

LAB 1: Extraktion av bladpigment

Introduktion

Plastider förekommer i cellerna hos alla växter. De uppträder i tre olika former som kan övergå i varandra, nämligen leukoplaster, kloroplaster och kromoplaster. Pigment finns i kloro- och kromoplasterna som klorofyll och karotenoider respektive enbart karotenoider. Andra pigment kan vara vattenlösliga och lokaliserade till vakuolen (t ex antocyaniner).

I denna laboration kommer ni extrahera fram pigment, som ni sedan kommer använda i de följande laborationerna (1a och 1b).

Material och metoder

- Gröna blad (t ex persilja, spenat eller tomat)
- Aceton 100%, ca 50 ml (kyld)
- Heptan ca 100 ml (kyld)
- NaCl-lösning 10%, ca 200 ml (kyld)
- Na_2CO_3 (s)
- Kvantssand (kiseldioxid)
- Två bägare, 250-500 ml
- E-kolv, 250-500 ml
- 2 mätglas, 50-100 ml
- Balja med is
- Tratt
- Separertratt + ställ
- Tesil
- Mortel och pistill (kyld)
- Sax, spatel
- Våg

Framställning av råklorofyllösning

Viktigt att arbetet sker vid låg temperatur (på isbädd) och svag belysning.

- 10 g blad klipps sönder i en mortel. Tillsätt lite sand, en spatel Na_2CO_3 samt 5-10 ml aceton. Ta sönder bladen noggrant genom att vrida och trycka med mortelpistillen. Bladmassan ska få en grötig konsistens.
- Häll bladmassan i en e-kolv som förvaras på isbädd. Tillsätt ytterligare aceton så att totalt 50 ml aceton är tillsatt.

Framställning av renad klorofyllösning

Viktigt att arbetet sker vid låg temperatur (på isbädd) och svag belysning.

- Filtrera ner råklorofyllösningen i en bägare genom en tesil – pressa ur all vätska! Notera filtratets volym. Tillsätt 20 ml 10% NaCl-lösning.
- **Arbeta nu i dragskåp!** Tillsätt lika stor volym heptan som filtratet med NaCl-lösningen utgör tillsammans (ca 60-70 ml). Överför vätskan till en separertratt. Skaka, och glöm inte att

släppa ut övertrycket ur separationstratten. Sätt separertratten i dess ställ och invänta skiktning. Pigmentet är nu nästan helt överfört till epifasen (övre fasen) som består av pigment och heptan. Hypofasen (undre fasen) består av vatten och aceton. Tappa av hypofasen i en bägare.

- Tvätta pigmentlösningen genom att tillsätta 60-70 ml NaCl-lösning till separertratten med pigment – skaka och invänta skiktning. Tappa av hypofasen, och upprepa tvättsteget ytterligare en gång.

LAB 1A: Separation av gula och gröna plastidpigment genom papperskromatografi

Introduktion

I denna laboration appliceras den renade klorofylllösningen innehållande klorofyll och karotenoider av olika slag på kromatografipapper. Därefter får en elueringsvätska passera applikationsstället. De olika pigmenten kommer då att separeras från varandra framför allt på grund av varierande löslighet i den rörliga fasen.

Material och metoder

- Renad klorofyllösning
- Kapillärrör/Pipett
- Aceton
- Kromatografipapper
- Kromatografikärl
- Fläkt
- Heptan

Två stycken kromatografipapper tillskäres efter figuren bredvid. Var noggrann med de parallella kanterna – undvik dessutom att ta på ytan då fett i fingertopparna stör vätskefrontens vandring.

Applicera provet med de extraherade pigmenten på ett av kromatografipapperen. Provet appliceras med kapillärrör vid krysset i figuren. Pigmentfläcken bör vara kraftig till färgen, och ej för utbredd (många applikationer). Torka med fläkt mellan appliceringarna så att inte fläcken sprider sig för mycket.

På det andra kromatografipapperet appliceras pigment enkelt genom att ett blad läggs över pappret och ett mynt rullas över några gånger.

Fyll på elueringsvätska (1.5 ml aceton + 8.5 ml heptan) i kromatografikärlet, stäng locket. När pigmentlösningen har applicerats, häng pappret på kanten av kromatografikärlet – det är mycket viktigt att pappret *inte* kommer i kontakt med vätskan! Efter 30 minuter har atmosfären i kärlet mättats –



lossa försiktigt pappret från kanten och se till att det sänks ner i vätskan. Se till att papprets kanter ej berör kärlets väggar samt ej är nedsänkt till pigmentfläcken.

Elueringsmedlet kommer nu att sugas upp kapillärt i pappret och en separation sker. Följ denna tills fläckarna är väl åtskilda, då försöket avbryts enligt följande:

- Notera de olika fläckarna samt lösningsmedelsfronten innan ni bryter
- Rita med blyertspenna dit fläckarna samt notera för pigmenten deras färgnyans

Mät med linjal hur långt de olika pigmenten rört sig och räkna ut deras R_f -värden (relativ vandrings, dvs hur långt pigmentet kommit relativt fronten) på följande sätt:

$$R_f = a/b$$

a = avståndet som pigmentet rört sig (från punkten på blyertsstrecket)

b = avståndet som lösningsmedlet rört sig

Redovisning av resultat

- Gör en tabell med R_f -värdet för de olika pigmenten.
- Försök lista ut i vilken ordning dina pigment kommit – utgå från vad du vet om pigmentens uppbyggnad. Presentera i helgrupp.

Färgen på bandet	R_f -värde	Pigment

LAB 1B: Klorofyllets röda fluorescens

Här använder ni er av den renade klorofylllösningen från Lab 1. Håll lite av lösningen i ett smalt provrör. Släck ner helt i rummet, och håll upp provröret i lampan från en OH-apparat.

Vad händer?

Varför? *Ledning: läs om excitation av elektroner (Raven s.126)*

Redovisning av resultatet

I helgrupp vid nästa labbtillfälle: visa försöket i nedsläckt rum. Förklara orsaken till det ni ser (*spara klorofylllösningen i kyl mellan passen!*).

LAB 2: pH-förändringar vid fotosyntes

Introduktion

I detta försök använder ni en vattenväxt, vattenpest (*Elodea canadensis*) för att undersöka hur pH förändras vid fotosyntes

Material och metoder

- Tre skott av vattenpest, ca 5 cm långa (se till att era tre skott är ungefär lika stora)
- Tre flaskor (150 ml) med blå skruvkork
- pH-mätare

Börja med att mäta pH i vanligt kranvatten (pH-mätare finns i Mendel). Var noga med att vänta på ett stabilt värde innan ni noterar pH.

Fyll sedan tre flaskor med kranvatten, och lägg i ett skott vattenpest i varje flaska. Botten av växten ska vara riktat mot korken (se figur nedan). Placera sedan dina flaskor enligt följande:

- En under ljusramp/stark lampa
- En i mörker (labhurts)
- En som står i svagt ljus (tex i skåp med glasdörr)

Nästa labbtillfälle mäter ni pH i vattnet från de tre flaskorna. *Tänk på att köbildning kan ske vid pH-mätaren!*

Redovisning av resultat

Fyll i pH-värdet för de olika behandlingarna i tabellen nedan. Samla även in pH-värdena från alla grupper, och räkna ut ett medelvärde för alla grupper.



Vad hände och varför?

	pH (grupp)	pH (medelvärde)
Start av försöket		
Behandling		
Ljus		
Mörker		
Ljus/mörker		

LAB 3: Syrgasutvecklingens beroende av $[HCO_3^-]$

Introduktion

Blad vars intercellularer infiltreras med vatten sjunker i vatten. Syrgas som utvecklas under fotosyntesen ökar dock bladens flytförmåga. I detta försök studeras fotosynteshastigheten genom att mäta den tid det tar för ett blad i olika medier att producera tillräckligt med syre för att flyta upp.

Material och metoder

- Blad av pelargon
- Citratbuffert, pH 6.9 (450 ml 0.2M Na_2HPO_4 + 100 ml 0.1M citronsyra)
- 0.04M $NaHCO_3$
- Mätpipetter (1-20 ml)
- Stor petriskål + pincett
- Vattensug + flaska
- Små bägare (7 st per grupp)
- Korkborr + skärbräde
- Belysningsramp
- Klocka alt. tidtagarur

Stansa ut ett 50-tal bladskivor med korkborren från unga men fullt utvecklade blad. Var noga med att alla blad som används kommer från samma miljö (t ex från sol- eller skuggsidan av plantan). Undvik kraftiga nerver.

Bladskivorna infiltreras med avjoniserat vatten med hjälp av sugflaska och vattensug. Evakuera luften under några minuter så all gas försvinner (vattnet slutar att bubbla). Sätt en svag rotation på bladskivorna i sugflaskan. Lossa försiktigt på korken från flasköppningen. Upprepa proceduren om inte tillräckligt med bladskivor sjunker till botten när luften släpps in.

När en majoritet av bladskivorna sjunkit hålls vattnet med bladskivorna på en stor petriskål. Fördela fem bladskivor till varje bägare med olika koncentrationer av HCO_3^- (se tabell nedan).

Placera ut bladskivorna med början i bägare 7. Se till att de ligger rättvända och att de inte täcker varandra. Placera bägare 7 i mörker (en labhurts) direkt när bladskivorna lagts i. Fortsätt med bägare 1-6 och placera dem ljus (ljusramp). Var noga med att alla sex bägare får samma ljusstyrka.

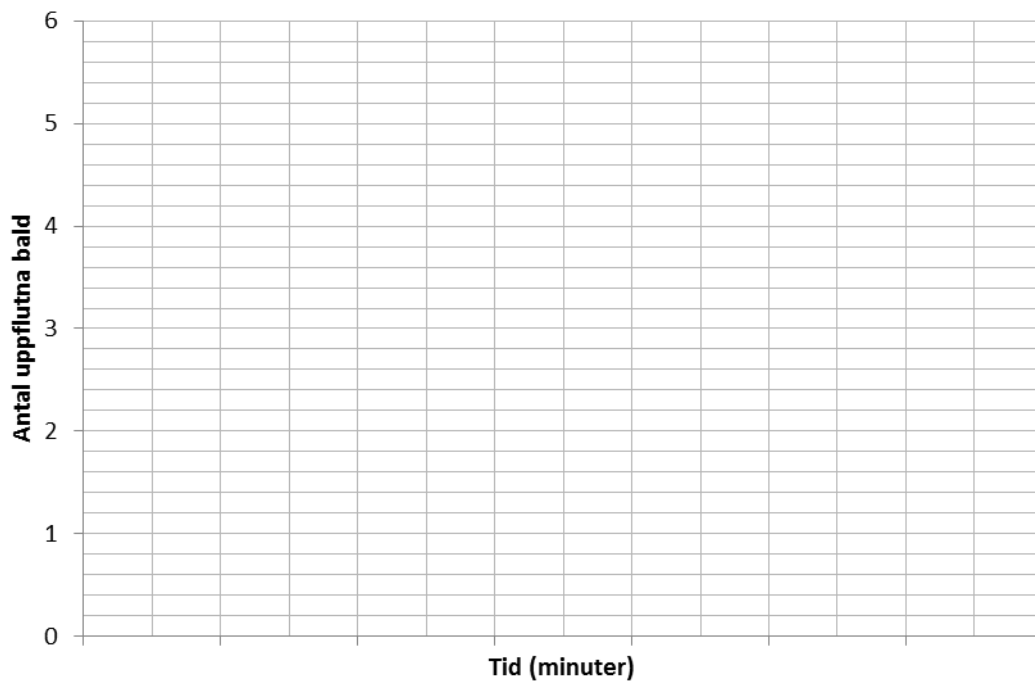
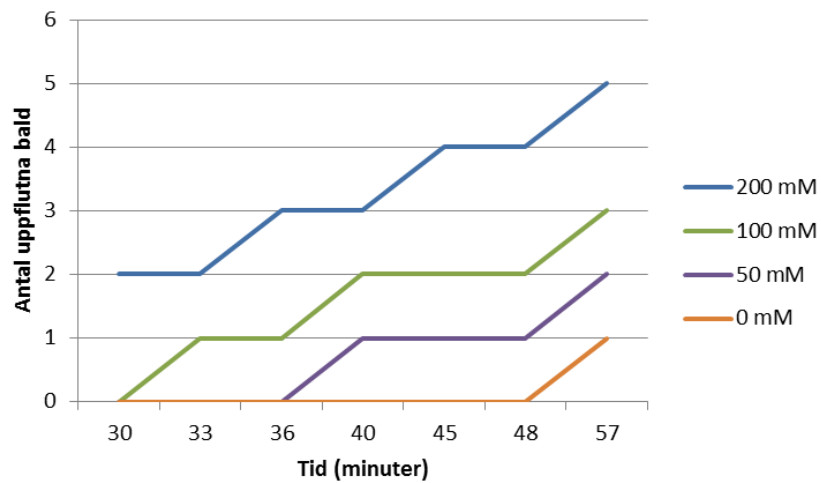
Registrera tiden då tre, fyra samt fem blad i respektive bägare har flutit upp till ytan. Så fort någon del av bladskivan når ytan registreras detta som "uppfluten". Efter ca en timme kan försöket avbrytas oberoende av hur många bladskivor som flutit upp.

Redovisning av resultat

Fyll i tabellen med tiderna (nedan). Rita sedan ett diagram där ni plottar antal uppflutna blad på y-axeln mot tiden på x-axeln (se tomt diagram nedan). Ni har ju sju behandlingar, så det kommer vara sju olika serier i ert diagram (se exempel nedan). En grupp ritas sedan upp sitt diagram på tavlan, och förklarar innebörden för övriga i salen vid nästa labbtillfälle.

Vad händer och varför?

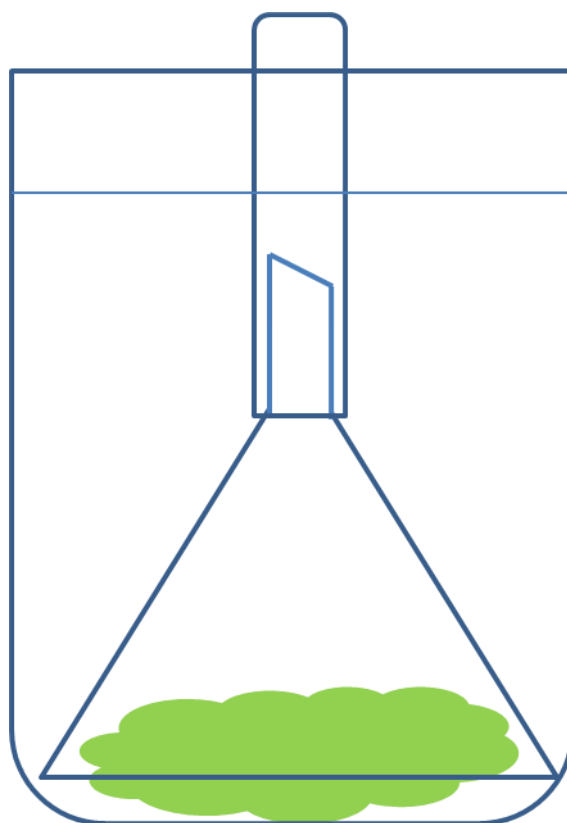
Bägare (nr)	HCO ₃ (ml)	Citratbuffert (ml)	Avjoniserat H ₂ O (ml)	[HCO ₃] (mM)	Belysning	Tid 3 blad	Tid 4 blad	Tid 5 blad
1	16	16	0	200	Ja			
2	12	16	4	150	Ja			
3	8	16	8	100	Ja			
4	4	16	12	50	Ja			
5	1	16	15	12.5	Ja			
6	0	16	16	0	Ja			
7	16	16	0	200	Nej			



LAB 4: Syrgasproduktion vid olika ljusstyrkor**Material och metoder**

- Blad av pelargon
- Hög bägare
- Tratt
- Provrör (graderat)
- Kolsyrat vatten

Lägg gröna blad i en bägare, och fyll på med kranvatten uppblandat med 1/6 kolsyrat vatten. Placera en tratt över bladen, och ett vattenfyllt provrör över trattens pip (se figur). Ställ en bägare i stark belysning, en bägare i mörker (labhurts) och en i ett av skåpen (med glasdörr) på lab. Efter ungefär tre timmar och vid nästa labbtillfälle, undersök gasproduktionen i de olika behandlingarna.

**Redovisning av resultat**

Fyll i tabellen nedan. Samla även in resultat från övriga grupper och räkna ut ett medelvärde på gasproduktionen.

Behandling	Gasproduktion ~3h (ml)_grupp	Gasproduktion nästa dag (ml)_grupp	Gasproduktion ~3h (ml)_medel	Gasproduktion nästa dag (ml)_medel
Ljus				
Mörker				
Skåp (halvmörkt)				

Riskanalys

Kemikalie/laboration/Process Fotosynteslab: Extraktion av bladpigment Separation av gula och gröna plastidpigment Syrgasutvecklingens beroende av $[\text{HCO}_3^-]$	
Aceton Citratbuffert (Na_2HPO_4 + citronsyra) Heptan Kiseldioxid Natriumkarbonat Natriumkloridlösning (10%) Natriumvätekarbonat	
Institution/Avdelning IFM/Biologi	Område/Enhet Biologi
Laboratorium/lokal Linné / Darwin	
Riskbedömning <input type="checkbox"/> Låg risk <input checked="" type="checkbox"/> Måttligt riskfyllt <input type="checkbox"/> Riskfyllt <input type="checkbox"/> Mycket riskfyllt	
Ingående kemikaliers inneboende farliga egenskaper (även slut- och mellanprodukter om möjligt) Aceton Xi: Iritterande, F: Mycket brandfarlig Heptan Xi: Hälsoskadlig, F Mycket brandfarlig, N: Miljöfarlig Natriumkarbonat Xi: Irriterande	
Risker med förvaring, beredning, hantering och avfallshantering ska beskrivas vid normalfallet och vid oförutsedda händelser Aceton R11 Mycket brandfarligt. R36 Irriterar ögonen. R66 Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor. R67 Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. Heptan R11 Mycket brandfarligt. R38 Irriterar huden. R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring. R67 Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. R50/53 Mycket giftigt för vattenlevande organismer, kan orsaka skadliga långtidseffekter i vattenmiljön. Natriumkarbonat R36 Irriterar ögonen. Citratbuffert Bedömt ingen känd risk Kiseldioxid Bedömt ingen känd risk Natriumkloridlösning (10%) Bedömt ingen känd risk Natriumvätekarbonat Bedömt ingen känd risk	

Riskbegränsande åtgärder (skyddsutrustning, hanteringsinstruktioner m.m.)

Använd skyddshandskar/labbrock/ögonskydd

Aceton

S16 Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden

S26 Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare

S46 Vid förtäring kontakta genast läkare och visa denna förpackning eller etiketten

S9 Förpackningen förvaras på väl ventilerad plats

Heptan

S9 Förpackningen förvaras på väl ventilerad plats.

S16 Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden.

S29 Töm ej i avloppet.

S33 Vidtag åtgärder mot statisk elektricitet.

S60 Detta material och dess behållare skall tas om hand som farligt avfall.

S61 Undvik utsläpp till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad.

S62 Vid förtäring, framkalla ej kräkning. Kontakta genast läkare och visa denna förpackning eller etiketten

Natriumkarbonat

S22 Undvik inandning av damm

S26 Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare

Första hjälpen samt åtgärder vid brand och spill**Brand i person**

Kväv elden med brandfilt, nöddusch eller brandsläckare.

Nöddusch i minst 15 min.

Om skadan är stor eller mycket smärtsam, ring 112 för vidare instruktioner.

Spill av kemikalier på vta

Använd handskar, skyddsglasögon och labbrock vid saneringen!

Spill av kemikalie på person**Aceton**

VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Heptan

VID FÖRTÄRING: Framkalla INTE kräkning.

VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten. Om ämnet kommer i kontakt med ögonen spola genast med vatten i minst 10 - 15 minuter med öppna ögon och kontakta ögonläkare. Oskadat öga skyddas. Ta ur eventuella kontaktlinser om möjligt. Fortsätt att skölja.

VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.

Vid exponering eller obehag: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL alt. Läkare

Natriumkarbonat

VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja

Riskbedömningen är utförd av:

Martin Iinatti Brengdahl

Arbetsgivarrepresentants underskrift:

Datum

20210907

Datum