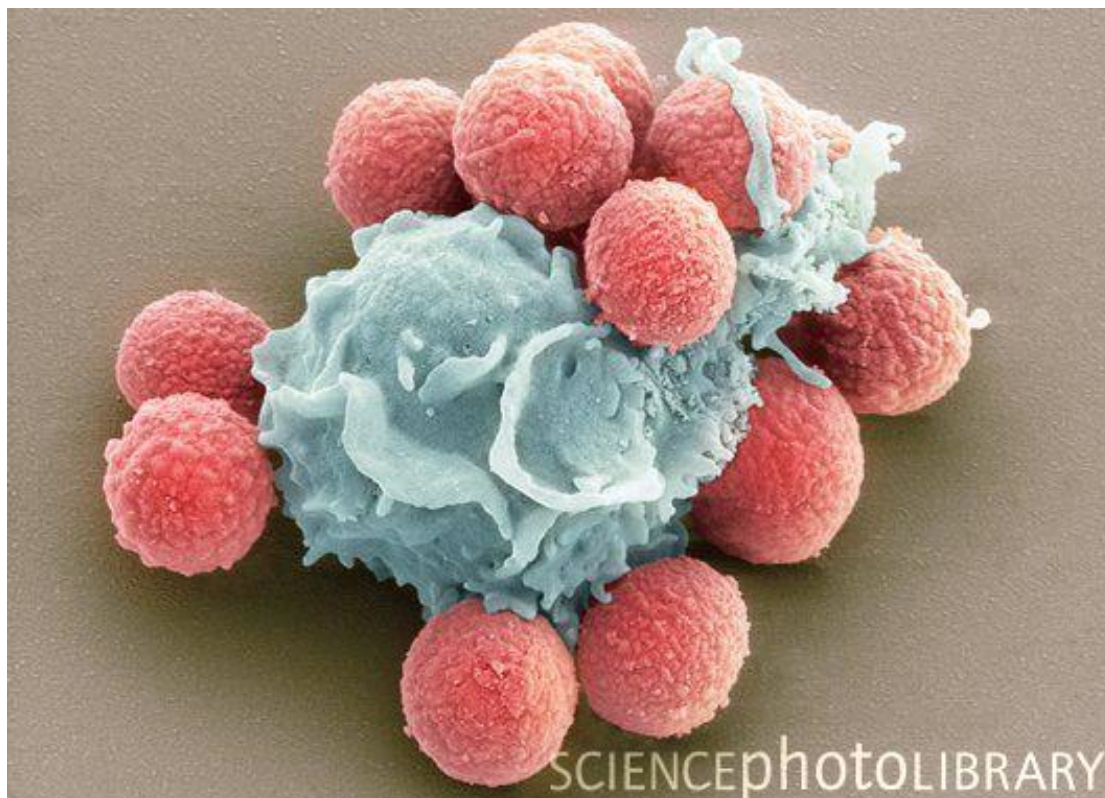
Det er dei raude blodcellene som utgjer mesteparten av celler i blodet (99,9 %). Kvar mikroliter menneskeblod inneheld 5-6 millionar raude blodceller, og det er ca. 25 trillionar av desse cellene i dei fem litrane med blod vi har! Erytrocyttar er eit godt eksempel på samanhengen mellom struktur og funksjon. Hovudfunksjonen er O_2 -transport som avheng av rask diffusjon av O_2 over plasmamembranane. Humane erytrocyttar er forma som små bikonkave skiver (ca. 7-8,5 μm i diameter) – tynnare i midten enn i kantane. Dette utgjer eit stort overflatevolum av den totale erytrocyttproduksjonen, og dess større den samla membranoverflata er i eit gjeve volum blod, dess raskare vil O_2 diffundere. Pattedyr sine erytrocyttar manglar kjerne, noko som gjer at det blir meir plass for hemoglobin (jernhaldige protein som transporterer O_2). Erytrocyttane manglar dessutan mitokondriar og danner ATP utelukkande ved anaerob metabolisme. På denne måten unngår ein at erytrocyttane bruker av O_2 som dei fraktar.

Sjølvs om dei er svært små inneheld kvar erytrocytt omtrent 250 millionar hemoglobinmolekyl. Kvart hemoglobin kan binde opp til 4 molekyl O_2 , slik at kvar erytrocytt kan transportere 1 milliard O_2 -molekyl.

Leukocyttar

Dei kvite blodcellene, leukocytane, er alle litt større enn dei raude blodcellene – 7-15 μm . Alle leukocytane har, i motsetning til erytrocyttane, kjerne. Kvite blodceller oppheld seg mesteparten av tida utanfor blodkarsystemet, dei kontrollerer gjennom interstitiell væske og lymfesystemet kor dei fleste slaga mot patogene mikrobar blir utkjempa. Normalt vil ein mikroliter menneskeblod ha omtrent 5 000-10 000 leukocyttar, det vil seie at det er omtrent ei kvit blodcelle per tusen raude. Talet aukar derimot når kroppen kjempar mot ein infeksjon. Vi kan klassifisere 3 hovudtypar leukocyttar: **granulocuttar** (nøytrofile, eosinofile og basofile), **lymfocyttar** og **monocyttar**.

Samla bidreg dei kvite blodcellene til å kjempe mot infeksjonar. Dette skjer ved gjennom direkte celle-celle-kontakt, eller gjennom ulike signalsubstansar (cytokinar, chemokinar) eller antimikrobielle protein (interferon, antistoff, komplementsfaktorar) som immuncellene skil ut. Monocyttar og nøytrofile granulocytar er for eksempel fagocytterande celler som omsluttar og fortærer mikrobar og restar av døde celler frå kroppen (Figur 3).



Figur 3. Fagocytose av soppsporar. Ein nøytrofil granulocyt fagocytterer soppsporer frå *Aspergillus fumigatus* (2).

a. Granulocyttar

Granulocytane utgjer omtrent 50-70 % av alle leukocytane. Granulocytane har ei typisk lappedelt kjerne og inneheld granula eller korn som er svært karakteristiske for desse cellene. Korn inneheld substansar som er karakteristiske for kvar type granulocyt, og som gjev dei kvar sin spesialiserte funksjon. I nokre granulocytar blir korna farga av sure fargestoff (eosin – raudrosa farge) og blir kalla eosinofile granulocytar (1-4 %). I andre granulocytar bli korna farga av basiske fargestoff (metylblått – blålilla farge) og blir kalla basofile granulocytar (0,5-1 %). Dei fleste (50-

70 %) granulocytane er nøytrofile granulocytter, kor korna ikkje har nokon affinitet til verken sure eller basiske fargestoff. Dei nøytrofile granulocytane er fagocytter, det vil seie at dei er i stand til å oppta og fordøye faste stoff i cytoplasmaet sitt (fagocytose). Dei kan òg vandre ut av blodårene og inn i bindevevet kor dei fagocytterar partiklar som ikkje høyrer heime der, for eksempel bakteriar. Dei hindrar på den måten infeksjon. Mange nøytrofile granulocytter vil sjølv gå til grunne under fagocytosen. Døde og levande blodcellar saman med nøytrofile granulocytter utgjer det vi kallar verk eller puss.

b. Lymfocytter

Lymfocytane er dei minste av dei kvite blodcellene. Dei fleste er 6-8 μm , omtrent like store som dei raude blodcellene, men dei kan vere større (12 μm). Dei utgjer 25-40 % av dei kvite blodcellene. Dei har ei rund kjerne som opptek mesteparten av cella. Lymfocytane er i motsetning til granulocytter og monocytter involvert i det spesifikke, erverva immunforsvaret. Dei består av B- og T-celler og har ei viktig rolle for danning av antistoff. Lymfocytter utviklar seg til spesialiserte B- og T-celler som er ansvarlege for ein rask og spesifikk immunrespons mot framande substansar.

c. Monocytter

Monocytane er dei største cellene i blodet, 12-20 μm i diameter. Dei har ei oval eller hesteskoforma kjerne, og dei utgjer 2-8 % av alle kvite blodceller. Monocytane patruljerer i blodbanen, og i respons på signal som tyder på skade/infeksjon vil dei migrere ut i det skadde/infiserte vevet. Då blir dei kalla makrofagar, desse har òg evna til å fagocyttere framandelement og mikrobar (likt dei nøytrofile granulocytane).

Trombocytter

Den tredje komponenten i blodet er blodplatene, fragment av celler på ca. 2-3 μm i diameter. Dei har heller ikkje kjerne, g er avsnøringar av cytoplasmiske fragment frå store megakaryocytceller i beinmargen. Frå beinmargen entrar dei blodet og deltek i den viktige tettinga av skadde blodkar.

STAMCELLER OG FORNYING AV BLODCELLENE

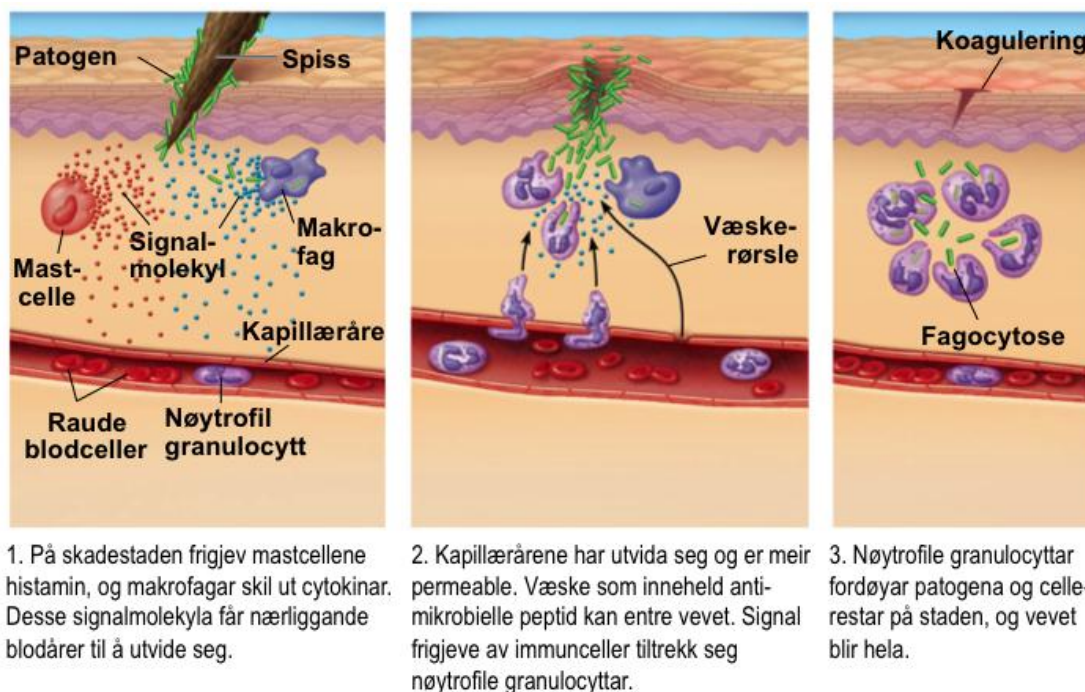
Dei cellulære elementa i blodet (erytrocyttar, leukocyttar og trombocytter) blir slitt ut og erstatta konstant heile livet. Erytrocyttane sirkulerer i 3-4 månader før dei blir brotne ned av fagocytterande celler i lever og milt. Enzym bryt ned den gamle cella sine makromolekyl, og biosynteseprosessar byggjar opp nye makromolekyl ved gjenbruk av monomerar, for eksempel aminosyrer frå dei gamle blodcellene, gjerne i kombinasjon med nye materialar og energi frå maten vi spis. Mange jernatom frå hemoglobin i dei gamle erytrocyttane blir inkorporert i nye hemoglobinmolekyl i nye erytrocyttar.

Erytrocyttar, leukocyttar og blodplater stammar alle frå ei felles kjelde: ein enkelt populasjon av celler som blir kalla pluripotente stamceller i den raude beinmargen (særleg i ribbein, ryggstøyle, brystbein og bekken, Figur 2). "Pluripotent" betyr at desse cellene har potensiale til å differensiere/utvikle seg til alle typar blodceller eller blodplatedannande megakaryocyt. Pluripotente stamceller blir danna tidleg i embryoutviklinga, og populasjonen fornyar seg sjølv og sørger for kontinuerleg tilføring av blodceller livet ut.

BETENNELSE

Skade på vev eller fysisk skade eller infeksjon fører til at det blir sett fri mange ulike kjemiske signal som utløyser ein lokal betennelsesreaksjon (inflammasjon, av latin "inflammare", å setje fyr på). Eit av dei mest aktive kjemikaliene er **histamin** som er lagra i mastceller i bindeveva.

Ved skade vil mastcellene frigje histamin, noko som fører til at blodkara utvidar seg og gjev auka permeabilitet i kapillærårene som ligg i nærleiken. Aktiverte makrofagar og andre celler bidreg med å sleppe fri ei rekke andre signal, for eksempel **prostaglandin**, som bidreg ytterlegare til å auka blodgjennomstrøyminga på skadestaden. Auka blodgjennomstrøyming gjev raudheita og varmen som er typisk for betennelsar (tenk på kviser, myggstikk, stikk i fingeren – sjå figur 4).



Figur 4. Lokal betennelse. Hovudtrekka i inflammatorisk respons (1).

Sjølv om varme og hevelse kan kjennest ubehageleg, er denne auka blodgjennomstrøyminga og auka permeabiliteten heilt kritisk for det medfødde og uspesifikke immunforsvaret. Desse endringane i karveggen bidreg til å til å avlevere antimikrobielle protein og koaguleringskomponent til skadestaden. Fleire aktiverte komplementprotein bidreg for eksempel til at histamin blir frigjeve og tiltrekk fagocytterande makrofagar til skadestaden. Blodkoagulering sett i gang reperasjonsprosessar og forhindrar at mikrobane blir spreidd til andre stadar i kroppen. I tillegg gjer auka blodgjennomstrøyming og permeabilitet at fleire nøytrofile granulocytar og monocytar/makrofagar kan bevege seg frå blodbanen og inn i det betente vevet. Små protein kalla **kjemokinar**, lokkar desse fagocyttane til skadestaden og får dei til å produsere antimikrobielle sambindingar. Kjemokinar blir skilt ut av mange celletypar, inkludert endotelcellene i blodkarveggen.

Ein liten skade gjev oftast ein liten, lokal betennelse, men kroppen kan òg mobilisere ein altomfattande systemisk respons ved alvorleg vevsskade eller infeksjon. Skadde celler vil signalisere etter hjelp ved å skilje ut for eksempel **cytokinar**, **kjemokinar** og **vekstfaktorar**, faktorar som kan stimulere til frisetjing av fleire nøytrofile granulocytar frå beinmargen. Ved alvorleg infeksjon, for eksempel hjernehinnebetennelse (meningitt) eller blindtarmbetennelse (appendisitt) kan talet på leukocytar i blodet auke til det mangedobbelte berre i løpet av få timar etter at betennelsesreaksjonen vart initiert. Ein anna systemisk respons til infeksjon er feber. Feber oppstår når visse giftstoff (toksin) frå patogene mikroorganismar aktiverer makrofagar til å frigje bestemte substansar. Desse substansane skur termostaten i kroppen opp til ein høgare temperatur. Høg feber er skadeleg, men moderat feber kan påskynde fagocytose, og ved at ulike kroppsreaksjonar skjer raskare bli òg reperasjonsprosessane påskynda.

BLODUTSTRYK

Vurdering av blodcellene sin morfologi og prosentvise fordeling er av stor betydning i diagnostikk og oppfølging av dei fleste blodsjukdommar. Fleire andre sjukdommar kan òg gje forandringar i blodbiletet.

Prinsipp

Ein bloddrope strykast tynt utover eit objektglas. I den optimale delen av utstryket blir cellene liggande meir eller mindre enkeltvis slik at ein kan vurdere både morfologien og den prosentvise fordelinga deira. Utstryket blir fiksert ved hjelp av metanol (hindrar degradering av cellulære strukturar og komponentar) og blir deretter farga med May-Grünwald/Giemsa-fargemetode. Ved hjelp av denne polykromatiske (fleirfarga) fargeteknikken bli ulike fargar kopla til den sure kjernesubstansen og det alkaliske cytoplasma i cellene. Fargestoffa er nøytrale salt som ioniserer i vassløysing og reagerer med motsett ladde ion i cellene. Strukturane i cella kjem dermed tydeleg fram, og dei ulike celletypene kan skiljast ifrå kvarandre. For å få riktig farging er det viktig å ha ein pH på 6,8 (Sørensens fosfatbuffer).

Litteratur:

1. Campbell, N.A . Biology. 9. utgåve. San Fransisco, USA: Benjamin Cummings; 2011
2. . Gunzer, M. Phagocytosis of fungal spores, SEM [Internett]. Wales, England: SciencePhotoLibrary [(n.d.) 03.12.11]. Tilgjengeleg frå <http://www.sciencephoto.com/media/305633/enlarge>

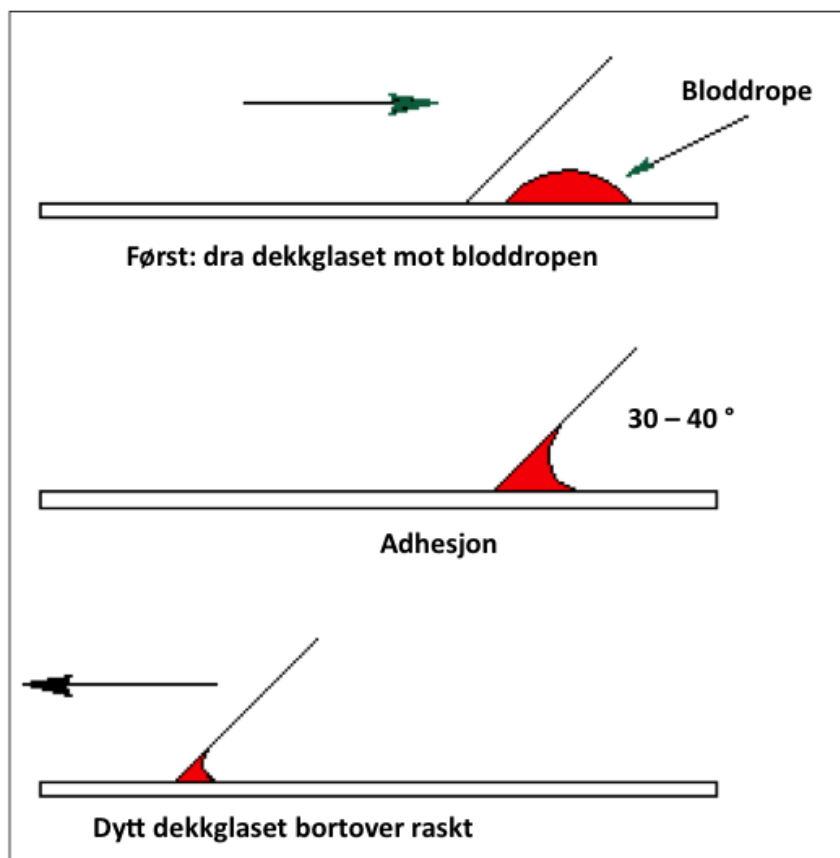
OPPGÅVE 4A – MIKROSKOPERING AV BLOD FRÅ MENNESKE

Legg ein drope fysiologisk saltvatn (0,9 % NaCl) på eit objektglas og tilsett ein liten drope blod (dagferskt frå Blodbanken på St. Olavs Hospital). For mykje blod kan gjere det vanskeleg å sjå noko. Legg på dekkglas og sjå på preparatet i lysmikroskopet. Bruk både vanleg gjennomlys og fasekontrast.

OPPGÅVE 4B – TILLAGING OG MIKROSKOPERING AV BLODUTSTRYK

A. Tillaging av utstryket

1. Reine objektglas skal dyppast i 96 % etanol og tørkast av med linsepapir like før bruk (gjort av kurspersonale). Objektglasa må vere reine og tørre, fri for fett og støvpartiklar.
2. Ein liten drope blod plasserast ca. 1 cm frå enden og midt på glaset ved hjelp av kapillærrør. Prøv å få til en liten drope. Sett eit objektglas like framfor dropen i en vinkel på ca. 45 °. Trekk glaset bakover til det kjem i kontakt med dropen, og skyv det så framover i ein jamn, bestemt bevegelse (Figur 5).



Figur 5. Metode for å lage blodutstryk

B. Fiksering og farging (i avtrekk)

3. Lufttørk blodutstryket. Eit pent, tynt utstryk tørkar utan at ein må "vifte" det. Viss blodutstryket er for tjukt må ein lage eit nytt.
4. Fikser utstryket i absolutt metanol i 15 minutt i eit fargekar i avtrekk.
5. Snarast mogeleg etter fikseringa skal utstryket settast ned i eit fargekar med fortynna May-Grünwald fargeløysing. Fargetid 5 minutt.
6. Sett blodutstryket over i eit fargekar med fortynna Giemsa fargeløysing. Fargetid 15 minutt.
7. Skyll utstryket i Sørensens fosfatbuffer, pH 6,8 i 5 minutt.
8. Sett utstryket vertikalt til tørking.
9. Drypp på ein drope vatn og legg på eit stort dekkglas.
10. Sjå på blodutstryket i det området kor det er så tynt at raude blodceller ligg jamt fordelt. Dei kvite blodcellene ligg oftast i størst mengde langs kantane av utstryket.

4C – OSMOSE I BLODCELLER

Denne oppgåva går raskt og kan gjerne gjerast medan blodutstryka står til farging

1. Drypp ein drope destillert vatn på eit objektglas og tilsett litt blod med eit kapillærrør. Observer kva som skjer i lysmikroskop. Samanlikn med blodet i oppgåve 4A.
2. Drypp ein drope hypertont saltløysing (NaCl, 5 %) på eit objektglas og tilsett litt blod med eit kapillærrør. Observer kva som skjer i lysmikroskop. Samanlikn med blodet i oppgåve 4A.

ALTERNATIVE OPPGÅVER – BLOD

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

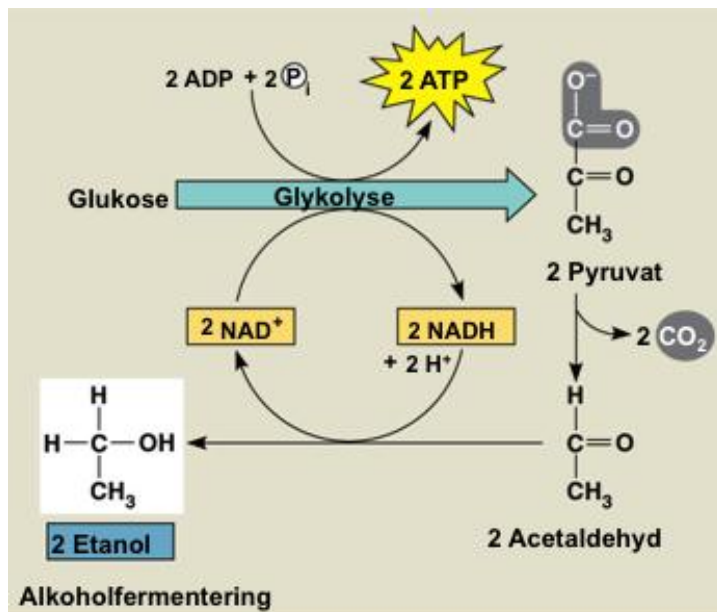
1. Forklar korleis blodceller blir differensierte.
2. Fortel litt om dei ulike typane blodceller hos pattedyr.
3. Korfor er det naudsynt å farge blodpreparatet? Kva celler kjem tydelegare fram og korfor?
4. Kva vil skje med blodcellene i oppgåve 4C samanlikna med dei i oppgåve 4A og korfor?

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgåve 4A	
Gjennomlysmikroskop	0,9 % NaCl
Objektglas	Veneblod med EDTA
Dekkglas	
Oppgåve 4B	
Gjennomlysmikroskop	Absolutt metanol
Objektglas	96 % etanol
Dekkglas	May-Grünwald fargeløysing(Eosin-etylenblått)
Veneblod med EDTA	Giemsa fargeløysing (Azur-eosin-metylenblått)
4 fargekar	Sørensens fosfatbuffer, pH 6,8
Oppgåve 4C	
Gjennomlysmikroskop	Veneblod med EDTA
Objektglas	Destillert vatn
Dekkglas	5 % NaCl

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Blod	Risiko! Glas!	Humant blod skal sjåast på som potensielt smittefarleg. Blodtilsølt avfall skal kastast i risikoavfall. Ferdig farga preparat skal i glasavfall.
Etanol	Avløp i avtrekk	GIFTIG! Kan vere livstruande viss svelga. Skadeleg viss inhalert eller absorbert via hud.
Metanol	Samlebeholdar i avtrekk	GIFTIG! Kan vere livstruande eller føre til blindheit viss svelga. Skadeleg viss inhalert eller absorbert via hud.
May-Grünwald fargeløysing	Samlebeholdar i avtrekk	Skadeleg viss svelga. Kan gje magetrøbbel og brennande følelse i munnen.
	Samlebeholdar i avtrekk	Skadeleg viss svelga, inhalert eller absorbert via hud. Er irriterande på hud, auge og andedrett.
Sørensens fosfatbuffer	Avløp i avtrekk	Etterskylt godt
NaCl	Avløp	



Figur 2. Alkoholfermentering. Fermentering brukast for å produsere ATP ved fosforylering på substratnivå. Pyruvat fungerer som elektronakseptor for å oksidere NADH tilbake til NAD⁺, som så kan gjenbrukast i glykolysen (1).

Litteratur:

1. Campbell, N.A. . Biology. 9. utgåve. San Fransisco, USA: Benjamin Cummings; 2011

OPPGÅVE 5A – PRODUKSJON AV CO₂ UNDER FERMENTERING

Gjær blir brukt når ein baker og når ein produserer alkoholhaldige drikkar. Gjær kan respirere utan oksygen og bryte glukose ned til etanol og CO₂. I denne oppgåva skal CO₂-produksjon demonstrerast under fermentering hos gjær. I tillegg skal effektar frå ulike sambindingar som er involvert i respirasjon vurderast:

- Pyruvat: eit produkt i glykolysen. Pyruvat blir redusert til etanol ved fermentering.
- MgSO₄: Kjelde til Mg²⁺, ein kofaktor som aktiverer nokre enzym i glykolysen.
- NaF: Hemmar nokre av enzyma i glykolysen.
- Glukose: Energikjelda til gjærsoppen.

Framgangsmåte

1. Merk 7 reagensrør som vist i tabell 1. Bland etterkvart ved å sette tommelen framfor røret og vend det nokre gongar til det er ordentleg blanda.
2. Bruk pasteurpipette og fyll eit 3 cm rør med løysing frå reagensrør nummer 1. Slepp dette røret opp ned i reagensrør 1. Ta eit nytt 3 cm rør, fyll opp med løysing nr. 2 og slepp i reagensrør nr. 2. Gjenta prosedyren til du har eit lite rør i alle reagensrør. Unngå luft inni dei små røra.
3. Inkuber ved 37 °C i 90 minutt.
4. Observer danning av små boblar inni dei små røra, dette er oppsamla CO₂. Avgjer effekten av pyruvat, MgSO₄, NaF og glukose på CO₂-produksjonen ved å samanlikne røra.

Tabell 1. Forsøksoppsett for alkoholfermentering ved gjær

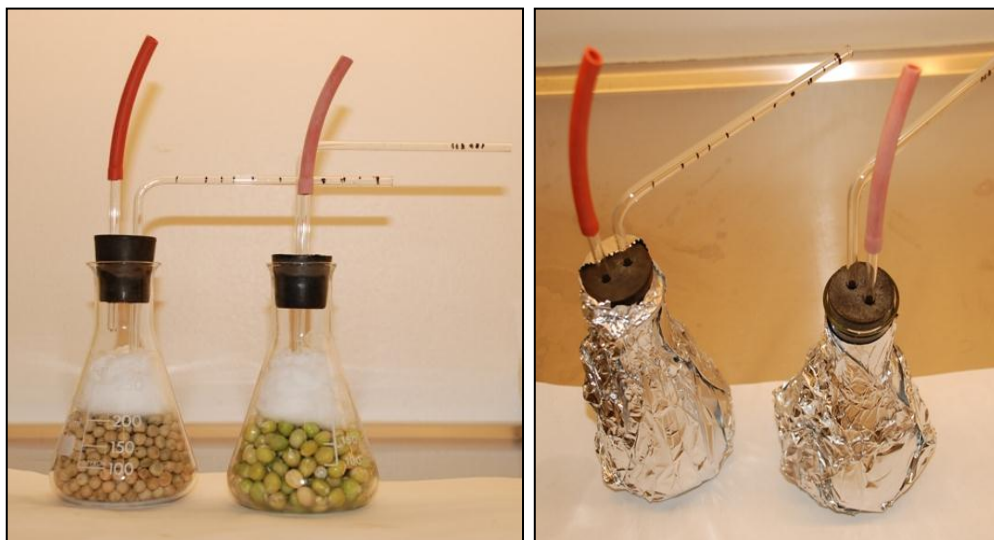
Rør	NaPyruvat (3M)	MgSO ₄ (0,1 M)	NaF (0,1 M)	Glukose (5 %)	Vatn	Fyll heile røret med	Bobledanning
1	-	-	-	-	7,5 ml	Gjær	
2	-	-	-	2,5 ml	5 ml	Gjær	
3	-	5 ml	-	2,5 ml	-	Gjær	
4	-	-	0,5 ml	2,5 ml	4,5 ml	Gjær	
5	-	-	5 ml	2,5 ml	-	Gjær	
6	2,5 ml	-	2,5 ml	2,5 ml	-	Gjær	
7	-	-	-	2,5 ml	5 ml	Vatn	

OPPGÅVE 5B – OKSYGENOPPTAK UNDER AEROB RESPIRASJON

Aerob respirasjon bruker oksygen som den siste elektronmottakaren i elektrontransportkjeda. Oksygenet blir redusert til vatn, og det blir produsert CO₂. Denne gassen tar like stor plass som det forbrukte oksygenet, men ved å bruke KOH kan man absorbere CO₂ (Likning 1).



1. Fyll ein erlenmeyerkolbe (250 ml) halvvegs opp med spirande ertar (til ca 200 ml-merket), ein annan kolbe med varmeinaktiverte ertar. Dei spirande ertene har vore lagt i vatn 3-4 dagar i mørke, medan dei varmeinaktiverte ertene har vorte autoklavert.
2. Dekk ertene med bomull. Det skal vere så mykje bomull at KOH ikkje blir blaut når ein legg det oppå bomulla. Ikkje pakk bomulla for tett, då blir det veldig dårleg gassutveksling.
3. Legg KOH (kailumhydroksid) på eit folda tørkepapir oppå bomulla. Det er viktig at dette blir gjort på ein måte så ein ikkje risikerer at KOH fell ned på ertene når forsøket er ferdig.
4. Sett ein gummipropp med 2 glastrør i toppen av kolben. Glasrøra må ikkje stikke ned i KOH-en.
5. Dekk heile røret med aluminiumsfolie for å hindre lys og fotosyntese. Sjå figur 3 for forsøksoppsett.
6. Sørg for at kolben står ein stad utan gjennomtrekk.
7. Bruk pipette til å sette litt vatn i det bøygde røret som sit i gummiproppen (ca. ein halv cm inn). **Obs! Pass på at det ikkje kjem vatn ned i erlenmeyerkolben, då dette vil øydelegge forsøket.**
8. Etter kalibrering (utjamning av temperatur) skal det settast ei klemme på røret med slange på for å lage eit tett system. Bruk ein tusj til å markere posisjonen til vatnet i det bøygde røret kvart 30. sekund. Hugs å markere startpunktet. Når målingane er ferdige skal kvart intervall målast **frå startpunktet**.
9. Når utstyret skal takast ifrå kvarandre – start med å ta av klemma. Viss korken blir teke ut av kolben vil vatnet bli sogt ned i KOH-en. Pass på at det ikkje blir søl med KOH, då dette er etsande!



Figur 3. Forsøksoppsett for oppgave 5B, respirasjon hos ertre. Ver obs på at figuren ikkje viser klemma på gummislangen og filterpapiret mellom bomulla og ertene.

ALTERNATIVE OPPGÅVER – CELLULÆR RESPIRASJON

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Forklar i korte trekk kva som skjer i glykolysen og sitronsyresyklusen.
2. Forklar kva som skjer ved alkoholfermentering.
3. Vurder kva rør i oppgave 5A du vil/ikkje vil få gassutvikling. Grunnngje svara.

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgave 5A	
7 stk. reagensrør med stativ	NaPyruvat (3M)
7 stk. 3 cm rør	MgSO ₄ (0,1 M)
Gjærløysing	NaF (0,1 M)
Destillert vatn	Glukose (5 %)
Oppgave 5B	
Erlenmeyerkolbe (250 ml)	Spirande ertre
Bomull	Varmeinaktiverte ertre
Filterpapir	Gummikork med to rør
Tusj	Vatn
KOH (kaliumhydroksid)	

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
NaF (natriumfluorid)	NaF-avfall samlast i eigne behaldarar i avtrekk og slåast til slutt ut i vask i avtrekk. Skyl grundig.	Kan gje forgifting/vere livstruande ved svelging/inhalering i store mengder. Ved søl: skyl med vatn
MgSO ₄ (magnesiumsulfat)		Kan vere irriterande ved svelging/inhalering i store mengder Ved søl: skyl med vatn
Spirande erter	Samle i avtrekk for å unngå lukt	
Varmeinaktiverte erter	Kan brukast på nytt viss ikkje tilsølt med KOH	
Gjærløysing med anna innhald enn NaF	Avløp	
3 cm rør	Glasavfall	
KOH (kaliumhydroksid)	Samlast opp i eigne behaldarar i avtrekk. Prøv så godt som mogeleg å skilje KOH og bomull/filterpapir. Bomull og filterpapir kan kastast i vanleg avfall.	Sterk, korroderande base/lut som gjev sterk varme ved kontakt med vatn. Luten kan gje alvorleg forbrenning/etsing av hud, auge, luftvegar, mage/tarm. Særs øydeleggjande for alle organ, an vere livstruande ved svelging Ved søl: sørg for lufting, ta av tilsølte klede, skyl med rennande vatn

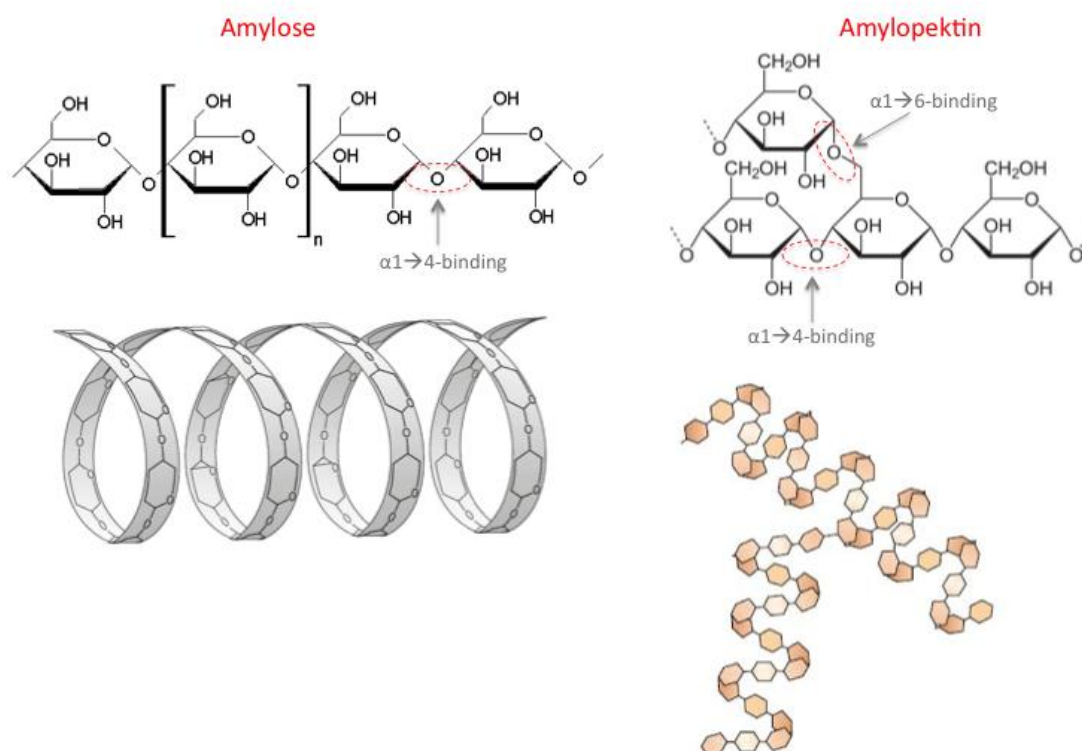
OPPGÅVE 6 – KARBOHYDRAT

KARBOHYDRAT

Karbohydrat er ei fellesnemning på ei rekke stoff som inneheld karbon, oksygen og hydrogen, vanlegvis i forholdet $C_x(H_2O)_y$, og blir produsert av plantar ved hjelp av fotosyntesen. Ulike typar karbohydrat har ulike oppgåver i plantane: stivelse og sukker er energilager, medan cellulose fungerer som reisverk. Karbohydrat kan finnest i form av monosakkarid (for eksempel fruktose og glukose), disakkarid (for eksempel sukrose, laktose og maltose), oligosakkarid og polysakkarid (for eksempel cellulose, fiber, pektin og stivelse). Poteter, kornprodukt og grønnsaker er gode kjelder til stivelse.

STIVELSE OG GLUKOSE

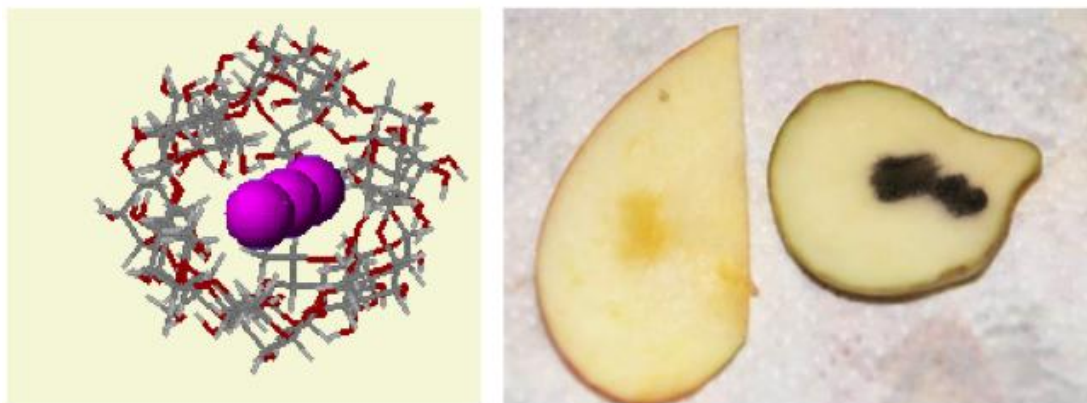
Stivelse består av glukosemolekyl og førekjem i to former: amylose og amylopektin (Figur 1). Naturleg stivelse består av ca. 10-30 % amylose og ca. 70-90 % amylopektin. Karakteristisk for amylose er at han er ugreina, og har berre $\alpha 1 \rightarrow 4$ -bindingar mellom glukoseeiningane. Amylose har vanlegvis 100-300 glukoseeiningar, og bindingsvinkelen til $\alpha 1 \rightarrow 4$ -bindingane gjer at amylose formar ein spiral. Amylopektin er forgreina ved at det førekjem både $\alpha 1 \rightarrow 4$ - og $\alpha 1 \rightarrow 6$ -bindingar mellom glukoseeiningane. Det er $\alpha 1 \rightarrow 6$ -bindingane som er årsaka til forgreiningane. Dei finst ved ca. Kvart 8.-9. Glukosemolekyl og består av 15-25 glukoseeiningar. I og med at amylopektin har mange fleire "lause endar" går det raskare å bryte ned denne enn amylose. Amylose vil på grunn av dette vere meir lågglykemisk, og forholdet mellom amylose og amylopektin i stivelse som blir spist vil derfor ha ulik effekt på blodsukkeret.



Figur 1. Stivelse i formene amylose og amylopektin (1, 2).

JOD-KALIUMJODIDTEST FOR PÅVISING AV STIVELSE

Jod-kaliumjodidtesten (JKJ-testen) er ein kjemisk test for påvising av amylose. Jod er tungt løyseleg i vatn, men er løyseleg i nærvær av kaliumjodid. Blandinga av jod og kaliumjodid dannar eit løyseleg, lineært trijodid-ion (I_3^-) som dannar eit blåsvart kompleks med amylospiralen ved at I_3^- legg seg inni spiralen (Figur 2). Viss det berre er amylopektin tilstades vil ikkje løysinga ta farge med unntak av den raudbrune fargen til JKJ-løysinga.



Figur 2. Kompleks av amylose og I_3^- (venstre) og effekt av jod-kaliumjodidløysing på matvarer med ulikt innhald av stivelse. Eple (til venstre, bilete 2) har relativt lite stivelse i form av amylose, medan potet (til høgre) har mykje og blir farga blåsvart (3, 4).

SPEKTROFOTOMETRI

Spektrofotometri blir brukt til å fastslå konsentrasjonen av ei kjemisk sambinding i ei løysing ved å måle absorpsjon av lys i løysinga. Alle kjemiske stoff absorberer (tek opp) elektromagnetiske stråler av bestemte bølgjelengder. Jo høgare konsentrasjon ein har av eit bestemt stoff i ei løysing, jo meir blir absorbert. Nokre sambindingar kan absorbere lys ved fleire bølgjelengder. Eit slikt eksempel er klorofyll a som har absorpsjonsmaksima ved ca. 425 og 660 nanometer (nm). For å måle konsentrasjonar av slike sambindingar er det vanlegast å bruke lys med bølgjelengde som stoffet absorberer mest av.

Eit spektrofotometer (Figur 3) består av ei lyskjelde som via ei linse og eit filter sender lys gjennom ei løysing. Intensiteten av lyset som passerer løysinga blir målt av ei fotocelle. Viss ein skal måle få prøver er det vanleg å bruke kyvetter i plast eller glas (finst på kurslaben), men viss ein skal måle mange prøver er det raskare å bruke 96-brønnarsplater. Sjølv om ein må bruke to ulike apparat til kyvetter og 96-brønnarsplater er prinsippet det same.

Det er ikkje berre konsentrasjonen av løysinga, men òg kor mykje løysing lyset må gå gjennom som avgjer kor mykje lys som blir absorbert. Derfor er det viktig å bruke like kyvetter ved absorpsjonsmålingar. Ved bruk av 96-brønnarsplater er det viktig å bruke same volum i alle brønnane.

For å avgjere konsentrasjonen av ei bestemt sambinding i ei løysing (for eksempel glukose) må ein lage ei standardkurve basert på kjente løysingar med kjente konsentrasjonar av same sambinding (i dette tilfellet glukose). Ein vel den bølgjelengda ein skal måle ved og måler deretter alle prøvene inklusiv blankprøva og standardprøvene ved same bølgjelengde for å finne absorbansen/OD-verdiar (OD står for "optical density") for prøvene. Blankprøva er ein negativ kontroll som inneheld det same som dei andre løysingane, berre ikkje sambindinga ein skal måle. I dette tilfellet er blankprøva vatn, og vil tilsvare "bakgrunnsstøyen" i prøvene. Ein

må trekke verdien for blankprøva ifrå dei andre målte verdiane for å kunne sjå bort ifrå denne "bakgrunnsstøyen".



Figur 3. Eksempel på spektrofotometer. Denne typen spektrofotometer blir kalla platelesar og blir brukt til å lese av 96-brønnarsplater (5).

Ein plottar konsentrasjonen for dei kjente prøvene (standardane) mot dei målte OD-verdiane sånn at ein får konsentrasjon på x-aksen og absorbans på y-aksen. Deretter brukar ein lineær regresjon for å finne ei likning for forholdet mellom konsentrasjon og absorbans. Ved å bruke denne likninga og målingane for dei ukjente prøvene går det an å estimere konsentrasjonen av den aktuelle sambindinga. Ein må vere obs på at forholdet mellom konsentrasjon og absorbans er lineært berre opp til omtrent 1,5-2, så for høgare OD-verdiar blir estimering av konsentrasjon veldig usikker (Beers lov).

PÅVISNING AV STIVELSEINNHOLD I MJØL VED HJELP AV GOPOD-METODEN OG SPEKTROFOTOMETRI

Som tidlegare nemnt er stivelse bygd opp av ei rekke glukoseeiningar. Ved å bryte stivelsen i mjøl ned til glukose kan ein indirekte bestemme kor mykje stivelse som var i mjølet (Likning 1). For å bryte stivelsen i mjølet ned til glukose trengst 2 ulike enzym: α -amylase (spaltar $\alpha 1 \rightarrow 4$ -bindingane) og deretter amyloglukosidase (spaltar $\alpha 1 \rightarrow 6$ -bindingane). Desse to enzyma har optimum ved ulike temperaturar og pH, derfor må reaksjonen skje i to omgangar.

Glukose kan vidare omdannast til glukonat og hydrogenperoksid (H_2O_2) ved hjelp av eit tredje enzym: glukoseoksidase (GO) (Likning 2). Hydrogenperoksid som blir danna i denne reaksjonen vil vidare reagere med 4-aminoantipyrin katalysert av eit fjerde enzym, peroksidase (POD), og resultatet vil bli eit raudfarga produkt som kan målast i spektrofotometer. Samanhengen mellom kor mykje stivelse som finst i mjølet er altså proporsjonal med kor mykje raudfarga quinon som blir danna i GOPOD-reaksjonane (Likning 3).

Prinsipp for α -amylase-amyloglukosidasereaksjonen



Prinsipp for GOPOD-reaksjonen



Litteratur:

1. Wikimedia Commons; 20.11.2011 [20.11.2011; 27.11.2011]. Tilgjengeleg frå http://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page
2. Biyo-Tek (2011). Carbohydrates [Internett]. Bucuresti: Biyo-Tek; 2011 [2011; 08.12.11]. Tilgjengeleg frå <http://www.sonefe.org/online-biyoloji-dersleri/grade-10/carbohydrates/>
3. Keusch, P. (2006). Starch – widely available in many foods [Internett]. Regensburg: Universität Regensburg; 2006 [2006; 08.12.11]. Tilgjengeleg frå <http://www.demochem.de/D-Starch-e.htm>
4. WebExhibits (n.d). Do it Yourself: Starch Test [Internett]. WebExhibits; 1999 [(n.d); 08.12.11]. Tilgjengeleg frå <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/6AC.html>
5. Laboratory News Network (2011). Abcam ELISA assay method for use with Biochrom microplate readers. Laboratory News Network; 21.11.2011 [21.11.2011; 08.12.11]. Tilgjengeleg frå <http://labnewsnetwork.blogspot.com/2011/01/abcam-elisa-assay-methods-for-use-with.html>

OPPGÅVE 6 – PÅVISING AV STIVELSE OG GLUKOSE I MJØLPRØVER

I del 1 skal de jobbe fire og fire (to labpar) saman

De skal bruke 4 sentrifugerør med ulike mjølprøver (ferdig oppvega av kurspersonale) i tillegg til eit rør til blankprøva (sjå Tabell 1). Merk røra med 1-4/JKJ-prøve og nummer på gruppa (eller liknande) så de finn igjen røra etter sentrifugering.

Tabell 1. Startinnhald i rør for påvising av stivelse og glukose i mjølprøver. Legg merke til at den siste mjølprøva berre skal brukast i den første delen av forsøket (JKJ-prøve).

Prøve nr.	Innhald
1	25 mg fint kveitemjøl
2	25 mg sammalt speltmjøl
3	25 mg maizenna (maisstivelse)
4	Ingenting (blankprøve)
JKJ-prøve	25 mg valfritt mjøl

FRAMGANGSMÅTE DEL 1

Denne delen skal gjerast i doble labpar (altså fire og fire)

Hent ferdig oppvega mjølprøver og tilsett ingrediensar som vist i tabell 2.

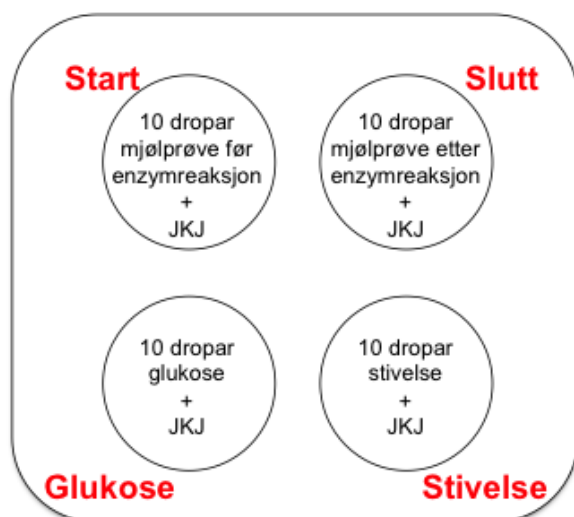
Tabell 2. Ingrediensar som skal tilsettast og behandling av prøver for del 1 av forsøket.

Instruksar i parentes skal berre gjerast for JKJ-prøva. Det er viktig at alt blir gjort i rekkefølga som er presentert i tabellen.

Reagensar	Volum tilsett i dei ulike røra				
	Rør 1 (kveitemjøl)	Rør 2 (speltmjøl)	Rør 3 (maizenna)	Rør 4 (blankprøve)	JKJ-prøve
80 % etanol	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
MOPS-buffer med α -amylase (enzym 1)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
(Ta ut ca 10 dropar av JKJ-prøva og legg i ein brønn på ei porselensplate med minimum 4 brønnar. Merk brønnen "Start". Sjå Figur 4)					
Sett alle rør ved 100 °C i 3 minutt					
Vortex røra					
Sett røra tilbake i 100 °C i nye 3 minutt					
NaAcetatbuffer, pH 4,5	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Amyloglukoseidase (enzym 2)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Sett alle rør ved 50 °C i 30 minutt					
Destillert vatn	Til 7,5 ml totalt	Til 7,5 ml totalt	Til 7,5 ml totalt	Til 7,5 ml totalt	Til 7,5 ml totalt
Sentrifuger i 5 minutt ved 3000 rpm					
Bruk supernatanten (den klare væska) vidare i del 2 av oppgåva.					
(Ta ca 10 dropar av JKJ-prøva og legg på porselensplata. Merk brønnen "Slutt". Sjå Figur 4)					

JKJ-test av mjøl før og etter enzymreaksjonar (gjerast fire og fire)

1. På porselensplata er det no to prøver: "Start" og "Slutt". I tillegg skal det dryppast ca 10 droper glukose i den tredje brønnen, og ca 10 dropar stivelse i den fjerde.
2. Dette punktet skal gjerast i avtrekk, hugs hanskar! Tilsett 2-3 dropar JKJ løysing i alle dei fire brønnane. Registrer eventuelle fargeforandringar.



Figur 4. Innhold i brønner og forslag til merking på porselensplata for JKJ-test.

FRAMGANGSMÅTE DEL 2

Denne delen skal gjerast i labpar (altså to og to).

1. Merk 7 eppendorfrør frå 1-7 og nummeret på labparet (eller enne som gjer dei lett gjenkjennelege). Lat rør 1-4 tilsvare prøvene i tabell 1, medan rør 5-7 er glukosestandardar
2. Lag ei 1:4-fortynning (dvs 1 del prøve + 3 delar destillert vatn) av mjølprøvene og blankprøva.
3. Fyll i røra som vist i Tabell 3.

Tabell 3. Ingrediensar som skal tilsettast, blankprøve, glukosestandard og mjølprøver for spektrofotometri.

Rør	Innhald	Supernatant frå fortynna prøve med tilsvarande nummer	Destillert vatn	Glukosestandard (1 mg/ml = 1 µg/µl)	GOPOD-reagens
1	Kveitemjøl	25 µl	25 µl	-	1,5 ml
2	Speltmjøl	25 µl	25 µl	-	1,5 ml
3	Maizenna	25 µl	25 µl	-	1,5 ml
4	Blankprøve	25 µl	25 µl	-	1,5 ml
5	Glukosestd. 10 µg	-	40 µl	10 µl	1,5 ml
6	Glukosestd. 25 µg	-	25 µl	25 µl	1,5 ml
7	Glukosestd. 50 µg	-	-	50 µl	1,5 ml

Inkuber i vassbad ved 50 °C i 20 minutt.

Pipetter 3 parallellar på nøyaktig 200 µl frå kvar av dei 7 prøvene over i prøvebrønner på ei 96-brønnersplate som vist i Tabell 4. 4 labpar deler på ei plate. Labpar 1 bruker kolonne 1-3, labpar 2 kolonne 4-6, labpar 3 kolonne 7-9 og labpar 4 kolonne 10-12- merk platene godt med labparti og labpar-nummer. Fyll inn labparnummer og prøvenummer i skjema ved 96-brønnersbrett.

Tabell 4. Oppsett for pipettering. Kvar gruppe sett 3 parallellar attmed kvarandre, totalt 4 labpar per plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
E	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Absorbansen blir av lest av på platelesar. Dette blir utført av kurspersonalet.

KORLEIS LAGE STANDARDKURVE I EXCEL OG BEREKNE GLUKOSEKONSENTRASJONEN I MJØLPRØVENE UT IFRÅ DENNE:

(Sidan maskinene på datasalane på Gløshaugen tilbyr Excel på engelsk er det prosedyren for dette programmet som er skildra. Andre program som Office Calc kan brukast, men det kan hende framgangsmåten er noko annleis)

Før du startar å lage ein figur (standardkurve) må absorbansen på blankprøva (prøve 4) trekkast frå alle dei andre verdiane. Dette blir gjort for å trekke frå "bakgrunnsstøyen". Her skal de bruke gjennomsnittet av dei tre målte verdiane for kvar av dei aktuelle prøvene. Formelen for gjennomsnitt er =AVERAGE(marker dei aktuelle verdiane).

Konsentrasjonen for glukosestandardane i dette tilfellet reknast som 10 µg/50 µl, 25 µg/50 µl og 50 µg/50 µl. Her ser ein med andre ord bort ifrå at det i tillegg er tilsett 1,5 ml GOPOD-reagens (Tabell 3).

For å lage ei standardkurve må ein bruke dei kjente glukosekonsentrasjonane, altså prøve 5, 6 og 7. Konsentrasjonen skal plottast på x-aksen, medan absorbansen skal plottast på y-aksen. Ein må bruke det som kallast XY (Scatter) i Excel, og velje typen figur utan linjer mellom punkta. For å få til ein slik figur må ein gå på "insert", og deretter trykke på "scatter" under "charts"-knappen.

For å lage ei trendlinje (standardkurve) høgreklikkar ein på ein av punkta i figuren og vel "add trendline". På den grå boksen som dukkar opp må ein deretter hake av for "Display equation on chart" og "Display R-squared value on chart". Grunnen til dette er at ein får fram den matematiske formelen for trendlinja, og R²-verdien fortel om kor god trendlinja er. Viss alle punkta ligg nøyaktig på linje vil R²-verdien vere lik ±1. Viss punkta ligg veldig spreidd vil R²-verdien vere nærmare 0.

Likninga ein får har den generelle formelen $y = ax + b$, kor a er stigningstalet til linja og b er skjæringspunktet med y-aksen. For å finne glukosekonsentrasjonen i dei ukjente prøvene må ein sette inn gjennomsnittet av den målte absorbansen for y. Deretter kan likninga løysast med omsyn til x. Ein vil då få konsentrasjonen glukose (stivelse) i 50 µl prøveløysing. Det er viktig å hugse på at denne er fortynna. Løysinga som er målt er fortynna 1:4, og denne var laga av 25 mg mjøl løyst i 7,5 ml (7500 µl) væske. Ein må derfor ta omsyn til dette for å finne mg glukose

per 25 mg mjøl. På bakgrunn av dette kan ein finne kor mange prosent stivelse det er i mjølet ein har testa.

I resultatdelen skal det vere ein figur som viser standardkurve for dei kjente glukosekonsentrasjonane og ein tabell som viser dei trinna ein må rekne seg gjennom for å finne prosentdel stivelse i dei tre mjølprøvene. Tabellen skal ikkje vise formlar, men utrekna verdiane. Desse verdiane er:

- OD-verdien for mjølprøvene
- Berekna glukosekonsentrasjon i 50 μ l løysing som vart målt i spektrofotometer
- Glukosekonsentrasjon i μ g/ μ l for løysing målt i spektrofotometer
- Glukosekonsentrasjon i opphavleg løysing (ufortynna, 7,5 ml/7500 μ l)
- mg stivelse i 25 mg mjøl
- % stivelse i mjølet

ALTERNATIVE OPPGÅVER – KARBOHYDRAT

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Forklar kort oppbygginga til dei to typane stivelse.
2. Korfor fargar JKJ-løysing stivelse, men ikkje glukose?
3. Kva er prinsippet bak spektrofotometri?
4. Forklar korleis ein ved hjelp av enzymreaksjonar og GOPOD-metoden kan avgjere kor mykje stivelse det er i ei mjølprøve.

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgåve 5	
4 mjølprøver i 13 ml sentrifugerør med trykkork	7 eppendorfrør
Sentrifugerør til blankprøve	Destillert vatn
Etanol (80 %)	Reagensrørstativ
*MOPS-buffer med α -amylase	Flytebrygger
NaAcetatbuffer, 200 mM, pH 4,5	Vassbad, 100 °C
*Amyloglukoseidase	Vassbad, 50 °C
*Stivelsesløysing (1 %)	Vortex-mikser
JKJ-løysing	Sentrifuge
Porselensplate med brønnar	96-brønnarsplate
*Glukosestandard, 1 mg/ml	Platelesar
*GOPOD-reagens	

*Inngår i kit: Megazyme Total Starch Assay Kit (AA/AMG), www.megazyme.com

Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Plastrør med restar av prøveløysing	Innhald i avløp, røra i vanleg avfall	
Pasteurpipetter i plast	Vanleg avfall	
JKJ-avfall	Eiget beger i avtrekk (kast i risikoavfall etter lab)	Skadeleg ved søl på auge/hud, inhalasjon og svelging. Giftig og etsande. Bruk hanskar og vernebriller!
Porselenplate	Vask i avtrekk	
Stivelse, 1 %	Små mengder: i vask	Hald borte frå auge. Skyl med reint vatn ved søl. Kan irritere auge og lungar

OPPGÅVE 7 – NUKLEINSYRER

ISOLERING AV DNA

DNA er uløseleg i etanol, men løseleg i saltløysingar. Denne eigenskapen blir utnytta ved reinsing ved at DNA blir løyst i saltløysing og felt ved hjelp av etanol. Natrium-dodecylsulfat (SDS) er ein mild detergent som har evne til å dissosiere nukleinsyre-proteinkompleks. Det meste av proteinfraksjonen kan vidare denaturerast og fellast med kaliumacetat. Når ein har isolert og tørka DNA kan ein bryte det ned i enkelte basar (A, T, C og G) ved å koke DNA i sterk syre, for eksempel 70 % saltsyre (HCl).

KROMATOGRAFI

I cellebiologien står ein ofte ovafor problemet å skulle skilje/separere stoff med kjemisk svært like eigenskapar. Kromatografiske metodar er ofte løysinga, og finst i mange variantar. I tynnsjikt-kromatografi (TLC – thin layer chromatography) bruker ein ei glasplate (plast og aluminium er òg brukt) med eit tynt sjikt av silica-gel eller cellulose. Denne plata blir kalla den stasjonære fasen.

Løysinga ein ønskjer å separere blir sett på linje ganske langt ned på tynnsjikt-plata. Ein bruker kapillærrør for sette prøva som små flekker (maks 5 mm i diameter) på plata. Dette blir kalla å applisere.

Når flekkane er tørre sett ein plata ned i kromatograferingsvæska. Dette blir kalla den mobile fasen. Dei appliserte prøvene må stå høgare enn kromatograferingsvæska, elles vil ikkje kromatograferinga bli rett. Kromatograferingsvæska vil etterkvart diffundere oppover tynnsjikt-plata. Ho vil "dra" med seg stoffane i den appliserte prøva. Etterkvart vil dei ulike stoffa skilje lag fordi nokon har høgare affinitet til den mobile fasen, medan andre har høgare affinitet til den stasjonære fasen. Dei som har høgast affinitet til den mobile fasen vil vandre raskast.

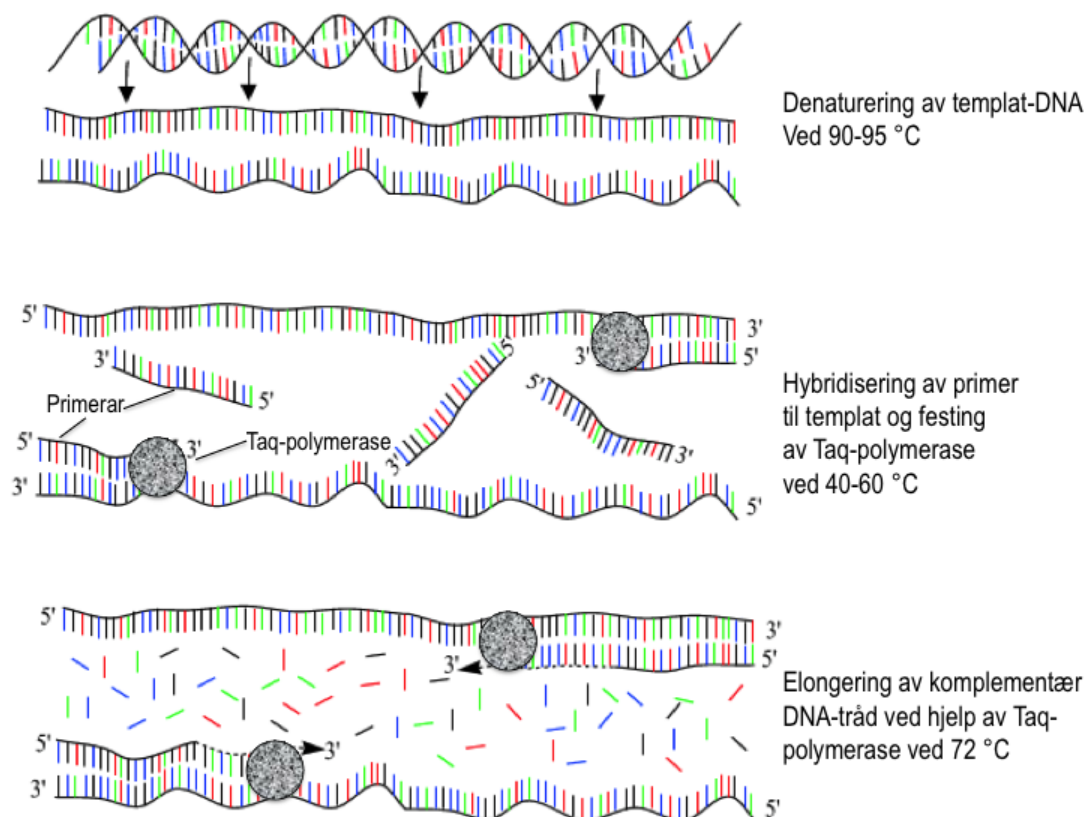
Når kromatograferinga skal avsluttast er det viktig å merke væskefronten umiddelbart, då fordampinga av kromatograferingsvæska går relativt raskt.

For å samanlikne dei ulike stoffa som prøva inneheld må dei ofte synleggjerast først. Ein metode er å bruke UV-lys som gjev fluoriserande flekkar. Ved denne metoden må flekkane merkast av med ein blyant eller liknande medan dei blir belyst. Etter at flekkane er teikna kan ein samanlikne retensjonen deira ved å rekne ut retensjonsfaktoren (ofta kalla R_f -verdi, sjå Likning 1). Ein reknar alltid frå sentrum av punkta. R_f -verdier er relative, og fortel først og fremst om forskjellar og likskapar mellom stoff i prøver frå same kromatogram. Flekkar med same R_f -verdi kan (men må ikkje!) indikere det same stoffet i to ulike prøver.

$$R_f = \frac{\text{Stoffet si vandringsavstand frå startlinja}}{\text{Væskefronten sin vandringsavstand frå startlinja}} \quad (\text{Likning 1})$$

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

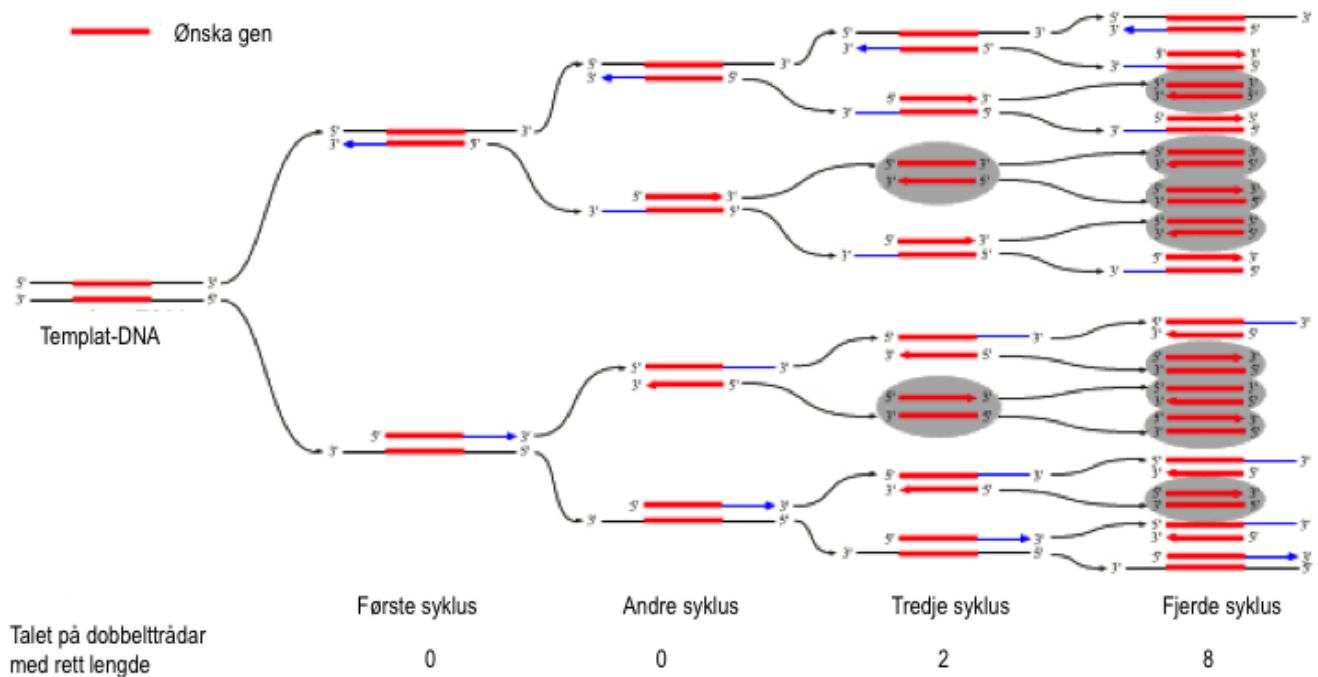
PCR er ein analysemetode som blir brukt for å kopiere opp kortare DNA-sekvensar. Etter metodeutviklinga på midten av 1980-talet blir han no brukt innan ei lang rekke felt, for eksempel bioteknologi, rettsmedisin, mikrobiologi, matproduksjon, osv.



Figur 1. Éin syklus av PCR-reaksjonen.

PCR (Figur 1) er ein *in vitro* (latin: i glas) enzymatisk reaksjon som gjev ein eksponentiell produksjon av spesifikke DNA-fragment. Reaksjonen krev eit DNA-templat: genomisk DNA (gDNA) eller komplementært DNA (cDNA). I tillegg trengst eit primerpar (oligonukleotid) som passar endane på DNA-fragmentet vi ønskje å amplifisere. I PCR-reaksjonen blir det brukt ein varmistabil DNA-polymerase isolert frå ein bakterien *Thermus aquaticus*: Taq-polymerase. Denne bakterien toler svært høge temperaturar og har derfor enzym som toler ei viss tid ved 94 °C, som er den høgaste temperaturen vi bruker i PCR-reaksjonen. Utanom dette må det vere frie nukleotid (dNTP) tilstades for at Taq-polymerasen skal ha noko å "bygge" dei nye DNA-trådane av. Alle desse komponentane blir blanda i same rør, og PCR-reaksjonen består av tre trinn som blir avgjort av temperaturforholda i ei PCR-maskin.

Under denaturering ved 90-95 °C blir DNA-kjedene i templatet separert. Etter denaturering blir reaksjonskomponenta til ein temperatur mellom 40-60 °C. Temperaturen som blir brukt er tilpassa det spesifikke primerparet som blir nytta, og ved denne temperaturen vil primerane feste seg dei spesifikke stadane på DNA-tråden (hybridisering). Til slutt blir temperaturen heva til 72 °C for elongering (forlenging) av DNA-fragmentet. Taq-polymerase har temperaturoptimum og høgast enzymaktivitet på 70-75 °C, og elongering skjer derfor ved denne temperaturen. Desse tre trinna tilsvarer ein syklus i PCR-reaksjonen, og det er vanleg å køyre 30-40 syklusar totalt. Figur 2 viser korleis det ønska produktet blir amplifisert gjennom dei 4 første syklane av PCR-reaksjonen.

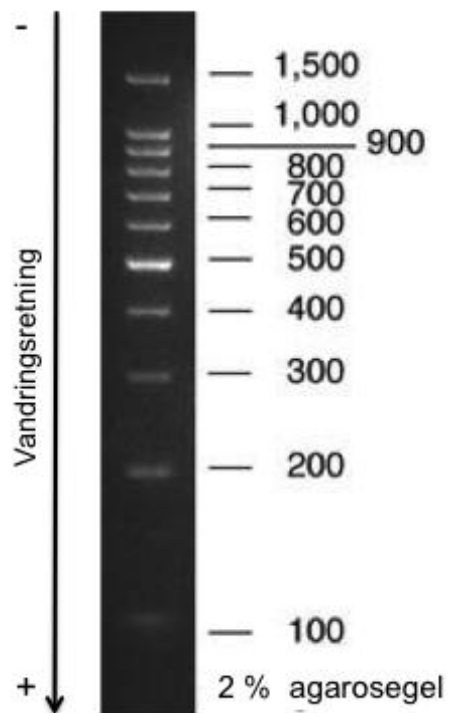


Figur 2. Amplifisering av målsekvens hos DNA gjennom dei fire første syklane av PCR-reaksjonen.

Templatet (det prøvematerialet vi ønsker å kopiere opp spesifikke sekvensar frå) i PCR-reaksjonen kan vere både genomisk DNA (gDNA) eller komplementært DNA (cDNA). cDNA er ein enkelt DNA-tråd som er komplementær til eit RNA, og inneheld derfor ikkje intron (ikkje-kodande sekvensar). Framstilling av cDNA er ein *in vitro*-reaksjon som blir kalla revers transkripsjon og blir utført av enzymet revers transkriptase.

AGAROSE GELELEKTROFORESE

Agarose gelelektroforese (Figur 3) er ein enkel måte å separere DNA-fragment etter storleik. Vanlegvis må ein køyre PCR først for å ha nok DNA til at det skal synest på gelen. Teknikken baserer seg på at DNA er negativt lada ved nøytral pH, og når eit elektrisk felt blir sett på vil DNA bevege seg mot den positive polen. Hastigheita gjennom gelen blir avgjort av agarosekonsentrasjonen. Gelen dannar eit slags gitter, og jo høgare konsentrasjon av agarose, jo tettare vil gitteret vere. Store DNA-fragment vil derfor vandre sakte gjennom gelen, medan små vil vandre raskt. DNA i gelen kan sjåast i ein UV-transilluminator etter farging med ein fluoriserande farge, for eksempel SYBR green (SYBRsafe).



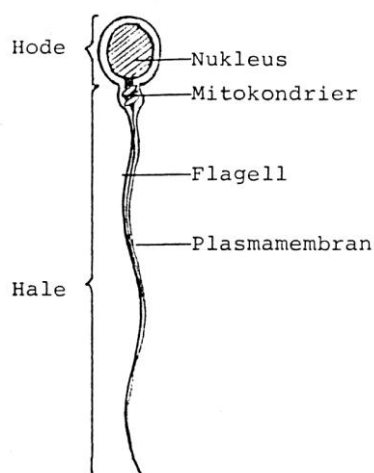
Figur 3. Agarose gelelektroforese av 100 basepar (bp) ladder. DNA-fragment med ulik storleik vil vandre med ulik hastigheit frå punktet prøva vart sett (ved den negative polen) mot den positive polen. Dei lengste DNA-fragmenta er øvst, medan dei kortaste har vandra fortast og kan sjåast nedst. Talet på basepar (bp) på fragmenta er indikert. Legg merke til at det er ulik avtand mellom fragment på for eksempel 100 og 200 bp samanlikna med 200 og 300 bp, til trass for at "differansen" i talet på bp er den same.

OPPGÅVE 7A – ISOLERING AV DNA FRÅ LAKSEMJØLKE OG PÅVISING AV BASAR

LABDAG 1: ISOLERING AV DNA FRÅ LAKSEMJØLKE

Forsøksmateriale:

Mjølke frå laks, aure og sild er eit godt egna utgangsmateriale for isolering av DNA, då det har eit høgt innhald av DNA i forhold til protein. Ei skjematisk teikning av ei spermiacelle frå fisk er vist i Figur 5.



Figur 5. Skisse over spermiacelle frå fisk. Hovudet består i hovudsak av ei uvanleg høgt kondensert haploid kjerne omgjeve av cytoplasma og plasmamembran. Cytoplasma inneheld svært lite av dei organellane vi vanlegvis finn i eukaryote celler, som ribosom, ER, Golgi-apparat osv. (desse er ikkje naudsynte for å overlevere DNA til egget). Rett bak hovudet, rundt flagellen, ligg ei rekke mitokondriar. Desse sørger for den naudsynte energiproduksjonen slik at flagellen kan drive cella framover.

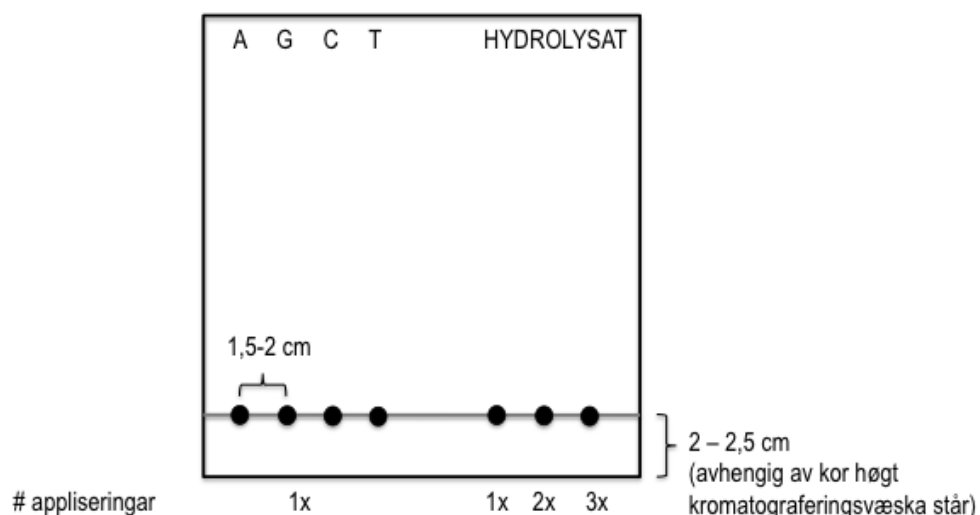
1. Mål opp 30 ml natriumklorid (NaCl, 1 M)
2. Veg opp ca. 0,5 g frose laksemjølke i eit begerglas og dekk det med litt av dei 30 ml NaCl-løysing.
3. Visp med glasstav i ca. 5 minutt.
4. Hell på resterande NaCl-løysing og hurtigmiks blandinga i 10 sekund (bruk blender).
5. Hell blandinga i eit 50 ml sentrifugerør og tilsett straks 1,5 ml EDTA (0,05 M) og 3 ml SDS (10 %).
6. Sett på kork og vend røret forsiktig fram og tilbake så alt blir blanda godt. Det er ein fordel om ein ikkje får for mykje skum i røret på grunn av dårleg plass.
7. Tilsett 10 ml kaliumacetat (5 M) til blandinga. Vend forsiktig fram og tilbake så innhaldet blir godt blanda.
8. Sentrifuger ned utfellingar på 4000 rpm i 10 minutt. Hugs at sentrifugen må balanserast!
9. Hell supernatanten (blank) over i eit nytt 50 ml sentrifugerør og sett på is i 5 minutt. Prøv å få med rundt 20 ml.
10. Overlegg innhaldet i sentrifugerøret forsiktig med eit lag iskald 60 % etanol (ca. 10 ml etanol for 20 ml supernatant). Hald sentrifugerøret på skrå så etanolen ikkje blir helt direkte ned på supernatanten. Viss etanol blir blanda med vasslaget for fort vil ein få ei rask utfelling og DNA-materialet kan ikkje vindast opp. For lite etanol-dehydratisering gjev eit slimete materiale som er vanskeleg å vinde opp.
11. Gjer ein roleg sirkelbevegelse med glasstav slik at etanollaget blandast gradvis inn i vasslaget. Dette gjer det muleg å tvinne opp DNA på glasstaven, først som gel,

- deretter som blakka materiale ved vidare dehydrering. Viss glasstaven blir tvinna motsett veg av sirkelbevegelsen blir det enda lettare å få tvinna opp DNA.
- Når dei to laga er blanda skal det hellast på ytterlegare etanol (ca. 10 ml eller meir) for å få med resten av DNA-materialet. Prøv å press ut væska av DNA-slira som blir vinda opp på staven.
 - Overfør DNA-slira til eit merka vegeskip og tørk ved 50 °C i omtrent eit døger (kurspersonale tek vare på DNA-et til neste labdag)

LABDAG 2: SYREHYDROLYSE OG BASEPÅVISING

- Overfør så mye tørka DNA som mogeleg over til eit reagensrør.
- Dette skal gjerast i avtrekksskap og med nitrilhanskar (blå hanskar)! Tilsett 0,1 ml HCl (70 %), dekk reagensrøret med ei klinkekule.
- Kok DNA med HCl i 45 minutt. Dette skal vere svart/brunt når det er ferdig.
- Fortynn syrehydrolysatet med 0,1 ml destillert vatn og bland godt med glasstav.
- Lat stå nokre minutt slik at botnfallet sedimenterer. Det kan vere praktisk å helle hydrolysatet over på ei porselensplate for å kome til med kapillærrør.
- Teikne ei horisontal linje med blyant ca 2,5 cm opp (sjekk kor høgt kromatograferingsvæska står i kromatograferingskaret) på tynnsjiktplate for å markere kor du skal sette prøvene. Marker med kryss på linja kor prøvene skal settast. Teikne forsiktig så ikkje plata blir øydelagt.
- Appliser kjente baser på tynnsjiktplate med kapillærrør (Figur 6). Det er nok at kapillærrøret er i kontakt med plata eit lite augeblikk (under 1 sekund) for overføring av prøve.
- Appliser syrehydrolysat med kapillærrør på ei tynnsjiktplate. På ein flekk skal det appliserast 1 gong, på den neste 2 gongar, og på den siste 3 gongar. Det er viktig at appliseringane får tørke før ein appliserer på nytt.

Viss det er lite DNA i syrehydrolysatet er det ein betre sjanse for å påvise basane viss ein appliserer fleire gongar.



Figur 6. Skisse over korleis kjente basar og DNA-syrehydrolysat skal appliserast på tynnsjiktplate. Ein må vurdere kor høgt kromatograferingsvæska i karet står før en avgjer kor blyantstreken (grå) for applisering av prøver skal stå.

- Kromatografer plata i metanol/konsentrert HCl/vatn (4/1/1) i 1 time (gjærne lenger om de får tid). Hugs at det skal vere lokk på karet under kromatograferinga.

10. Bruk nitrilhanskar (blå hanskar) på dette trinnet! Merk væskefronten umiddelbart etter at plata er teken ut. Tørk i avtrekksskap, gjerne ved hjelp av hårfønar.
11. Lokaliser basene under UV-lys. Bruk ein blyant for å markere medan UV-lyset er slått på. **Obs! Dette er sterkt UV-lys, så den som markerer må dekke handledd godt til!**
12. Teikne av kromatogrammet (plata skal ikkje ut av laben!) og mål avstand for kor langt flekkane har vandra. Rekne ut R_f -verdiar for dei kjente basane og dei separerte stoffa i prøva og presenter dei i tabell i resultatdelen.

OPPGÅVE 7B – PÅVISING AV INTRON I GENOMISK DNA

Forsøksmateriale:

Genomisk DNA og cDNA isolert frå plantemateriale, *Arabidopsis thaliana* (vårskrinneblom)

LABDAG 1: PCR

1. Merk 3 utleverte PCR-rør med **g** (for gDNA), **c** (for cDNA) og **d** (for destillert vatn) i tillegg til labparnummer og sett dei på is
2. Pipetter 3 19 µl Mastermix i kvart av dei merka PCR-røra. Mastermix er blanda av kurspersonale og kvart rør vil innehalde ingrediansane som vist i tabell 1:

Tabell 1. Ingrediensar og konsentrasjon av desse i Mastermix

Ingrediensar	Konsentrasjon i PCR	Volum (µl) per PCR-rør
Dynazymebuffer (10 x)	1x	2
dNTP (2 mM)	0,1 mM	1
Primer 1 (4 mM)	0,2 mM	1
Primer 2 (4 mM)	0,2 mM	1
Destillert vatn	-	13
Taq-polymerase (2 u/µl)	2 u	1
Totalt	-	19

3. Ved så små volum som i dette punktet må ein sette pipettespissen ned i Mastermixin før ein tømmer pipetten. Det er viktig å skifte pipettespiss mellom kvar gong så ingenting blir kontaminert! Tilsett templat til PCR-røra som følgjer:

Rør **g** – 1 µl genomisk DNA (gDNA)

Rør **c** – 1 µl cDNA

Rør **d** – 1 µl destillert vatn

4. Spinn røra nokre sekund på ein bordsentrifuge for å samle væska i botna av røra

Lat røra stå på is til alle gruppene er ferdige med å blande Mastermixin og DNA/vatn

5. Sett på PCR-maskina i fellesskap. Kurspersonalet sørger for at ho blir køyrt etter dette oppsettet:

94 °C 30 sekund	} 40 syklar
50 °C 30 sekund	
72 °C 1 minutt	

LABDAG 2: AGAROSE GELELEKTROFORESE

Ein 1 % agarosegel og køyrebuffer (1xTAE) blir laga på førehand av kurspersonalet. Fleire grupper køyrer på same gel.

1. Tilsett 5 µl loadingbuffer til kvart av røra med PCR-produkt. Skift pipettespiss mellom kvar gong!
2. Appliser innhaldet frå kvart PCR-rør (ca 24 µl) i kvar sin brønn på agarosegelen. Appliser i tillegg 5 µl markør (utlevert av kurspersonale ved gelen) i ein brønn. Kvar gruppe bruker då 4 brønner (3 prøver + 1 markør). Når alle har sett på prøvene sine vil kurspersonalet sette på straumen.
3. Når gelen er ferdig køyrt (gulfargen har vandra over på midten av gelen) blir han fotografert av kurspersonale og lagt ut på It's learning

ALTERNATIVE OPPGÅVER – NUKLEINSYRER

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Forklar korleis ein kan isolere DNA frå laksemjølke og kva rolle dei ulike kjemikaliar/stega du ville brukt har.
2. Hjelp! PCR-maskina er øydelagt og som politietterforskar hastar du med å finne ein kriminell blant fleire mistenkte. Forklar korfor du likevel kan gjennomføre PCR-reaksjonen ved hjelp av vassbad.
3. Forklar prinsippet for og poenget med agarose gelelektroforese.

Tabell 2. Utstyr og materialar

Oppgåve 7A, dag 1	
Laksemjølke	EDTA (0,05 M)
Begerglass	SDS (10 %)
Blender	Kaliumacetat
Glasstav	Iskald etanol, 60 %
2 stk 50 ml sentrifugerør	Vegeskip til tørking av DNA
Sentrifuge	Varmeskap, 50 °C
NaCl (1 M)	
Oppgåve 7A, dag 2	
Reagensrør	Glasstav
Klinkekule	Tynnsjiktplate
HCl (70 %)	Kapillærrør
Vassbad (100 °C)	Metanol/konsentert HCl/H ₂ O (4/1/1)
Kjente basar (A, T, C, G)	Hårføner
Destillert vatn	UV-lys
Oppgåve 7B, dag 1	
3 PCR-rør	Templat (gDNA frå <i>A. thaliana</i>)
Automatpipette	Templat (cDNA frå <i>A. thaliana</i>)
Is	bordsentrifuge
Mastermix	PCR-maskin
Destillert vatn	
Oppgåve 7B, dag 2	
Agarosegel	Automatpipette
Køyrebuffer (1xTAE)	Loadingbuffer
Elektroforeseutstyr	Markør

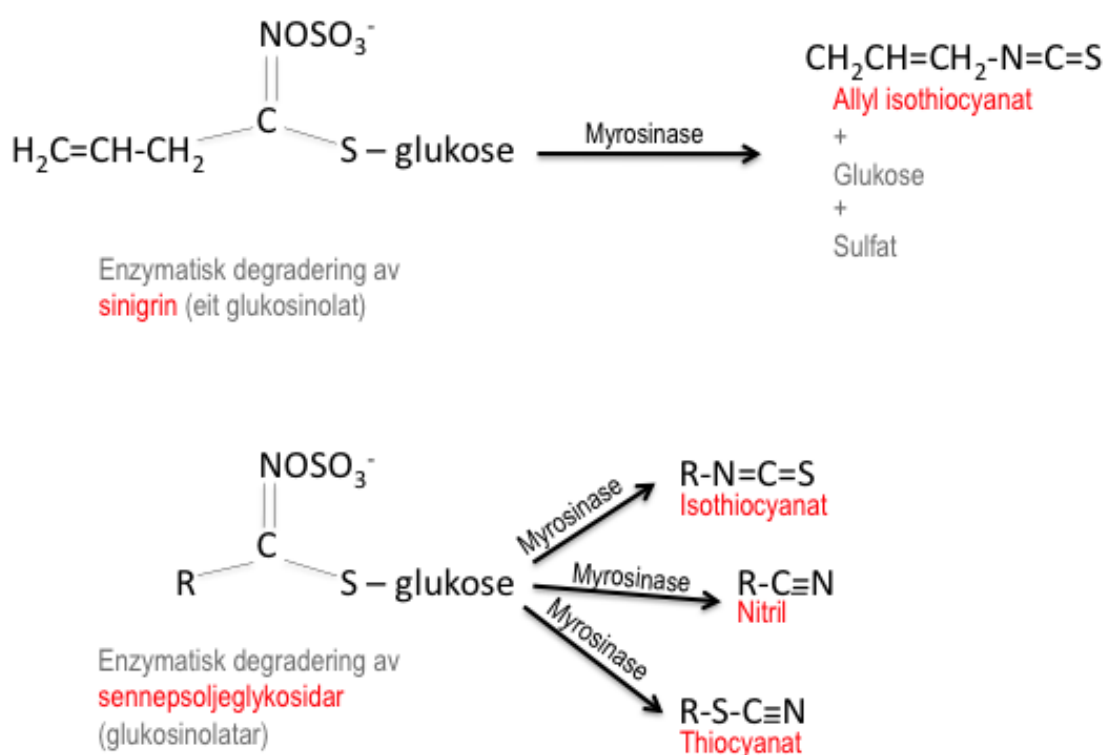
Tabell 3. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Skalpell	Stikkande, skjærande avfall	
Restar av prøve med laksemjølke	Avløp	
NaCl (1M)	Avløp	Kan irritere auge, hud og svelg/lunger
EDTA (0,05 M)	Avløp, skyl etter med vatn	Kan irritere auge/lunger
SDS (10 %)	Avløp, skyl etter med vatn	Skadeleg. Kan irritere auge, hud og svelg/lunger
Etanol (60 %)	Avløp, skyl etter med vatn	GIFTIG! Kan vere livstruande viss svelga. Skadeleg viss inhalert eller absorbert via hud.
HCl (70 %)	Konsentrert: samle i eigen glasbeholder Små mengder: avløp i avtrekk. Skyl etter med store mengder vatn	Giftig og etsande. Kontakt med auge og hud kan forårsake alvorleg permanent skade. Giftig ved inhalering. Jobb i avtrekk, bruk vernebriller og hanskar!
Kromatograferingsvæske (metanol, HCl, vatn)	Samle i flasker i avtrekk.	Giftig og svært brennbar. Driking/inhalering kan føre til kvalme, hjerte- og lungeskade, blindskap og død
Tynnsjiktplater	Vanleg avfall	
Mastermix	Risikoavfall	
Templat	Risikoavfall	
Loadingbuffer	Risikoavfall	
Markør	Risikoavfall	Kan vere irriterande for auge og hud. Mildt irriterande for svelg og mage
Dynazyme DNA polymerase	Risikoavfall	Gje vatn ved inntak. Ved søl på hud/auge, vask med vatn i 15 minutt.
0,5x TBE-buffer	Avløp	
Agarose	Lat stivne. Vanleg avfall	Irriterer auga
SYBR green	Er støyp inn i gelen. Vanleg avfall	

OPPGÅVE 8 – PROTEIN

EFFEKT AV PH OG TEMPERATUR PÅ MYROSINASEAKTIVITET

Enzymet myrosinase (β -thioglukosidase, thioglukosid glukohydrolase) finst i ei rekke artar innanfor korsblomefamilien, for eksempel raps, rybs, hovudkål, brokkoli og reddik. Enzymet er lokalisert i spesielle celler i planten, såkalla myrosin-celler, og det er anteke at ein av funksjonane til enzymet er å beskytte mot patogenangrep. Når planten blir utsett for eit patogenangrep eller blir skada på annan måte, blir enzymet aktivert og omdannar sennepsoljene (glukosinolatane) i planten til glukose, sulfat og ei reaktiv sambinding. Kva for reaktiv sambinding som blir danna er avhengig av kva for glukosinolat som blir spalta, men dei vanlegaste reaksjonsprodukta er isothiocyantar, nitrilar og thiocyantar (Figur 1).



Figur 1. Den enzymatiske degraderinga av sinigrin til allyl isothiocyant (øverst) og tilsvarende for andre glukosinolatar (nederst).

Desse sambindingane er giftige for dyr og menneske, og ein har derfor i årevis prøvd å inhibere aktiviteten til enzymet eller å redusere mengda glukosinolatar. Det har likevel vist seg at viss innhaldet av glukosinolatar blir for lågt vil frøa spire dårlegare enn normale frø, og dessutan gje plantar som er små av vekst.

Ei gruppe ved Institutt for biologi har i mange år arbeida med myrosinase og enzymesystemet. Enzym er reinsa og karakterisert, mono- og polyklonale antistoff er framstilt, og gen som kodar for myrosinasar er isolert og karakterisert.

DIALYSE

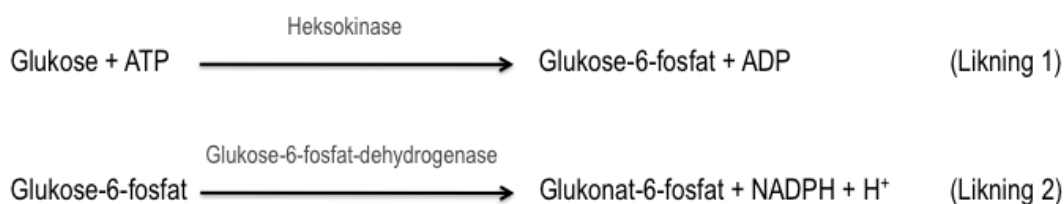
Ein kjent form for dialyse er når ein bruker prinsippet for å fjerne avfallsstoff frå blodet hos pasientar som for eksempel har hatt nyresvikt. På laboratoriet er dialyse òg ein mykje brukt reinsem metode. Ein dialyseslange er ein kunstig semipermeabel membran som hindrar diffusjon av store molekyl, for eksempel protein, medan den slepp gjennom mindre molekyl (salt, aminosyrer og sukker med låg molekylvekt <12 000 D). Dialyse blir ofte brukt for å fjerne lågmolekylære sambindingar frå komplekse løysingar, for eksempel rækstrakt frå knuste celler, og inngår nokre gongar som eit av dei første reinsetrinna.

COMBUR-TEST

Denne testen blir vanlegvis brukt til å sjekke urinprøver, og har eit felt for glukose, eit for protein og eit for erytrocyttar (raude blodceller). Basert på kor sterk farge ein får på dei ulike felta kan ein seie noko om konsentrasjonen av glukose/protein/blod i det ein målar. I denne oppgåva bruker vi frø, og testfeltet for blod er derfor ikkje relevant.

ENZYMTEST

Sinigrin er eit glukosinolat som kan brukast som substrat for myrosinase. Spaltinga av sinigrin resulterer blant anna i frigjering av sulfat og glukose. Mengda frigjort glukose kan målast ved "GluQuant"-metoden, og kan derfor brukast til å måle enzymaktiviteten til myrosinasen. Glukose vil gjennom to enzymreaksjonar danne NADPH (Likning 1 og 2), som igjen kan målast spektrofotometrisk.



INNLEIING OPPGÅVE 8 – EKSTRAHERING AV PROTEIN FRÅ FRØ

Forsøksmateriale:

I denne øvinga blir det brukt frø frå kvitsennep (*Sinapsis alba*). Desse frøa inneheld relativt store mengder av myrosinaseprotein, og enzymaktiviteten kan påvisast ved ein enkel enzymtest. Frøa inneheld òg ei rekke andre protein, kor lagringsprotein utgjør den største delen. Total mengde protein som går an å ekstrahere skal målast ved hjelp av Bio-Rad sin proteinreagens. (oppgåve 8A). Før ein kan måle aktiviteten til myrosinasen må glukose og andre lågmolekylære sambindingar fjernast. Dette skjer ved dialyse av rækstraktet (oppgåve 8b). Myrosinaseaktiviteten blir bestemt ved å måle mengda glukose (eit av spaltingsprodukta, sjå Figur 1) som blir frigjort under den enzymkatalyserte reaksjonen (oppgåve 8C)

1. Veg opp 0,5 g frø av kvitsennep og legg dei i ein morter. Tilsett 0,5 gram reinsa sjøsand.
2. Knus frøa til ei homogen masse med pistill.

3. Overfør dei knuste frøa til eit sentrifugerør med spatel og skyl ut restane med 10 ml imidazol-HCl-buffer (pH 6,2).
4. Sentrifuger løysinga ved maksimal hastigheit (4-5 000 rpm) i 15 minutt.
5. Overfør supernatanten til eit reint sentrifugerør og kast botnfallet. Supernatanten som inneheld protein og andre lågmolekylære sambindingar skal brukast i oppgåve 8A, 8B og 8C.

OPPGÅVE 8A – PÅVISNING AV PROTEIN I MJØL FRÅ KVITSENNEP

1. Overfør 0,1 ml rækstrakt til eit reagensrør og tilsett ca. 2 ml imidazol-HCl-buffer (10 mM, pH 6,2).
2. Tilsett 0,5 ml av Bio-Rad sin proteinreagens. Ein blå fargereaksjon er indikasjon på at det er protein i løysinga.

OPPGÅVE 8B – DIFFUSJON GJENNOM MEMBRANAR

1. Start med å leggje ein dialyseslange i bløyt i vatn, dei er lettare å jobbe med då.
2. Test korleis Combur-testen verkar på rækstraktet før du går vidare.
3. Knyt ein knute ca. 1-2 cm frå enden på eit stykke dialyseslange.
4. Fyll slangen med 2 ml rækstrakt, 2 ml stivelsesløysing (1 %) og tilsett 20 dropar glukose (1 M).
5. Knyt igjen slangen og skyl i springvatn for å fjerne eventuelle restar av glukose, stivelse og rækstrakt på utsida.
6. Fyll eit begerglas (250 ml) med 50-100 ml destillert vatn. Tilsett omtrent 1 ml JKJ-løysing per 50 ml vatn (altså 1-2 ml).
7. Bruk Ecur-testen til å undersøke JKJ-løysinga for glukose og protein. Legg òg merke til fargen på løysinga.
8. Legg dialyseslangen i begerglaset.
9. Etter 30 minutt skal væska i begerglaset testast på nytt. Legg dessutan merke til eventuelle fargeforandringar.

OPPGÅVE 8C – TEST AV MYROSINASEAKTIVITET

DIALYSE AV RÅEKSTRAKT

1. Fyll resten av råekstraktet over i ein dialyseslange som knytast godt i begge endar. Ha ein lang tråd i den eine enden sånn at han kan teipast fast i begerglaset dialysen går føre seg i.
2. Legg dialyseslangen i eit begerglas med imidazol-HCl-buffer (10 mM, pH 6,2), og la han liggje i 1-2 dagar. Buffer bør skiftast minst éin gong (gjerast av kurspersonale).
3. Ta dialyseslangen ut og fyll ekstraktet over i eit sentrifugerøyr. Sentrifuger ved maksimal hastigheit (4-5 000 rpm) i 10 minutt. Dette blir gjort for å bli kvitt eventuelle utfellinga som har oppstått under dialysen.
4. Overfør supernatanten til eit nytt rør. Botnfallet kan kastast. Ta ut 1 ml av ekstraktet og fortynn med 24 ml vatn

A. ENZYMAKTIVITET VED VARIERANDE pH

1. Bruk 6 eppendorfrør og tilsett ingrediensar i følgje Tabell 1. **VIKTIG: vent heilt til slutt med å tilsette råekstrakt (enzymlysing). Reaksjonen vil starte med éin gong, så punkt 2 må settast i gang umiddelbart etter at enzym er tilsett.**

Tabell 1. Forsøksoppsett for måling av enzymaktivitet hos myrosinase ved varierende pH.

Reagens	Rør 1	Rør 2	Rør 3	Rør 4	Rør 5	Rør 6
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 2,0)	30 µl	-	-	-	-	-
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 4,0)	-	30 µl	-	-	-	-
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 5,5)	-	-	30 µl	-	-	30 µl
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 8,0)	-	-	-	30 µl	-	-
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 10,0)	-	-	-	-	30 µl	-
Sinigrin (15 mg/ml)	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Råekstrakt (enzymlysing)	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	-
Destillert vatn	-	-	-	-	-	15 µl

2. Inkuber røra ved 37 °C i 15 minutt. Bruk flytebrygger for å halde eppendorfrør loddrett i vassflata.
3. Kok røra i 5 minutt og avkjøl til romtemperatur.
4. Tilsett 150 µl GluQuant-reagens
5. Inkuber 10 minutt ved romtemperatur.
6. Ta 100 µl av kvar prøve over på eit Brett med 96 brønnar og mål absorbans ved 340 nm.
7. Bruk data frå heile partiet for å lage ein figur som viser effekt av pH på myrosinaseaktivitet.

B. ENZYMAKTIVITET VED VARIERANDE TEMPERATUR

1. Bruk 7 eppendorfrør og tilsett ingrediensar i følgje tabell 2. **VIKTIG: akkurat som for førre forsøk startar enzymreaksjonen så fort rækstrakt er tilsett. Gå derfor til punkt 2 umiddelbart etter dette.**

Tabell 2. Forsøksoppsett for måling av enzymaktivitet hos myrosinase ved varierende temperatur.

Reagens	Rør 1 0 °C	Rør 2 20 °C	Rør 3 37 °C	Rør 4 50 °C-	Rør 5 75 °C	Rør 6 100 °C	Rør 7 37 °C
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 5,5)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Sinigrin (15 mg/ml)	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Rækstrakt	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	-
Destillert vatn	-	-	-	-	-	-	15 µl

2. Inkuber testrøra på temperaturane som vist i tabellen i 15 minutt. Røret på 0 °C skal stå på is, røret på 20 °C i romtemperatur og resten på vassbad (50 °C, 37 °C, 75 °C og 100 °C).
3. Gjenta punkt 3-6 i oppgåva over.
4. Bruk data frå heile partiet for å lage ein figur som viser effekt av temperatur på myrosinaseaktivitet.

ALTERNATIVE OPPGÅVER – PROTEIN

Desse oppgåvene er for dei som ikkje kunne møte på laben. Dei skal leverast til same frist som den ordinære rapporten. Svar utfyllande og bruk kjelder. MINST EI SIDE.

1. Skildre kva som er poenget med og prinsippet bak dialyse.
2. Kva er forskjellar og likskapar mellom ein dialyseslange og ein cellediaphragma?
3. Korfor kan glukose vere eit mål på myrosinaseaktivitet?
4. Bruk data for enzymaktivitet ved varierende pH og temperatur frå partiet ditt (blir lagt ut på It's learning etter gjennomført labforsøk). Lag to figurar og vurder kva pH og temperatur har å seie for myrosinaseaktiviteten

Tabell 3. Utstyr og materialar

Oppgåve 8A	
Råekstrakt av <i>Sinapsis alba</i>	1 reagensrør
Imidazol-HCl-buffer (10 mM, pH 6,2)	Bio-Rad proteinreagens
Oppgåve 8B	
Råekstrakt av <i>Sinapsis alba</i>	Vatn
Dialyseslange	JKJ-løysing
Tråd til knyting	Glukoseløysing (1 M)
Begerglas	Stivelsesløysing (1 %)
3 Combur-teststrimler	
Oppgåve 8C	
Råekstrakt av <i>Sinapsis alba</i>	Sinigrin (15 mg/ml)
Dialyseslange	Destillert vatn
Tråd til knyting	Flytebrygger
Imidazol-HCl-buffer (10 mM, pH 6,2)	Vassbad (37 °C, 50 °C, 75 °C og 100 °C).
Sentrifugerør	Is
Vatn	GluQuant-reagens
Citrat-fosfatbuffer (0,1 M, pH 2,0, 4,0, 5,5, 7,0 og 8,0)	Brett med 96 brønner
	Spektrofotometer (340 nm)

Tabell 4. Helse – miljø – sikkerheit

Utstyr	Avfallshandtering	Merknader, faremoment, etc.
Frø av <i>Sinapsis alba</i>	Knuste restar kastast saman med sentrifugerørret i vanleg søppel	
Reinsa sjøsand	Kastast med sentrifugerørret i vanleg søppel	
Imidazol-HCl-buffer (pH 6,2)	Avløp	
Bio-Rad proteinreagens	Samle i begerglas i avtrekk. Overfør til 50 ml sentrifugerør og kast i risikoavfall NB! Brukt glasutstyr skyljast i avtrekk før vanleg vask.	
Combur-test	Vanleg søppel	
Dialyseslange	Med JKJ: begerglas i avtrekk (kast i risikoavfall etter lab) Utan JKJ: vanleg søppel	
Stivelsesløysing (1 %)	Avløp	
Glukoseløysing (1 M)	Avløp	
JKJ-løysing	Konsentrert søl: risikoavfall Fortynna i imidazol-HCl-buffer: avløp	Skadeleg ved søl på auge/hud, inhalasjon og svelging. Giftig og etsande. Bruk hanskar og vernebriller!
Citrat-fosfatbuffer	Avløp	
Sinigrin	Avløp	
GluQuant-reagens	Samle i begerglas i avtrekk. Overfør til 50 ml sentrifugerør og kast i risikoavfall	