

EESTI PÕLLUMAJANDUSE AKADEEMIA

a. saak

TAIMEFÜSIOLOOGIA
praktikum
3. osa

TARTU, 1966

A22603-2

199880

A-27603_{III}

EESTI PÕLLUMAJANDUSE AKADEEMIA

a. saar

TAIMEFÜSIOLOOGIA
praktikum
3. osa

TARTU, 1966

Эстонская сельскохозяйственная академия
г. Тарту, ул. Рийа, 12

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

(Биохимия и гистохимия)

III часть

Сост. А. Саар

Второе дополненное издание

На эстонском языке

2

TARTU ÜLIKOOLI
RAAMATUKOGU

199880

Taimefüsioloogia praktikum

III osa

Biokeemia ja histokeemia

II täiendatud trükk

Vastutav toimetaja: A. Männik

Korrektor: V. Kingo

Paljundamiseks antud 18. VIII 1966. Paber 60x84 cm.
Trükipoognaid 4,25. Tingtrükipoognaid 3,87. Arves-
tuspoognaid 3,8. Tiraaž 700. MB 06301. Tell. nr. 110.

EPA rotaprint, Tartu, Riia 12

Hind 10 kop.

TAIMEDE BIOKEEMIA JA HISTOKEEMIA

T ö ö 1

Vaakuum-infiltratsioonimeetod

Et uurida mineraalelementide või mõnede ainete mõju taimeorganismis, on vaja taimekudedesse sisestada neid elemente või aineid. Seda tehakse vaakuum-infiltratsioonimeetodiga. Infiltratsioonil tungivad uuritavad ained taime rakuvahelisse ruumi, kust nad adsorptsiooni teel satuvad rakkudesse. Selle meetodiga määras A. L. Kursanov elavas organismis ka fermente.

Vaakuum-infiltratsioonimeetodi kasutamisel peab kõigepealt arvestama järgmisi asjaolusid.

1. Taimse materjali uurimise üheaegsus. Võetakse üheaegselt mitu proovi. Osa proove infiltreeritakse lahusega ja neid võrreldakse infiltreerimata või vees infiltreeritutega. Enne katseid tuleb kontrollida, kas võetud materjalid on kaalult võrdsed; seega proove kaalutakse, määratakse vee- ja süsivesikute sisaldus. Proovideks võetakse terved lehed või pool lehte.

2. Vaakuum-infiltratsiooni kestus. Täieliku infiltratsiooni moment saavutatakse, kui raku vaheruumid on lahusega täitunud. Eri taimedel saavutatakse see erineva aja jooksul. Mõnel taimel, näiteks põldoal, saabub vaakuumil 25-35 mm täielik infiltratsioon 8-15 minuti jooksul, päevalillelehtedel aga samades tingimustes 50-60 minuti jooksul.

3. Infiltratsioonilise lahuse pH ja kontsentratsioon. Lahuse kontsentratsiooni määramisel peab arvestama taimekudede raku- mahla osmootset rõhku. Hüpotoonilised lahused pole sobivad,

sest nendega siseneb kudedesse vähe uuritavat ainet. Väga kõrged, hüpertoonilised lahused võivad välja kutsuda koguni plasmolüüsi. Näiteks alpikannikese lehe infiltreerimisel kasutatakse 0,1 M sahharoosilahust, aga 0,2 M glükoosilahust. Päevalillelehtedesse KCl- ja NaCl-lahuste infiltreerimisel kasutati vastavalt 0,08 N - 0,12 N lahuseid.

Enne katseid on vaja määrata uuritava materjali üksikute kudede või väljapressitud taimemahla osmootne rõhk (osmootse rõhu määramine kudedes plasmolüüsimetodil).

4. Uuritava aine sisestamine lehtedesse. Vaakuum-infiltratsiooniga taimekudedesse sisestatud uuritava aine hulk sõltub sellest, kui palju lahust võib mahtuda lehe raku-vaheruumidesse. Lahuse hulk oleneb koe anatoomilisest ehitusest, seega raku-vaheruumide suuruselt.

Sisestatud lahuse hulga üle otsustatakse uuritava proovi kaalu suurenemise järgi. Infiltreeritud lehe kaalu võrreldakse lehe kaaluga enne infiltreerimist. Näiteks põldoalehte sisestati lahust 110-120% lehe esialgsest toorkaalust; päevalillelehte ainult 35-40% jne.

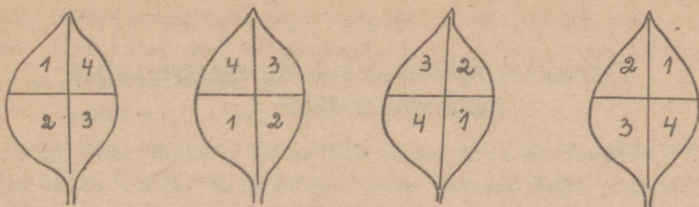
Arvestades, et lehte infiltreeritakse lahus, mille kontsentratsioon on võrdne rakumahla kontsentratsiooniga, võib pärast infiltreerimist kaalu suurenemise järgi välja arvutada lehte sisestatud lahuse hulga.

Töö käik

Taimedelt lõigatud lehed pannakse 1-2 tunniks vette, et lehekoed saavutaksid ühtlase veesisalduse. Parem on sel ajal lehti hoida klaaskupli all valguses, et õhulõhed oleksid avatud. Selliselt ettevalmistatud lehti kasutatakse katsetes. Olenevalt töö ülesandest võib neid infiltreerida tervetena või ainult teatud osi lehest.

Materjali ühtsusest ja võetud keskmisest proovist oleneb töö täpsus eri variantidel.

Kui katse koosneb kahest variandist, siis on otstarbekohane võtta nendest kaks proovi, nii et kumbagi proovi jääks mõlemast lehepoolselt osa. Nelja variandi korral võib keskmise proovi võtta selliselt, nagu joonisel näidatud.



Ettevalmistuse ajal hoida lehe proovid vaakuum-eksikaatoris. klaasis vastava lahuse sees. Selleks et lehed ei ujuks vedeliku pinnal, asetatakse nende peale mõni klaaspulgake või väike lehter.

Infiltratsioonil eraldub läbi õhulõhede ja vigastatud kudede õhku. Õhk eraldub seni, kuni on näha veel mullikesi. Siis sulgeda vaakuum-eksikaatori kraan ja ettevaatlikult, aeglaselt (1-2 minuti jooksul) avada vaakumpumbaga ühenduses olnud kraan. Lahuses taastub normaalne rõhk ning tänu sellele tungib lahus läbi õhulõhede ja lõigatud kudede raku-vaheruumidesse, täites need. Infiltratsioonil eraldatakse nende tumedama värvuse järgi. Algul ilmnevad üksikud tumerohelised laigud, mis edasi ühinevad tervikuks. Pärast seda, kui rõhk vaakuum-eksikaatoris on võrdne atmosfääri rõhuga, jäetakse lehed lahusesse veel 3-5 minutiks. Sel ajal tungib vedelik veel raku-vaheruumidesse. Siis võetakse lehed lahusest, loputatakse kaks korda destilleeritud vees ja kuivatatakse kergelt filterpaberiga.

Kui on vaja teada taimematerjalisse tunginud lahuse hulka, siis kohe pärast kuivatamist lehed kaalutakse. Seejärel asetatakse nad filterpaberile valgusse alumise küljega ülespoole. Vesi eraldub lehtedest tänu transpiratsioonile. 1,5-2 tunni pärast kaotavad lehed tumeda värvuse ja saavutavad normaalse oleku, raku-vaheruumid täituvad õhuga.

Sooja õhuvoolu (26-28 °C) pealejuhtimisel aurub vesi lehtedelt kiiremini.

Erinevuse järgi uuritava materjali kaalus katse alguses ja lõpus otsustatakse infiltratsioonil eraldatavate ainete mõjul toimunud muutuste üle.

Nende katsete kontrolliks on tavaliselt lehed, mis infiltratsioonil eraldatakse destilleeritud vees ja asuvad katselehtedega samades tingimustes.

Fermentide määramine kudedes vaakuum-infilt-
ratsioonimeetodiga

Fermentide aktiivsuse määramine põhineb sellel, et taimekudedesse sisestatakse mingisuguse aine lahus, mille muutumise põhjal otsustatakse vastavate fermentide aktiivsuse üle. See meetod võimaldab fermentide aktiivsust kindlaks teha elusates kudedes.

Näiteks lehte sisestatud glükoosist tekkinud sahharoosi põhjal otsustatakse sahharoosi sünteesivate fermentide aktiivsuse üle ja, vastupidi, lehte sisestatud sahharoosist tekkinud glükoosi põhjal järeldatakse hüdrolüüsivate fermentide olemasolu. Sünteesivate ja hüdrolüüsivate fermentide aktiivsuse üle otsustatakse monosahhariidi ja disahhariidi hulga järgi kontroll- ja katsevariandis.

Katse tulemuste registreerimise näide

Joodilahuse värvus katseklaasides											Katse algus	Katse lõpp	Järeldused
Katse- tingi- mused	Katseklaasid												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Toa- tempe- ratuur													
55 °C													

Vahendid

Nisuidandid 2-3 lehe faasis, käärid, tehnilised kaalud, katseklaasid, 100-ml-sed mõõtesilindrid, Komovski pump, filterpaber, kristallisaatorid kaanega, termostaat, 150-200-ml-sed koonilised kolvid, 0,2 M glükoosilahus, 0,1 M sahharoosilahus, klaaslehtrid, paberfilter ja toluool.

Töö käik

Võetakse 3 kaalutist (igäühes 2-4 g) nisulehti ja asetatakse need laiadesse katseklaasidesse, kuhu valatakse järgmi-

si vedelikke (igaiühte 60 ml):

- 1) destilleeritud vesi - kontroll,
- 2) 0,2 M glükoosilahus,
- 3) 0,1 M sahharoosilahus.

Katseklaasid suletakse korkidega, millest on läbi pandud klaastoru, ja ühendatakse pumbaga. Õhu väljapumpamine toimub seni, kuni lehtedest ei eraldu enam õhumulle. Pärast seda lastakse järk-järgult 1-2 minuti jooksul katseklaasi õhku, nõrgendades kolmiku juures kraani. Lahuse või vee rõhu suurenemise mõjul tungib raku-vaheruumidesse õhulõhede ja lehe lõikekohtade kaudu infiltreeriv vedelik. Seda on kerge näha tumeroheliste laikude ilmnemisest, mis kiiresti levivad kogu lehe pinnal ühtseks tervikuks. Õigel infiltreerimisel ei tohi jääda lehtedele heledaid mitteinfiltreeritud kohti (kui neid on, tuleb infiltreerimist korrata). Pärast rõhu võrdsustamist jäetakse lehed 2-3 minutiks lahusesse, sest lahus tungib veel raku-vaheruumidesse. Seejärel loputatakse lehed kiiresti kolm korda veega (kaks korda tavalise, üks kord destilleeritud veega), et kõrvaldada lahused lehepinnalt, ja seejärel kuivatatakse filterpaberiga. Edasi on vaja kõrvaldada vesi raku-vaheruumidest. Selleks laotatakse lehed klaasalusele ja soojendatakse elektripirniga kuni 26-28 °C-ni (10-12 minuti jooksul). Vee eraldumist tuntakse sellest, et lehed kaotavad oma tumeda värvuse ja muutuvad normaalseks. Lehti kuivatatakse teatud kaalu ni. Pärast kuivatamist jäävad nad sisestatud lahuste arvel tavaliselt 1/3 võrra algkaalust raskemaks. Pärast kuivatamist pannakse lehed kolbi ja edasi kristallisaatorisse, mille seinad ettevaatlikult kaetakse tihedalt niiske filterpaberiga. Kristallisaator asetatakse kolmeks tunniks termostaati 23-25 °C temperatuuri.

Selle aja möödumisel võetakse kolvid lehtedega termos-
taadist välja ja pannakse keevale veevannile, kus neid hoitakse 5 minutit fermentide inaktiveerimiseks. Seejärel purustatakse lehed uhmris. Enne lisatakse neile 0,2 g kriiti hapete neutraliseerimiseks. Purustatud massile valatakse 10-15 ml destilleeritud vett ja kantakse üle samasse kolbi ning asetatakse jälle 30 minutiks keevale veevannile suhkrute ekstraheerimiseks. Aeg-ajalt kolbi loksutatakse. Peale selle lisatakse 2 ml pliiatsetaati valkude ja värvainete sadestamiseks.

Kolvid sulgeda korgiga ja loksutada. Neil lastakse natuke aega (5 minutit) seista ja filtreeritakse läbi kuiva filtri 100-ml-sse mõõtekolbi, seejärel lisatakse tilkadena naatriumsulfaadilahust Pb ülejäägi eraldamiseks, mis segab suhkrute määramist. Naatriumsulfaati lisatakse seni, kuni $PbSO_4$ sadet enam ei teki. Pärast seda lisada kolbi destilleeritud vett märgini, sulgeda korgiga, loksutada, lasta sademel settida ja filtreerida läbi kuiva filtri. Igast kolmest filtraadist määratakse taandatud suhkrud ja sahharoos.

Taandatud suhkrute määramiseks on vaja võtta vahetult filtraadist proov ja määrata suhkrud Bertrandi järgi (vt. töö 18). Sahharoosi määramiseks hüdrolüüsitakse kõik kolm filtraati. Selleks võtta 50-ml-sse mõõtekolbi 25 ml filtraati, lisada 2,5 ml kaupja 20%-list HCl, et luua selles lahuses umbes 2,5%-line kontsentratsioon. Seejärel panna veevannile ja kuumutada 70–75 °C-ni. Samaaegselt asetatakse veevannile ka kontrollkolb 25 ml veega ja sama hulga 20%-lise HCl-ga, milles on termomeeter. Hüdrolüüs toimub 70 °C temperatuuril 5 minutit. Siis kolb jahutatakse ja vedelik neutraliseeritakse 10%-lise NaOH-lahusega indikaatori (metüülpunase) järgi kuni roosa värvuse kadumiseni ja lisatakse destilleeritud vett märgini. Lahus segatakse ja määratakse sellest Bertrandi järgi üldine suhkrute hulk pärast hüdrolüüsi (vt. töö 19).

Fermentide aktiivsuse arvutamise näide

Esimene katse: infiltreeriti veega, mis sisaldas 32,8 mg monosahhariide ja 18,4 mg sahharoosi, s. o. üldse 51,2 mg suhkruid.

Teine katse: infiltreeriti 0,2 M glükoosiga, mis sisaldas 125 mg monosahhariide, 35,6 mg sahharoosi, s. o. kokku 160,6 mg suhkruid.

Kolmas katse: infiltreeriti 0,1 M sahharoosiga, mis sisaldas 67,2 mg monosahhariide ja 97,2 mg sahharoosi, s. o. kokku 164,4 mg suhkruid. Siit järeldub, et teises katses sisestati 109,4 mg glükoosi (160,6 – 51,2), aga kolmandas katses 113,2 mg sahharoosi (164,4 – 51,2).

Kolme tunni kestel sünteesiti lehtedes $35,6 - 18,4 =$
 $= 17,2$ mg

sahharoosi, s. o. 15,7% sisestatud suhkrust.

Ühe tunni jooksul sünteesiti 5,7 mg sahharoosi, aga hüdroolüüsiti 11,5 mg monosahhariidide kaalutise kohta.

Katse tulemused

Variandid	Suhkrusisaldus (mg glükoosi 1 g tooraines)			Infiltreeritud suhkrud (mg-des 1 g tooraine kohta)	Sünteesitud sahharoos		Lagundatud sahharoos		Süntees Hüdroolüüs
	Monosahhariidid	Disahhariidid	Kokku		mg-des	%-des sisestatud suhkrust	mg-des	%-des sisestatud suhkrust	
Vesi (kontroll)									
Glükoos									
Sahharoos									

T ö ö 3

Tärglise hüdroolüüsi skaala saamine diastaasi toimel

Vahendid

Linnased, 2%-line tärglisekliister, katseklaasid, kolvid, veevann, termomeeter, filterpaber, I + KI lahus (1 g I + + 2 g KI + 300 ml destilleeritud vett), glütseriin ja Fehlingi lahused I, II (vt. töö 16).

Töö käik

Võetakse kaks katseklaasi, kumbagi valatakse 5 ml 2%-list tärglisekliistrit ja 1 ml linnaseekstrakti. Üks katseklaas jäetakse seisma toatemperatuuril, teine asetatakse

veevannile 40 °C temperatuuri.

Tärgklise suhkrustamise astme määramiseks võetakse nõrk joodilahus (10 ml vett + 3 tilka tavalist I + KI lahust) ja jaotatakse võrdsetes hulkades mitmesse katseklaasi. Pipetiga võetakse veevanni asetatud katseklaasist iga 3 minuti järel proovid. Toatemperatuuril seisvast katseklaasist võetakse proovid iga 10 minuti järel. Iga kord võetakse võrdne arv tilku (3-4).

Tärgklise suhkrus muutumisel on vaheproduktideks mitmesugused dekstriinid. Sõltuvalt hüdroolüüsi astmest saadakse joodiga erinevad värvused. Hüdroolüüsi algstaadiumid annavad sinivioletse, violetse ja kiraspunase värvuse, vahepealsed staadiumid punase, roosa ja kollase värvuse ning lõpuks värvust ei saada, s. o. joodi värvus jääb samaks, mis tal oli (helekollane). Pärast seda tehakse mõlemas katseklaasis reaktsioon suhkrutele (maltoosile), mis avastatakse Fehlingi reaktiividega.

Teises katseklaasis, mis on toatemperatuuril, toimub tärgklise hüdroolüüs väga aeglaselt. Kui seal ajapuuduse tõttu ei saa hüdroolüüsi lõpule viia, siis protsessi kiiruse võrdlemiseks erinevates temperatuurides võib võtta ükskõik millise staadiumi, näiteks punase, dekstriinide staadiumi (joodiga annab punase värvuse), ja võrrelda aega, mis kulus selle staadiumini jõudmiseks temperatuuril 40 °C ja toatemperatuuril.

T ö ö 4

Diastaasi tekkimine tärgkliserikaste seemnete idanemisel

Vahendid

Idanenud herned, Petri tass, kartulitärgklis, želatiin, I + KI nõrk lahus ja pintsetid.

Töö käik

2%-line tärgklisekliister ja 10%-line želatiinilahus valatakse kokku, kuumutatakse mõni minut, et tärgklis muutuks kliistriks, ja valatakse ühtlase kihina Petri tassi. Sellele želatiinikihiile laotatakse pooleks lõigatud idanenud herned (lõikepind niisutada veega). 30-40 minuti pärast võetakse

pintsetiga ettevaatlikult herved ära ja kogu plaat valatakse üle nõrga I + KI lahusega (10 ml vee kohta võetakse 10 tilka I + KI alglahust). Valgeks jäävad need kohad, kus olid herved. See näitab tärklise suhkruks muutumist neis kohtades ferment diastaasi toimel.

Sama katset võib demonstreerida järgmiselt: samasugusele želatiinikihiile viiakse pehme harjaga linnaseekstrakti ja joonistatakse mitmesuguseid figuure. Kuivamise vältimiseks kaetakse plaat klaasiga. 1,5 tunni pärast valatakse plaat üle nõrga I + KI lahusega. Väljaspool linnaseekstrakti figuure värvub želatiinikiht I + KI mõjul siniseks, muu osa jääb värvetuks. Saadakse sama tulemus kui hernelstega.

T ö ö 5

Invertaasi määramine pärmiseentes ja selle mõju sahharoosile

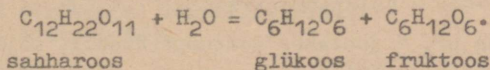
Vahendid

Pärm, 1%-line sahharoosilahus, keeduklaasid, veevann, termomeeter, piirituslamp, Fehlingi lahused I ja II; 6%-line CuSO_4 -lahus, 10%-line NaOH-lahus ja 1%-line HCl-lahus.

Töö käik

10 g presspärmile lisatakse klaasipuru ja mõneminutilise hõõrumise järel 5 ml vett ning jätkatakse uhmerdamist. Seejärel lisatakse 20 ml 40° -ni soojendatud vett ja hõõrutakse veel 30 minutit. Filtreeritakse. Esimesed tilgad hägust filtraati valatakse uuesti filtrile.

Saadud filtraat sisaldab invertaasi, mis lagundab suhru heksooside seguks järgmise võrrandi järgi:



Et uurida invertaasi toimet sahharoosile, võetakse 1%-list sahharoosilahust ja valatakse kolme katseklaasi, igasse 10 ml. Üks proov jääb kontrolliks, teisele lisatakse 2 ml invertaasilahust, kolmandasse samuti 2 ml invertaasi, mis on eelnevalt läbi keedetud. Kõik kolm proovi asetatakse

veevannile 40 °C temperatuuri.

20 minuti pärast tehakse kõigi kolme prooviga Fehlingi või Trommeri reaktsioon (vt. töö 16).

Paralleelselt võib teha sahharoosi inversiooni soolhappega. 5 ml sahharoosilahusele lisatakse 5 ml 1%-list HCl ja kuumutatakse veevannil. Pärast jahtumist tehakse Trommeri reaktsioon.

T ö ö 6

Temperatuuri ja keskkonnareaktsiooni mõju invertaasi aktiivsusele

Vahendid

Pärm, 20%-line sahharoosilahus, katseklaasid, veevann, gaasipõleti, 1,5%-line äädikhape, 0,1 N KOH, Fehlingi lahused I ja II.

Töö käik

Ekstraheeritakse invertaas pärmist (vt. töö 5). Järgnevalt valmistatakse kuude katseklaasi järgmised segud:

Katseklaas nr. 1 ja 2: 5 ml sahharoosilahust, 2 ml vett ja 2 ml invertaasilahust.

Katseklaas nr. 3: Sama, kuid invertaas inaktiveeritakse eelnevalt keetmisega.

Katseklaas nr. 4: 5 ml sahharoosilahust, 1,5 ml vett, 0,5 ml 1,5%-list äädikhapet, 0,5 ml invertaasilahust (nõrk happeline keskkond).

Katseklaas nr. 5: 5 ml sahharoosilahust, 2 ml äädikhapet, 0,5 ml invertaasilahust (tugev happeline keskkond).

Katseklaas nr. 6: 5 ml sahharoosi, 2 ml 0,1 N KOH, 0,5 ml invertaasilahust (aluseline keskkond).

Katseklaas nr. 1 jäetakse toatemperatuuri, kõik teised asetatakse veevannile 40° C temperatuuri. Tunni aja pärast võetakse katseklaasid välja ja pannakse külma vette, et peatada edasist inversiooniprotsessi.

Uuritakse ferment invertaasi aktiivsust erinevates katseklaasides. Selleks valatakse kuude tühja keeduklaasi igaühete 4 ml Fehlingi lahust (2 ml Fehling I ja 2 ml Fehling II).

Lisatakse niisama palju vett, kuumutatakse keemiseni ja tilkhaaval lisatakse sellele uuritavat invertaasilahust. Tilgad on vaja täpselt lugeda. Lahuse sinise värvuse kadumisega tehakse kindlaks tilkade hulk, mida on vaja $\text{Cu}(\text{OH})_2$ täielikuks taandamiseks Fehlingi lahuses.

Tehakse järeldused temperatuuri ja keskkonnareaktsiooni suhtelisest mõjust invertaasi aktiivsusele.

Katseklaasi nr.	t°	pH	Tilkade arv, mis kulus Fehlingi lahuse sinise värvuse kadumiseks		
			Katse kordused		
			1	2	3
1.	20	6,5	15	15	15
2.	40	6,5	13	12	12
3.	40	7,5	valastumist ei olnud		
4.	40	5,0	9	10	9
5.	40	4,5	6	8	5
6.	40	7,5	valastumist ei olnud		

Katsest selgub, et happelises keskkonnas ferment invertaas aktiveerub, kuid tugev alus pidurdab tema aktiivsust. Toatemperatuurist kõrgem (40 °C) temperatuur mõjub fermenti aktiivsusele soodsalt.

T ö ö 7

Oksüdaasi määramine taimedes

Vahendid

Kartulimugulad, 1°-line kvajakvaigu alkoholilahus, katseklaasid ja filterpaber.

Töö käik

Kartulimugul purustatakse uhmris, kuhu on lisatud natuke destilleeritud vett. Saadud segu filtreeritakse. Kahte katseklaasi pannakse 4-5 ml filtraati. Ühe katseklaasi sisaldist keedetakse 1 minuti jooksul, teine jäetakse keetmata. Nüüd lisatakse kummassegi katseklaasi mõni tilk 1°-list kvajakvaigu alkoholilahust ning jälgitakse värvust. Aktiivse oksüdaasi olemasolu korral muutub lahus siniseks.

Katalaasi kvalitatiivne määramineVahendid

Elodea canadensis, 3%-line H_2O_2 , keeduklaas, mikroskoop, alus- ja katteklaasid.

Töö käik

Igale alusklaasile pannakse tilk H_2O_2 ja igasse tilka asetatakse üks eri vanusega vesikatkuleht. Preparaat kaetakse katteklaasiga ja vaadeldakse mikroskoobis.

Vesinikülihapend tungib lehe rakkudesse ning lagundatakse siis katalaasi toimel veeks ja vabaks hapnikuks. Viimane eraldub mullikestena raku-vaheruumidesse. Jälgitakse protsessi kiirust noortel ja vanadel lehtedel.

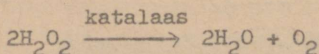
Teisele alusklaasile pannakse tilk vesinikülihapendit, millesse asetatakse eelnevalt 1 minuti jooksul keedetud lehed ja vaadeldakse mikroskoobis.

Hapnikumullikesi ei eraldu, sest ferment inaktiveerus lehe kuumutamisel.

Katalaasi aktiivsuse määramine

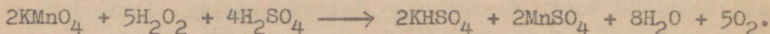
(A. N. Bachi ja A. I. Oparini järgi)

Ferment katalaas lagundab vesinikülihapendi veeks ja hapnikuks järgmiselt:



Vesinikülihapendi kõrgeid kontsentratsiooneid taimerakkudes kahjustavad raku ainevahetust.

Katalaasi kvantitatiivne määramine põhineb vesinikülihapendi hulga kindlakstegemisel kaaliumpermanganaadiga tiitrimise teel. Reaktsioon toimub järgmiselt:



Vesinikülihapendi hulk, mida ferment lagundab, määratakse sel teel, et leitakse vahe, mitu ml 0,1 N $KMnO_4$ -lahust kulus

kontroll- ja katselahuse tiitrimiseks.

Vahendid

1%-line H_2O_2 -lahus, 0,1 N NaOH-lahus, toluool, 0,1 N KMnO_4 vesilahus, 10%-line H_2SO_4 -lahus, taimelehed, elektripliit, filterpaber.

Töö käik

Uuritav materjal (1 g) kaalutakse analüütilistel kaaludel. Peenestatakse täielikult uhmris, lisades vähesel hulgal destilleeritud vett. Segu valatakse läbi lehtri (klaaspulga abil) 100-ml-sse kolbi. Kolb täidetakse veega märgini ja loksutatakse segu hästi segamini. Lõpuks lisatakse 2-3 tilka toluooli ja jäetakse toatemperatuuril 2 tunniks seisma.

Seejärel filtreeritakse segu läbi kuiva filtri või tsentrifuugitakse. Saadud filtraadist määrataksegi katalaas.

Võetakse neli proovi, igaühes 20 ml filtraati: kaks katse- ja kaks kontrollproovi. Viimaseid keedetakse 5 minutit elektripliidil, et fermente inaktiveerida.

Igale katse- ja kontrollproovile lisatakse 20 ml destilleeritud vett ja 3 ml 1%-list H_2O_2 ning jäetakse 30 minutiks toatemperatuuril seisma. Pärast seismist lisatakse igale proovile 5 ml 10%-list H_2SO_4 vesilahust fermenti tegevuse katkestamiseks. Ülejäänud vesinikülihapend tiitritakse 0,1 N KMnO_4 -lahusega. Katalaasi aktiivsuse üle otsustatakse vesinikülihapendi hulga järgi, mida ferment 30 minuti jooksul ei lõhustanud. Kui vesinikülihapendit jäi kudedesse vähe, siis oli ferment väga aktiivne. Vesinikülihapendi hulk määratakse tiitrimisel kaaliumpermanganaadiga.

Katalaasi aktiivsust määratakse järgmiselt:

$$A_k = \frac{(a - b) \cdot 1,7}{n},$$

kus a - 0,1 N KMnO_4 -lahuse hulk ml-s, mis kulus kontrollilahuse tiitrimisel;

b - 0,1 N KMnO_4 -lahuse hulk ml-s, mis kulus katselahuse tiitrimisel (1 ml 0,1 N KMnO_4 -lahust on ekvivalentne 1,7 mg H_2O_2);

n - uuritava materjali kaal g-des.

Arvutamise näide.

Materjali kaal on 2,1675 g. Kontroll-lahuse tiitrimiseks kulus 12,51 ml KMnO_4 -lahust, katsele - 9,86 ml. Tiitrimiseks võetud filtraat oli 20 ml ja sellele vastavalt materjali

$$\frac{2,1675 \cdot 20}{100} = 0,4335 \text{ g.}$$

Saadud arvud asetame valemisse:

$$A_k = \frac{(12,51 - 9,86) \cdot 1,7}{0,4335} = 10,4.$$

T ö ö 10

Katalaasi aktiivsuse määramine taimses materjalis

Vahendid

Kartulimugulad, taimelähed jne., uhmer, pestud liiv, kriidipulber, 5%-line H_2O_2 , 5-ml-line pipett, 25-ml-line mõõtesilinder, katalaasi aktiivsuse määramise aparaat (joon. 1), stopper.

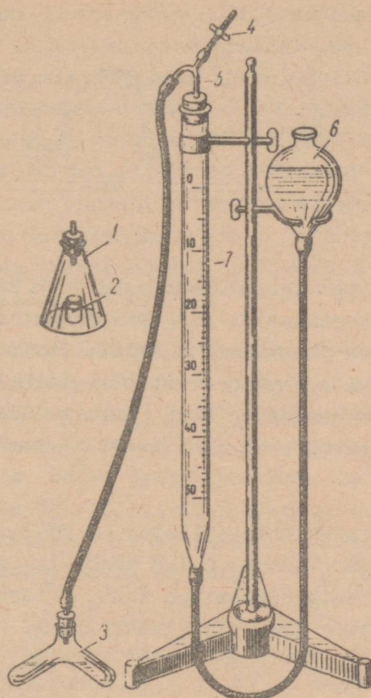
Töö käik

Uhmris purustatakse liivaga 1 g taimset materjali, millele lisatakse natuke kriiti aluselise reaktsiooni saamiseks (pH 7,7 on antud fermentidele optimaalne).

Purustamise ajal lisada väikeste kogustena vett, üldmahuga 20 ml. Saadud segu viia harulise klaasi ühte torru (joon. 1). Teise poole torru viia 5 ml 3%-list H_2O_2 . Aparaat ühendatakse kummist voolikuga (mitte lasta vedelikel seguneda).

Seejärel avada kraan ja lehtri asendi muutmiseks seada vee nivoo büretis nullile. Sulgeda kraan ja kiirelt harulise klaasi (joon. 1) asendi muutmiseks segada vedelikud mõlemas torus. Seejärel kogu aja aparaati loksutades märkida vee nivoo languse järgi büretis 3 minuti jooksul eraldunud hapniku hulk milliliitrites.

Veehulga arvestamisel lehtris ja büretis peab vesi olema ühel tasemel.



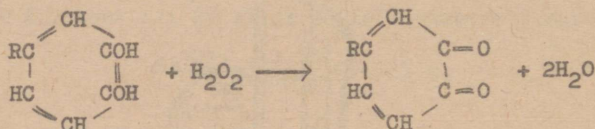
Joon. 1.
Katalaasi määramise seade.

T ö ö 11

Peroksüdaasi aktiivsuse määramine

Peroksüdaas on taimedes laialt levinud. Ta etendab tähtsat osa hapendusprotsessides. Peroksüdaas hapendab paljusid fenole ja mõningaid aromaatsid amiine. Nende ühendite hapendamine peroksüdaasi osavõtul toimub vesinikülihapendi abil. Peroksüdaas moodustab vesinikülihapendiga kompleksse ühendi, mille tulemusel aktiveeritakse ülihapend ja see toimib kui

vesiniku aktseptor (vastuvõtja). Hapendumine toimub järgmiselt:



Peroksüdaas nagu polüfenooloksüdaaski võib katalüüsida hingamiskromogeenide hapendumist hingamispigmentideks.

Laboratoorses praktikas on laialt levinud peroksüdaasi aktiivsuse määramine, mis põhineb pürogallooli hapendumisel vesinikülihapendi manulusel kuni purpurgalliini tekkimiseni. Pupurgalliin sadestub vees lahustumatu pruuni sademena.

Vahendid

1%-line vesinikülihapendilahus, 2,5%-line pürogalloolilahus, 5%-line H_2SO_4 -lahus, 0,1 N KMnO_4 -lahus, 0,1 N naatriumoksalaadilahus, kontsentreeritud H_2SO_4 (tihedus 1,84), eeter, lehtrid, mõõtekolvid (200 ml), tsentrifuug.

Töö käik

Kaalutakse 2-4 g taimset materjali, mis peenestatakse rauavaba liiva või klaasipuruga. Peenestamisel lisatakse aegajalt destilleeritud vett. Kogu mass valatakse läbi leetri 200-ml-sse mõõtekolbi ja täidetakse veega kuni märgini, loksutatakse hästi läbi ja jäetakse 2 tunniks seisma. Seejärel segu filtreeritakse. Filtraadis määrataksegi peroksüdaasi aktiivsus. (Fermendi aktiivsust saab määrata kohe ka pudrutaolisest massist.)

Peroksüdaasi aktiivsuse määramisel tuleb silmas pidada lahuste lisamise kindlat järjekorda, sellist, nagu järgnevalt näidatud.

Võetakse kaks 100-ml-st Erlenmeyeri kolbi, millesse valatakse 5 ml 2,5%-list pürogalloolilahust, 2 ml 1%-list vesinikülihapendit ja 18 ml vett. Seejärel lisatakse kumbagi

kolbi pipetiga 25 ml filtraati. Kolmandasse, kontrollkolbi valatakse 25 ml filtraati ja soojendatakse 10 minutit pliidil (kolb ühendada tagasivoolujahutiga). Pärast jahtumist lisatakse kontrollkolbi samad lahused mis katsekolbidessegi. Kolvid suletakse korgiga ja jäetakse 20 tunniks termostaati 25 °C-sse. Võrreldavate tulemuste saamiseks pannakse katsekolvid ja kontrollkolb täpselt samadesse tingimustesse. Seismise ajal sadestub katselahusest palju tugevam pruun sade kui kontroll-lahusest. Katselahusel on seetõttu palju intensiivsem värvus kui kontroll-lahusel.

Pärast 20-tunnilist soojendamist lisatakse fermendi tegevuse katkestamiseks 1 ml 5%-list H_2SO_4 -lahust. Kolvid jahutatakse enne filtreerimist, kuna purpurgalliini sade on hästi lahustuv. Kolbidest kantakse sade tsentrifuugi klaasidesse ja tsentrifuugitakse. Sadet pestakse külma destilleeritud veega korraldvalt (3-4 korda) ja iga kord tsentrifuugitakse. Purpurgalliini sade kantakse üle klaasfiltrile nr. 1 või 2 ja sadet pestakse külma destilleeritud veega.

Pestud sade lahustatakse 5-10 ml-s kontsentreeritud väävelhappes (kolorimetreerimisel aga eetris). Väävelhapet on soovitatav eelnevalt soojendada 50-60 °C temperatuurini.

Sade lahustub paremini, kui seda filtril klaaspulgaga segada. Filtrit loputatakse 3 korda (2-3 ml) kontsentreeritud H_2SO_4 -ga ja lõpuks veega. Vee hulk ei tohi ületada 1/3-1/2 happe mahust, vastasel juhul sadestub purpurgalliin uuesti. Kui sade langes välja, siis valatakse kolbi uuesti kontsentreeritud H_2SO_4 , kuni sade lahustub. Saadud lahusele (see võib fermendi kõrge aktiivsuse korral olla pruunikaspruunane) valatakse kindel hulk (näiteks 5 ml) 0,1 N $KMnO_4$ -lahust ja tiitritakse naatriumoksalaadilahusega. Enne tiitrimise lõpetamist lahust soojendatakse.

Lahuseid (katselahus purpurpruunane, kontroll-lahus pruunikas) võib tiitrida ka otseselt 0,1 N $KMnO_4$ -lahusega. $KMnO_4$ -ga tiitrimisel muutub purpurpruunane lahus algul tumepruuniks, siis kollaseks ja lõpuks heleroheliseks. Kolbi soojendatakse

tiitrimise lõpetamisel, et reaktsioon kulgeks lõpuni kiiresti.

Tiitrimine lõpetatakse, kui üks tilk KMnO_4 värvib lahuse roosaks ja see värvus püsib 0,5 minutit.

Peroksüdaasi aktiivsust väljendatakse 0,1 N KMnO_4 -lahuse milliliitrite hulga järgi ning arvutatakse 1 g kuivaine kohta.

Arvutuse näide.

Oletame, et katselahuse tiitrimiseks kulus 41,7 ml 0,1 N KMnO_4 -lahust (võetakse kahe katse keskmine), aga kontrolliks 0,9 ml. Analüüsiks võeti 25 ml filtraati. Uuritava materjali kaal oli 4,00 g. Seega uuriti katses ja kontrollis

$$\frac{4,00 \cdot 25}{200} = 0,5 \text{ g.}$$

Peroksüdaasi aktiivsus arvutatakse järgmiselt

$$\frac{(41,7 - 0,9)}{0,5} = 81,6.$$

Purpurgalliini võib määrata ka kolorimetreerimisel. Sel juhul lahustatakse pestud sade kindlas hulgas eetris (näiteks 25 ml). Paralleelselt valmistatakse purpurgalliini puhtast preparaadist standardlahus (5 mg purpurgalliini 50 ml eetris). Standardlahuste lahjendustest valmistatakse kolorimetreerimisel vastav graafik, mille järgi saab uuritavates lahustes kindlaks teha peroksüdaasi aktiivsust.

T ö ö 12

Peroksüdaasi määramine kartulimugulates

Vahendid

Kartulimugulad, skalpell, riiv, marli, lehter, kolb, katseklaasid, pipetid, 1%-line hüdrokinoonilahus ja 3%-line H_2O_2 .

Töö käik

Riivida mõni kartulimugul ja saadud massist pigistada läbi marli mahl välja. Võtta kolm katseklaasi ja valada neisse järgmised lahused kindlas järjekorras:

- 1) 5 ml 1%-list hüdrokinoonilahust, 1 ml 3%-list H_2O_2 ja 1 ml kartulimahla,
- 2) 5 ml 1%-list hüdrokinoonilahust, 1 ml 3%-list H_2O_2 ,
- 3) 5 ml 1%-list hüdrokinoonilahust, 1 ml kartulimahla.

Katseklaase jälgides näeme, et esimeses hakkavad eralduma gaasimullikesed. Toimub hüdrokiinoni hapendumine peroksüdaasi mõjul.

Peroksüdaas on redoksferment. Ta aktiveerib H_2O_2 hapnikku, mis võtab substraadilt vesiniku ära. Seega substraat hapendub. Peroksüdaas võib hapendada polüfenooli kiinooniks.

Var. nr.	Katsetingimused			Tulemused	Märkused
	Kartulimahl	H_2O_2	Hüdrokiinon		
1.	+	+	+		
2.		+	+		
3.	+		+		

T ö ö 13

Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramine

Polüfenooloksüdaasi määramine põhineb tema omadusel askorbiinhapet hapendada.

Polüfenooloksüdaasi aktiivsust määratakse esimese 2 minuti jooksul.

Vahendid

100 mg askorbiinhapet lahustatakse 100 ml vees. 0,02 M pürokatehhiinilahus (2,2 g 1 l vees), 10%-line fosforhappelahus (meta- või orto-), 0,01 N I-lahus, 1%-line tärkliselahus, mõõtekolvid (100 ml), uhmer, filterpaber, keeduklaasid.

Töö käik

Analüütilistel kaaludel kaalutakse 1 g taimset materjali, mis hoolikalt peenestatakse uhmris 5 ml destilleeritud vees. Purustatud mass pannakse läbi lehtri 100-ml-isse mõõtekolbi. Uhmrit loputatakse mitmel korral veega ja kõik see lisatakse kolbi. Kolb täidetakse veega märgini. Hoolikalt loksutatakse ja jäetakse toatemperatuuril 3-4 tunniks seisma. Pärast seismist segu filtreeritakse ja filtraadist määratakse polüfenooloksüdaas.

Kahte kolbi või keeduklaasi mõõdetakse kumbagi 1 ml filtraati, millele lisatakse 3 ml vett, 2 ml askorbiinhapet ja

1 ml 0,02 M pürokatehiini lahust. Kahte kontrollkolbi lisatakse kumbagi 1 ml eelnevalt 5 minutit keedetud filtraati ja kõiki teisi lahuseid samas järjekorras kui katsete korral. Lisatud lahuste temperatuur peab olema 18-20 °C. Kolbe loksutatakse ühtlaselt 2 minutit. Seejärel lisatakse 1 ml 10%-list fosforhappelahust ja tiitritakse joodiga tärglase manulusel. Fermendi aktiivsus väljendub 0,01 N joodilahuse milliliitrite arvus 1 ml filtraadi kohta, mille polüfenooloksüdaasi aktiivsust uuriti.

T 5 5 14

Dehüdrogenaasi aktiivsuse määramine

Dehüdrogenaaside määramiseks kasutatakse Thunbergi katsutit (vt. joon. 2), milles on võimalik säilitada vaakuumi mitme tunni jooksul.

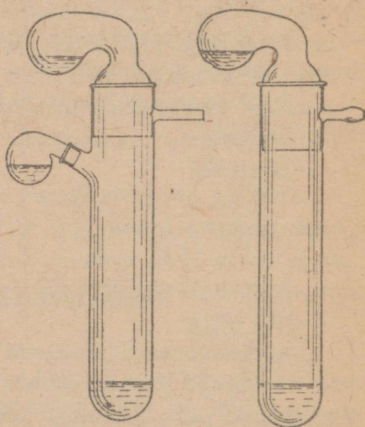
Töö printsiip põhineb sellel, et ferment dehüdrogenaas taandab metüleensinise hapnikuta keskkonnas leukoühendiks. Et parkained inaktiveerivad dehüdrogenaase, tuleb seemnete dehüdrogenaaside määramisel neilt kestad eemaldada.

Vahendi

Metüleensinine 1:10000
või 1:20000 (lahus säilitatakse pimedas), 0,87%-line K_2HPO_4 -lahus, Thunbergi katsut, uhmer, termostaat, vaakumpump.

Töö käik

Kaalutakse 5 g taimset materjali, mis purustatakse uhmis liivaga. Purustamise ajal lisatakse vähe (5 ml) 0,87%-list K_2HPO_4 -lahust. Purustatud mass pannakse 50-100-ml-sse mõõtekolbi, mis täidetakse



Joon. 2. Thunbergi katsut.

K_2HPO_4 -lahusega kriipsuni. Segu loksutatakse hästi segamini ja jäetakse 30 minutiks toatemperatuuril seisma. Pudrutaolist massi segatakse mitmel korral ja seejärel tsentrifuugitakse või filtreeritakse.

Thunbergi katsuti alumisse ossa valatakse 3 ml fermenti sisaldavat filtraati, ülemisse ossa 1 ml metüleensinist. Katsut suletakse korgiga ja äravoolutoru ühendatakse Tistšenko loputusnõuga ning elavhõbemanomeetriga.

Õhk pumbatakse Thunbergi katsutist välja, kuni rõhk langeb 10–12 mm elavhõbedasambale. Kui vedelik vahutab, siis eemaldatakse õhk aeglasemalt. Seejärel pööratakse kraani 90° , aparaat eraldatakse vaakumpumbast ja asetatakse termostaati $37^\circ C$ temperatuuri. Aparaaði sisaldis loksutatakse hästi segamini ja märgitakse metüleensinise valastumiseks kuluv aeg minutites. See aeg näitab dehüdrogenaasi aktiivsust.

Määrata dehüdrogenaaside aktiivsus taime eri organitel ja kirjutada vihikusse kokkuvõtte tehtud tööst.

T ö ö 15

Dehüdrogenaasi määramine

Vahendid

Metüleensinine (50 mg/l), Elodea leht, presspärm, 0,5%-line sahharoosilahus, kestadeta herned, lehter, filterpaber, katseklaasid, 3%-line H_2O_2 , mikroskoobid, Fehlingi lahused I ja II, 2° -ne α -naftoolalkohollahus, 0,87%-line K_2HPO_4 , termoregulaatoriga veevann.

Redoksfermentide hulka kuuluvad mitmesugused fermentid, millest tähtsamad on dehüdrogenaasid. Dehüdrogenaasid aktiveerivad substraadi vesiniku. Hapnikupuudusel võib vesinik ühineda ka teiste aktseptoritega. Seetõttu saab neid fermente avastada metüleensiniseega. Dehüdrogenaasi olemasolu korral ühineb aktiveeritud H^+ metüleensiniseega, muutes selle värvu- setuks leukoühendiks.

Töö käik

1. Katseobjektiks võib olla vesikatku leht, mille rakkudel on kõrge taanduspotentsiaal.

Rohkete lehtedega vesikatku oksake asetatakse pooleks tunniks metüleensinise lahusesse (50 mg/l). Pärast seda pestakse vesikatku oks värvilahusest, temalt võetakse mitmesuguse vanusega lehti, asetatakse alusklaasile veetilka, kaetakse katteklaasiga ning vaadeldakse nõrga suurendusega. Näeme, et noored lehed ei värvu, vanad värvuvad hästi, vahepealsetel lehtedel värvuvad tipud. Lehe alus, tema noorem osa, jääb ka neil värvusetuks.

2. Dehüdrogenaasiderikkad on pärmsseened. Katseklaasi valatakse 5 ml 0,5%-list sahharoosilahust, millele on lisatud 1 ml metüleensinise värvilahust. Sellesse lahusesse asetatakse pärmitükike. Katseklaas suletakse korgiga. Pärmis olevad ferendid taandavad metüleensinise ja lahus muutub umbes tunni aja pärast värvusetuks. Öhu käes muutub lahus uuesti siniseks.

3. Pärmis võib asendada kestast vabastatud hernelistega, mis on eelnevalt värvitud metüleensinise. (Kestades olevad parkained pidurdavad fermentide tegevust.) Kui täita katseklaas siniseks värvitud hernelistega ja sulgeda korgiga, siis muutuvad hernelised mõne tunni pärast värvusetuks. Öhuga kokku puutes aga muutuvad nad uuesti siniseks.

4. Taimetüvede dehüdrogenaaside aktiivsus on määratav ka kvantitatiivselt. Selleks purustatakse 1-2 g taimset materjali ja lisatakse 5 ml 0,87%-list K_2HPO_4 -lahust. Katseklaas paigutatakse termoregulaatoriga veevanni 37 °C temperatuuri. 15 minuti pärast lisatakse katseklaasi 1-1,5 ml metüleensinise lahust (1:20 000) ja segatakse. Hapniku juurdepääsu takistamiseks valatakse vedeliku pinnale vaseliinõli. Aeg, mis kulub vedeliku värvuse kadumiseks, näitab dehüdrogenaaside aktiivsust.

T ö ö 16

Monosahhariidide, disahhariidide, polüsahhariidide lahuste saamine ja nende omaduste uurimine

Vahendid

Porgand, kartulimugul, linnased, katseklaasid, kolvid, filterpaber, I + KI (1 g I + 2 g KI + 300 ml destilleeritud

vett), Fehlingi lahused I ja II, 10%-line NaOH-lahus, 6%-line CuSO_4 -lahus, kontsentreeritud H_2SO_4 ja kontsentreeritud HCl.

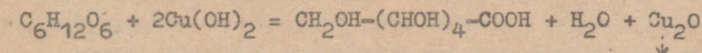
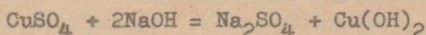
Töö käik

1. Glükoosilahuse saamiseks riivatakse porgand, võetakse 5 g riivitud massi ja asetatakse kolbi, lisatakse 20 ml vett, kuumutatakse ja filtreeritakse. Saadud filtraadiga tehakse Trommeri ja Molischi reaktsioon.

Trommeri reaktsioon.

5 ml filtraadile lisatakse 1 ml 10%-list NaOH- ja 1 ml 6%-list CuSO_4 -lahust. Tekkinud $\text{Cu}(\text{OH})_2$ algul lahustub ja lahus värvub siniseks. CuSO_4 lisatakse seni, kuni tekib vähe lahustumata $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Seejärel kuumutatakse lahust keemiseni.

Suhkur, võttes $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -lt ära hapniku, hapendub glükoonhappeks, vaskoksiid taandub alahapendiks, mis sadestub. See näitab glükoosi ja teiste redutseerunud ühendite olemasolu lahuses.



Molischi reaktsioon.

0,5 ml uuritavale lahusele lisatakse 1 tilk 10⁰-st α -naftoolalkohollahust ja siis 1 ml kontsentreeritud H_2SO_4 (väävelhapat tuleb valada ettevaatlikult, et lahused ei seguneks). Lahuste piirile ilmub punakasvioletne kiht. Loksutamisel värvub kogu lahus punakasvioletseks.

2. Sahharoosilahust saadakse suhkrupeedist. 10 g riivitud peedile lisatakse 30 ml vett ja segatakse. 20 minuti pärast segu filtreeritakse ja filtraadist võetakse kaks 10-ml-st proovi. Ühe prooviga tehakse otsekohe Fehlingi reaktsioon, teisele proovile lisatakse 2-3 tilka kontsentreeritud H_2SO_4 ja keedetakse 20 minuti jooksul veevannil (disahhariid laguneb monosahhariidiks). Seejärel neutraliseeritakse lahus soodaga ja tehakse Fehlingi reaktsioon.

Fehlingi reaktsioon tehakse järgmiselt. Katseklaasi võetakse 5 ml Fehlingi reaktiivi (2,5 ml Fehling I ja 2,5 ml Fehling II), lisatakse 2 ml uuritavat

lahust ja keedetakse. Taandavate suhkrute manulusel langeb välja punane sade (Cu_2O). Sademe hulka võrreldakse esimeses ja teises proovis.

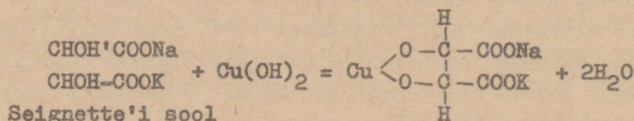
Fehlingi I reaktiivi koostis: 1 liitris destilleeritud vees lahustatud

80 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Fehlingi II reaktiivi koostis: 1 liitris destilleeritud vees lahustatud

400 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ja 300 g NaOH .

Lahuste segus tekivad $\text{Cu}(\text{OH})_2$, reageerides Seignette'i soolaga, annab selle vaskalkoholaadi:



Seignette'i soola vaskalkoholaat

3. Maltoosi saadakse linnastest. 20 g linnastele lisatakse 50 ml 30° -ni soojendatud vett, segatakse hoolikalt ja 20 minuti pärast filtreeritakse. Filtraadist võetakse proov ja tehakse Fehlingi reaktsioon. Maltoosil on vaba poolatsetaali rühm ja ta võib seepärast taandada Fehlingi lahust.

4. Tärklise saamiseks võetakse 1-2 puhastatud kartulimugulat ja riivitakse. Saadud massile lisatakse vett, kurnatakse läbi marli klaasi ja lastakse seista. Kui kogu tärklis on põhja langenud, valatakse vesi pealt ära. Seda korratakse seni, kuni põhja jääb puhas tärklis. See kuivatatakse aeglaselt ja tehakse järgmised proovid: a) 50 ml-le keemiseni kuumutatud veele lisatakse 1 g tärklist, mis on eelnevalt segatud 10 ml veega, liigutatakse klaaspulgaga ja kuumutatakse. Lahus muutub kliistriks. b) Külmale tärklisekliistrile lisatakse I + KI lahust. Kliister muutub siniseks. Kuumutamisel sinine värvus kaob, jahtumisel ilmub aga uuesti. c) Tärklise keetmisel kontsentreeritud HCl -s toimub tema hüdrolüütiline lagunemine, kusjuures lõpp-produktiks on glükoos. Viimast võib kontrollida Trommeri või Fehlingi reaktsiooniga.

Varuvalgud ja nende omaduste uurimine

Valgud jaotatakse lihtvalkudeks (proteiinid) ja liitvalkudeks (proteiidid). Varuvalgud on kõik lihtvalgud, mis koosnevad ainult aminohapete jääkidest. Varuvalgud jaotatakse nelja rühma:

1. Albumiinid - lahustuvad ainult vees.
2. Globuliinid - lahustuvad neutraalsoolade nõrkades lahustes.
3. Prolamiinid - lahustuvad 70°-ses alkoholis.
4. Gluteliinid - lahustuvad nõrkades leelistes.

Albumiine on taimedes väga vähe. Peamisteks varuvalkudeks taimedes on globuliinid, mida esineb eriti palju liblikõieliste taimede seemnetes.

Vahendid

Nisujahu, 70°-ne alkohol, 0,2%-line NaOH ja kontsenteeritud HNO_3 .

Töö käik

25 g nisujahu segatakse 12 ml veega. Saadud taigat pestakse seni, kuni vesi ei muutu enam häguseks ega anna joodireaktsiooni. See näitab, et tärklis on eemaldunud. Järele jääb pihkaine, mis sisaldab kahesuguseid valke: gliadiini (prolamiinide grupist) ja gluteliini.

Pihkaine jaotatakse kahte ossa. Üks osa lahustatakse 70°-ses alkoholis, teine osa 0,2%-lises NaOH-s.

Mõlemate proovidega tehakse valkudele kvalitatiivsed reaktsioonid.

B i u r e e d i r e a k t s i o o n. Võetakse 2-3 ml uuritava valgu lahust, millele lisatakse 1 ml 20%-list NaOH ja tilkhaaval 1%-list vaskvitriolilahust. Tekkiv $\text{Cu}(\text{OH})_2$ sade lahustub valgu manulusel ja värvib lahuse violetseks. Selle reaktsiooni annavad ühendid, mis sisaldavad $-\text{Co}-\text{NH}_2$ gruppi, seega kõik valgud.

K s a n t o p r o t e i i n i r e a k t s i o o n. Valgulahusele lisatakse kontsenteeritud HNO_3 , valk kalgestub. Sade ja lahus värvuvad kollaseks (kuumutamisel muutuvad heledamaks). Kui pärast jahtumist lisada ammoniagi vesilahust,

muutub kollane värvus oranžiks. See reaktsioon näitab valgumolekulis fenüülaniini, türosiini või trüptofaani olemasolu.

T ö ö 18

Taandavate suhkrute kvantitatiivne määramine

(Bertrand'i järgi)

Antud töö põhimõtte seisneb selles, et taandatud suhkrute manulusel tekib vask(II)oksiidi (CuO) keetmisel vask(I)oksiidi (Cu_2O) sade, mille hulk vastab uuritavale suhkruhulgale lahuses.

Vaskoksiidi sade pestakse ja lahustatakse raudsulfaadi lahuses. Seejuures taandub kolmevalentne raud kahevalentseks seks.

Taandatud raua kogus leitakse tiitrimisel KMnO_4 -lahusega. KMnO_4 tiiter omakorda leitakse oblikhappega või ammooniumoksaaladiga tiitrimisel.

Ammooniumoksalaadi molekulkaal on 142,1 ja see vastab kahele raua ja järelikult kahеле vase molekulile. Valemist

$$T = \frac{142 \cdot 0,8951}{35},$$

kus T on vase hulk milligrammides, mis vastab 1 ml KMnO_4 -le (s. o. 3,63 mg Cu),

0,8951 - koefitsient, mis saadakse $\frac{63,6 \cdot 2}{142,1}$,

63,6 on vase aatomkaal

ja ühele ammooniumoksalaadi molekulile, mille molekulkaal on 142,1, vastab kaks vase molekuli.

35 - kaaliumpermanganaadi tiiter.

Kaaliumpermanganaadi tiitri määramine

Võetakse 0,25 g ammooniumoksalaati väikesel uuriklaasil, asetatakse kaalutis koos klaasiga portselankaussi, lisatakse sinna veel 50 ml vett ja 1 ml kontsentreeritud H_2SO_4 . Segu soojendatakse veevannil 60-80 °C-ni ja tiitritakse permanga-

naadiga kuni mittekaduva roosa värvuseni. (Selleks kulub 35 ml 0,1 N KMnO_4 .)

Vahendid

Taimne materjal (taimelehed, suhkrupeet), KMnO_4 tiitrimislahus (5 g KMnO_4 lahustada 1 l vees), raudsulfaat, Fehlingi lahused I ja II (vt. töö 16), 100-200-ml-sed koonilised kolvid, klaasfiltrid, Bunseni kolb, Komovski pump, elektripliit, liivakell, pipetid.

(Raudsulfaadilahuse valmistamine: 50 g raudsulfaati lahustatakse 1 l destilleeritud vees, kuhu lisatakse eelnevalt 200 g väävelhapet erikaaluga 1,84. Seega on lahuse üldmaht 1 liiter).

Määramine.

100-150-ml-sse koonilisse kolbi viiakse pipetiga 20 ml uuritavat neutraalset suhkrulahust, mis sisaldab 50-80 mg suhkrut. Kui nõutav suhkrukogus esineb väiksemas hulgas lahuses, siis võetakse suhkrulahust vähem ja lahjendatakse veega 20 ml-ni. Suhkrulahusele lisatakse 40 ml värskest valmistatud Fehlingi lahust (enne lisada suhkrulahusele mõõtesilindriga 20 ml CuSO_4 -lahust ja selle järel 20 ml aluselise Seignette'i soola lahust). Lahused segatakse ja soojendatakse kiiresti kuni keemiseni. Esimeste mullide tekkimisest alates keedetakse lahust kolvis täpselt 3 minutit, kusjuures hoiduda liiga tormilisest keetmisest. (Aega loetakse 3 minutit liivakella järgi.)

Pärast keemist peab lahus olema sinine, mis näitab, et CuSO_4 on liias. Sinise värvuse puudumine tähendab, et oli võetud 100 mg-st rohkem suhkrut ja määrata tuleb sel juhul väiksema suhkrulahuse hulgaga. Lahust lahjendatakse veel.

Pärast keemise lõppemist eemaldatakse kolb tulelt ja lastakse tekkinud Cu_2O sademel põhja vajuda. Seejärel valatakse vedelik ettevaatlikult klaaspulga abil Bunseni kolvile asetatud filtrile. Valada lahust alati ühest kolviservast. Võimaluse korral püütakse Cu_2O sadet mitte filtrile valada, sest Cu_2O moodustab filtril tiheda kihi, mis lahustub halvasti. Pärast seda, kui sinine vedelik on filtreeritud, pestakse kolbi jäänud sade sooja destilleeritud veega, mis samuti valatakse filtrile. Vett mitte kõike kolvist ära valada, sest

õhuga kokku puutudes Cu_2O sade hapendub. Ka filtrile sattunud Cu_2O sadet mitte kuivaks jätta!

Veega pesemist korratakse, kuni pesuvesi ei anna lakmusega aluselist reaktsiooni, kusjuures hoolikalt pestakse filteri ja kolvi seinu. Pärast seda eemaldatakse imikolvil filter ja viiakse teisele puhtale imikolvile. Kolvis olevale Cu_2O sademele lisatakse selle lahustamiseks 5-10 ml raudsulfaadi $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ lahust, kusjuures loputatakse hoolikalt kolvi seinad ja lõpuks valatakse roheline lahus filtrile. Kolbi loputatakse veel 5-10 ml raudsulfaadilahusega ja valatakse see jälle filtrile. Filtril olev vedelik imetakse imikolbi. Tuleb jälgida, et Cu_2O sade täielikult lahustuks.

Kui kolb ja filtri seinad on loputatud lahusega, pestakse kolbi ja filtrit hoolikalt keedetud külma veega (loputada enne kolbi ja seejärel filtrit), kuni pesuvesi ei anna lakmusega happelist reaktsiooni. Kui kogu lahustunud Cu_2O on kogutud imikolbi, tiitritakse tekkinud raudoksiid permanganaadiga, kuni vedeliku roheline värvus läheb üle püsivaks roosaks värvuseks. Kogu määramine võib kesta 15-20 minutit.

Tiitrimiseks kulunud permanganaadi milliliitrite põhjal arvutatakse välja talle vastav Cu hulk milligrammides ja tabeli järgi otsitakse võetud proovis leiduva suhkru hulk milligrammides (tabel on töö lõpus).

Näide. Tiitrimiseks kulus 7,35 ml KMnO_4 lahust. Sellele lahuse hulga vastab $7,35 \cdot 3,63 = 26,6$ mg Cu.

Tabelist leiame, et

26,3 mg Cu-le vastab 13 mg glükoosi

28,3 mg Cu-le vastab 14 mg glükoosi

2,0 mg Cu-le vastab 1 mg glükoosi

0,3 mg Cu-le vastab x mg glükoosi

$$x = \frac{1 \cdot 0,3}{2} = 0,15 \text{ mg glükoosi}$$

$$13 + 0,15 = 13,15 \text{ mg glükoosi}$$

Arvestuses saadud Cu milligrammide arv erineb tabelis esinevast lähemast väiksemast arvust $26,6 - 26,3 = 0,3$ võrra.

Tabel subkrute määramiseks Bertrandi järgi
(invertsubkrud)

Suhkur	Vask	Suhkur	Vask	Suhkur	Vask	Suhkur	Vask	Suhkur	Vask	Suhkur	Vask
milligrammides											
10	20,6	28	55,5	46	88,3	64	119,2	82	148,5		
11	22,6	29	57,4	47	90,1	65	120,9	83	150,0		
12	24,6	30	59,3	48	91,9	66	122,6	84	151,6		
13	26,5	31	51,1	49	93,6	67	124,2	85	153,2		
14	28,5	32	63,0	50	95,4	68	125,9	86	154,8		
15	30,5	33	64,8	51	97,1	69	127,5	87	156,4		
16	32,5	34	66,7	52	98,8	70	129,2	88	157,9		
17	34,5	35	68,5	53	100,6	71	130,8	89	159,5		
18	36,4	36	70,3	54	102,4	72	132,4	90	161,1		
19	38,4	37	72,2	55	104,0	73	134,0	91	162,6		
20	40,4	38	74,0	56	105,7	74	135,6	92	164,2		
21	42,3	39	75,9	57	107,4	75	137,2	93	165,7		
22	44,2	40	77,7	58	109,2	76	138,9	94	167,3		
23	46,1	41	79,5	59	110,9	77	140,5	95	168,8		
24	48,0	42	81,2	60	112,6	78	142,1	96	170,3		
25	49,8	43	83,0	61	114,3	79	143,7	97	171,9		
26	51,7	44	84,8	62	115,8	80	145,3	98	173,4		
27	53,6	45	86,5	63	117,6	81	146,9	99	175,0		
								100	176,5		

milligrammides

[illegible]

milligrammides

Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask	Subkur	Vask
10	11,2	28	31,1	46	50,6	64	70,0	82	89,4						
11	12,3	29	32,2	47	51,7	65	71,1	83	90,4						
12	13,4	30	33,3	48	52,8	66	72,2	84	91,5						
13	14,5	31	34,4	49	53,9	67	73,3	85	92,6						
14	15,6	32	35,5	50	55,0	68	74,3	86	93,7						
15	16,7	33	36,5	51	56,1	69	75,4	87	94,8						
16	17,8	34	37,6	52	57,1	70	76,5	88	95,8						
17	18,9	35	38,7	53	58,2	71	77,6	89	96,9						
18	20,0	36	39,8	54	59,3	72	78,6	90	98,0						
19	21,1	37	40,9	55	60,3	73	79,6	91	99,0						
20	22,2	38	41,9	56	61,4	74	80,8	92	100,1						
21	23,3	39	43,0	57	62,5	75	81,8	93	101,1						
22	24,4	40	44,1	58	63,5	76	82,9	94	102,2						
23	25,5	41	45,2	59	64,6	77	84,0	95	103,2						
24	26,6	42	46,3	60	65,7	78	85,1	96	104,2						
25	27,7	43	47,4	61	66,8	79	86,1	97	105,3						
26	28,9	44	48,5	62	67,9	80	87,2	98	106,3						
27	30,0	45	49,5	63	68,9	81	88,3	99	107,4						
								100	108,4						

Mono- ja disahhariidide määramine taimelehtedes

Analüütilistel kaaludel kaalutakse kaalukaussis 3-5 g õhukuiva (läbi 0,5-mm-ste avadega sõela lastud) taimset materjali.

Samal ajal kaalutakse materjalis esineva niiskuse määramiseks teine 2-3-grammine proov ja asetatakse lahtise kaalukaussiga 100-105 °C temperatuuriga termostaati (vt. niiskuse määramine, töö 24).

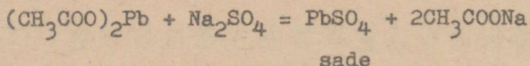
Suhkrute määramiseks kaalutud kogus viiakse ettevaatlikult lehtri abil 100-ml-sse mõõtekolbi. Lisatakse kuni märgini 40-kraadist destilleeritud vett. Suhkrute väljutamiseks asetatakse mõõtekolb 50-60 minutiks 40-45 °C veevannile (või termostaati).

Seejärel filtreeritakse vedelik läbi kurdfiltrit puhtasse keeduklaasi. Võetakse 70 ml filtraati ja viiakse uude 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse soojale filtraadile tilkhaaval juurde 10%-list neutraalset või aluselist pliiatsetaadilahust, kuni ei teki sadet (pliiatsetaati ei kulu tavaliselt üle 3-5 ml).

Vedelikku lastakse veidi aega seista ja võetakse valkude jt. määramist segavate ainete täieliku eraldumise kontrollimiseks proov uuriklaasile (2-3 tilka vedelikku). Proovile lisatakse juurde 1 tilk pliiatsetaati ja jälgitakse selle häguseks muutumist.

Sadestumise täielikkust võib ka kontrollida, kui lastakse ettevaatlikult mööda kolvi seina alla voolata 1 tilk pliiatsetaadilahust. Kui sademe peal asuv vedelikukiht ei muutu häguseks, siis võib lugeda sadestumine lõppenuks. Vastasel juhul tuleb veel lisada pliiatsetaati.

Seejärel täidetakse mõõtekolb destilleeritud veega kriipsuni ja filtreeritakse läbi kuiva filtrit. Võetakse 70 ml filtraati teise 100-ml-sse mõõtekolbi ja eemaldatakse Pb liig 10%-lise Na₂SO₄ abil (lisada tilkhaaval).



Töö juures märkida üles kulutatud pliiatsetaat ja Na_2SO_4 milliliitrite arv.

Pärast seda lisada vett kriipsuni ja filtreerida läbi kuiva filtri.

Filtraadist määratakse monosahhariidid (glükoos, fruktoos) ja disahhariididest sahharoos.

Sahharoos hüdroolüüsib happes ja tekib invertsuhkur, s. o. monosahhariidide segu.

A. Glükoosi määramine

20 ml filtraati pannakse 150 ml Erlenmeyer'i kolbi. Sinna lisatakse 20 ml CuSO_4 -lahust (Fehlingi lahus I) ja 20 ml Seignette'i soola lahust (Fehlingi lahus II) ja määratakse taandavad suhkrud Bertrand'i järgi.

Sellisel määramisel leitakse vahenditult taandavate suhkrute hulk (a).

B. Sahharoosi määramine

Disahhariidid kõigepealt hüdroolüüsitakse.

20 ml filtraati asetatakse 50-ml-sse mõõtekolbi, lisatakse 2,2 ml 20%-list HCl ja kuumutatakse veevannil 70°C temperatuuril 5 minutit (aega hakatakse lugema sellest momendist, kui kolvis oleva lahuse temperatuur on tõusnud 70° -ni).

Pärast hüdroolüüsi neutraliseeritakse lahus kolvis Na_2CO_3 -ga (soodast lisada väikeste portsjonitena, et kihisev vedelik kolvist välja ei viskuks). Seejärel lisatakse vett märgini, loksutatakse hästi ja võetakse 20 ml lahust määramiseks (Bertrand'i järgi).

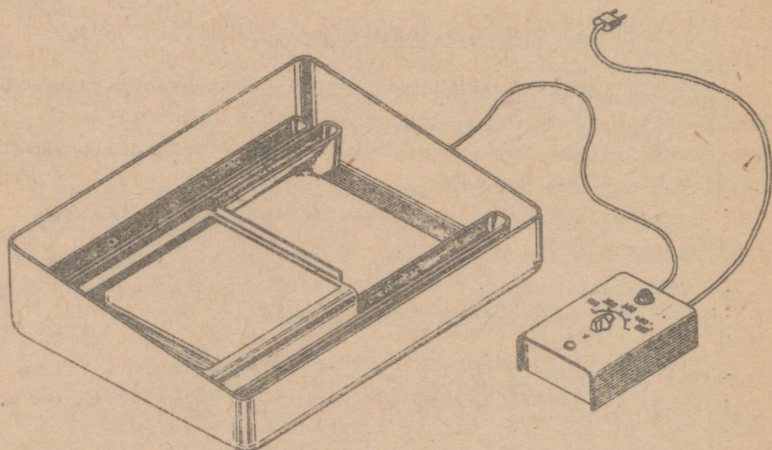
Sahharoosi hulga leidmiseks lahutatakse saadud suhkrute hulgast (b) hulk (a) ja vahe korrutatakse koefitsiendiga 0,95.

sahharoos = $(b - a) \cdot 0,95$, sest

$$\frac{\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = \frac{342}{360} = 0,95.$$

Paberelektroforeesikamber

Kambrit kasutatakse valkude ja teiste liitühendite elektroforeetiliseks eraldamiseks paberil. Viimasel ajal on NSV Liidu uurimisasutustes tunnustuseosaliseks saanud Tartu Riiklikus Ülikoolis konstrueeritud paberelektroforeesikamber (joon. 3).



Joon. 3. Elektroforeesiaparaat.

Selle kambri põhiliseks osaks on neljakandiline kast mõõtetega 410 x 310 x 85 mm. Kamber valmistatakse viniplastilehest. Selle servades paiknevad süvendid puhverlahuste vannide jaoks. Puhverlahuste vannid on kastist eraldi. Need pannakse kasti vastaskülgede süvendisse paarikaupa.

Et puhverlahuste vannide süvendid asuvad piki kasti kõiki külgi, on võimalik tööks kasutada kahesuguse pikkusega paberlinte: kasti pikkuses 280 mm või kasti laiuses 180 mm pikkusi linte. Elektroforeetiline paber asub vastaval raamil, millega koos see võetakse ka kambrist välja. Paberiribade komplekt koosneb neljast raamist, 2 pikuti ja 2 pööki töötamiseks.

Elektroodina kasutatakse kambriks plaatinatraati (ϕ 0,3 mm). Kamber on suletav 5 mm paksusest klaasist kaanega. Et

vältida kondenseeruva vee tilkade langemist paberlintidele, asub kaas kaldu 6^o-se nurga all. Aparaadiga töötamisel kasutatakse 220-voldist vahelduvvoolu.

Aminohapete määramine elektroforeesil

Elektroforees kiirendab aminohapete adsorbeerumist spetsiaalsel filterpaberil (kromatograafilisel paberil). Meetod põhineb aminohapete liikumisel püsivvoolu elektriväljas. Sõltuvalt aminohapete ja teiste lämmastikainete laengust liiguvad nad anoodile või katoodile. Anioonid, mis on negatiivse laenguga (näiteks dikarboksüülhapped), liiguvad positiivsele elektroodile. Katioonid, mis on positiivse laenguga (aluselised ja neutraalsed aminohapped), liiguvad negatiivsele elektroodile. Elektrivälja mõjul kiireneb elektrolüütide liikumine kromatograafilisele paberile.

Vahendid

8 N soolhappelahus, atsetaatpuhver (pH 3,8): 1760 ml 0,5 N äädikhapet ja 240 ml 0,5 N äädikhappenaatriumi, puhvri pH kontrollitakse potentsiomeetriga, 0,1%-line ninhüdroiinlahus (lahustiks butüülalkohol, etüülalkohol, filterpaber (kromatograafiline paber), elektroforeesikamber.

Töö käik

Elektroforeetilisel määramisel kasutatakse kahte nõu, mille vahele pannakse kahe klaaskaanega kamber pikkusega 230 mm. Puhverlahuse nivoo nõudes tehakse kindlaks sifooni abil. Filterpaberi riba asetatakse kahe klaaskaane vahele, mille sügavus on umbes 2-3 mm. Paber asetseb nii, et see ei puuduta kambri seinu. Paberi ääred vajutatakse kinni kaane servadele ja tema ots lastakse 15-20 mm sügavuselt puhverlahusesse. Nõusse lastakse 2 söoelektroodi - katood ja anood. Elektroforeesiks vajalik vool on 270-300 volti.

Kaalutakse 3 kaalutist, igaüks 25 g, ja asetatakse need 300-ml-sse Erlenmeyeri kolbi. Igasse kolbi valatakse 100 g 8 N HCl-lahust ja segatakse. Kolb koos sisuga kaalutakse, sulletakse korgiga, millel on tagasivoolujahuti, ja pannakse 8 tunniks veevannile keema. Pärast hüdrolüüsi jahutatakse kolvi

sisu voolavas vees ja kolbi lisatakse destilleeritud vett endise kaaluni. Hüdrolüsaat filtreeritakse läbi klaasfiltri, et eraldada humiinaaine sade. Filtraati kasutatakse elektroforeesisimisel.

Selleks võetakse filterpaberi riba (70 x 320 mm), mis jaotatakse tavalise pliatsijoonega pikuti kaheks osaks. Põiki paberit tõmmatakse samuti joon, mis on 140 mm anoodist ja 180 mm katoodist kaugel. Sellele joonele kantakse filtraadi kaks proovi 7,5-10 ml/l kaupa kahe sümmeetrilise triibuna pikuti jaotatud lehe mõlemale poolele. Pärast proovi kandmist paberile see kuivatatakse õhus, jäetakse ööks laboratooriumi lauale (soolhape aurub); seejärel niisutatakse paberi mõlemad otsad puhverlahusega pH 3,8. Kuivaks jäetakse ainult proovi koht, edaspidi see märgub lahusega tänu paberi kapillaarsusele.

Paber pannakse elektroforeesiaparaadi kambrisse nii, et tema äär pikuti ei ulatu üle kambri ääre, kuid on vajutatud klaaside vahele. Paberi otsad on 15-20 mm puhverlahuses.

Elektroforees kestab 2 tundi. Aminohapped paberil liiguvad järgmises järjekorras: dikarboksüülhapped liiguvad anoodile (asparagiinhappe edasiliikumine on kiirem kui glutamiinhappel), neutraalsed ja aluselised (monoaminokarboksüül- ja diaminokarboksüülhapped) - katoodile.

Elektroforeesi lõpus kuivatatakse elektroforeogramm termostaadis (90-100 °C). Kuivatamine toimub kiiresti (5 minuti jooksul). Paber peab olema veidi niiske, vastasel juhul ei ole laigud küllalt kontrastsed. Ülekuivatamisel muutub paber kollaseks ja värvilised laigud on nõrgad.

Elektroforeogramm kuivatatakse ettevaatlikult, pritsitakse pulverisaatorist 0,1%-lise ninhüdroiinilahusega. Elektroforeogramm hoitakse termostaadis violetsete laikude ilmumiseni. Ülekuivamisel muutuvad laigud värvituks.

Laigud ümbritsetakse hariliku pliatsi joonega ja lõigatakse välja. Nad pannakse 10-ml-sse mõõtekolbi. Seejärel lisatakse 3 ml 0,1%-list ninhüdroiini ja keedetakse veevannil. 10 minutit. Lahus jahutatakse, lisatakse 10 ml etüülalkoholi ja kolorimeetreeritakse. Paralleelselt tehakse kontrollkatse ilma aminohappeta.

Lahuse värvuse intensiivsuse järgi määratakse aminohap-

peid, näiteks glutamiinhappesisaldust:

$$g = 0,24 D,$$

kus g - glutamiinhappe hulk mg-des,

D - värvilahuse optiline tihedus butanoolis või atsetoonis (küvett 20 mm) rohelisel valgusel.

Glutamiinhappe hulk (mg%) määratakse järgniselt:

$$G = \frac{0,24D \cdot 100 \cdot 125}{V \cdot 25}, \text{ kus}$$

V - hüdrolüsaadi hulk $\mu\text{ml/l}$, mis kanti elektroforegrammile,

125 - hüdrolüsaadi hulk g-des,

25 - materjali kaal g-des.

T ö ö 21

Askorbiinhappe (C-vitamiini) määramine

Vahendid

Portselanuhmer, klaaspulk, lehter, 100-ml-ne mõõtekolb, 50-ml-sed kolvid, pipetid, bürett, 1%-line HCl, 2%-line metafosforhape, 0,001 N 2,6-dikloorfenoolindofenool.

Töö käik

Uuritava materjali kaalutis (5-10 g) valatakse uhmris üle 20 ml 1%-lise soolhappega ja peenestatakse kuni homogeense massini.

Mass valatakse uhmrist klaaspulga ja -lehtri abil 100-ml-sse mõõtekolbi. Uhmer loputatakse mõned korrad 2%-lise metafosforhappega, mis valatakse samasse mõõtekolbi. Kolb täidetakse margini 2%-lise metafosforhappega, suletakse korkiga, loksutatakse tugevasti ja lastakse 5 minutit seista. Siis osa (umbes 50 ml) kolvi sisust filtreeritakse kuiva kolbi.

Saadud filtraadist võtame pipetiga kaks 10-ml-st proovi ja tiitrimine neid 0,001 N värvilahusega (2,6-dikloorfenoolindofenool) mikrobüretist, kuni ilmub roosa värvus, mis ei kao 0,5-1 minuti jooksul.

Arvutamine

Askorbiinhappe hulk väljendatakse milligrammides 100 g

uuritava materjali kohta (mg %). Arvutatakse järgmise valemi abil:

$$x = \frac{100 \cdot a \cdot TV}{b \cdot g} \text{ mg } \%,$$

kus a on värvilahuse ml-te arv,

T - värvilahuse mg-tiiter askorbiinhappe kohta,

V - kogu ekstrakti hulk,

b - tiitrimiseks võetud ekstrakti hulk ml-tes,

g - uuritava materjali kaal g-des.

Tiitri (T) määramiseks kaalutakse analüütilistel kaaludel 0,107 g askorbiinhapet ja lahustatakse 100-ml-ses mõõtekolvis destilleeritud vees.

Järgnevalt võetakse pipetiga 10 ml sellest lahusest, pannakse teise 100-ml-sse mõõtekolbi ja lisatakse juurde 2%-list metafosforhapet määrgini. Tiitrimiseks võetakse siit 10 ml lahust. Tiitritakse 2,6-dikloorfenoolindofenooliga roosa värvuse tekkimiseni. Kuna on teada, et 100 ml vees on 0,107 g askorbiinhapet, siis 10 ml vees on 0,0107 g askorbiinhapet. Tiitrimiseks võetud hulgas on askorbiinhapet veel 10 korda vähem, s. o. 0,00107 g ehk 1,07 mg.

Näide:

1,07 mg askorbiinhappele vastab 10 ml värvilahust
x " 1 ml

$$x = \frac{1,07 \cdot 1}{10} = 0,107 \text{ mg},$$

s. o. 1 ml värvilahusele vastab 0,107 mg askorbiinhapet.

C-vitamiini määramise meetod põhineb C-vitamiini redutseerivatel omadustel: 0,001 N indikaatori (2,6-dikloorfenoolindofenool) sinine värvus taandatakse askorbiinhapet sisaldavate taimeekstraktide mõjul värvusetuks (Tillmansi reaktsioon).

T ö ö 22

Tärglise määramine polarimeetriliselt

Vahendid

Tärglis, 1%-line soolhape, veevann, 10%-line fosforvõlframhape, filterpaber, aktiivsüsi, polarimeeter.

Valgust, mis lainetab ühes tasapinnas, nimetatakse polariseerituks. Polariseeritud valguse tasapinda nimetatakse polarisatsioonitasapinnaks. Mõningatel ainetel on võime pöörata polarisatsioonitasapinda. Niisuguseid aineid nimetatakse optiliselt aktiivseteks. Polarisatsioonitasapindade pöördumine võib olla paremale või vasakule.

Optiliste ainete aktiivsus määratakse polarimeetriga, mille põhilisteks osadeks on kaks islandi paost spetsiaalselt töödeldud prisma. Üks prismadest on polarisaatoriks, teine analüsaatoriks. Kui polarisaatori ja analüsaatori löikepinnad ühtivad, siis polarimeetri vaateväli on valgustatud polariseeritud valgusega.

Kui polarisaatori ja analüsaatori vahele asetada optiliselt aktiivse aine kiht, siis pöörab see polarisatsioonitasapinda ja vaateväli muutub tumedaks. Et endist seisu taastada, on vaja analüsaatorit pöörata sellesama nurga võrra, mille võrra lahus tasapinna kõrvale pööras. See pöördenurk loetakse skaalalt. See on uuritava lahuse polarisatsioonitasapinna pöördenurk, mis oleneb lahuse kontsentratsioonist.

Aine tihedus avaldab pöördenurgale mõju, seepärast väljendatakse pööramisvõimet pöördumisnurga suhtega aine tihedusse. Seda suhet nimetatakse eripööranguks ja tähistatakse määrgiga α . Teatud katsetingimustes on eripöörang täiesti konstantne antud optilise aine jaoks. Optiline aktiivsus suhkrutel on põhjustatud asümmeetrilistest süsinikuaatomitest.

Polarisatsioonitasapinna pöördenurk sõltub valguslaine pikkusest ja temperatuurist.

Enne aine polarisatsiooni määramist on vaja määrata nullpunkt. Selleks valatakse polarimeetri torusse destilleeritud vett. Polarimeeter pannakse pimedasse ruumi ja nullpunkt määratakse harilikul toatemperatuuril. Pöörates analüsaatorit vasakule või paremale otsitakse koht, kus vaateväli on võimalikult ühtlaselt valgustatud. Märgitakse üles seis. Selliseid määramisi tehakse 5 korda ja arvutatakse aritmeetiline keskmine. Kasutada noonist! Siis võetakse polarisatsioonitoru ühest otsast seib, täidetakse toru uuritava lahusega kuni ääreni nii, et klaasid toru otstes oleksid puhtad ja läbipaistvad. Nüüd pannakse toru polarimeetrisse ja tehakse kindlaks uuritava lahuse pöördenurk.

Tärgklise polarimeetrilise määramise põhimõte seisneb
 tärgklise hüdrolüüsis soolhappega ja lahuse pöördenuaga kind-
 laksmääramises polarimeetriga. Tärgklise hüdrolüüsi-
 produktide eripööranag sõltub hüdrolüüsi tingimustest. Tinglikult tähis-
 tatakse eripööranagu $[\alpha]_D^{20}$ ja see on eri kultuuridel eri-
 589,3

nev. Nisul on see 182,7, kartulil 195,4, odral 181,5 jne.

Töö kõik

Võetakse 5 g tärgklis ja pannakse kolbi (100-ml-ne mõõte-
 kolb). Valatakse peale 25 ml 1%-list soolhapet ja segatakse
 hästi. Pärast seda lisatakse veel 25 ml sama hapet, pestakse
 seintelt prooviosakesed ära ja asetatakse veevannile 15 minu-
 tiks keema. Vesi peab veevannil ägedalt keema. 3-5 minuti
 jooksul segatakse pidevalt. Alguses ekstrakt kliisterdub. Pär-
 rast keetmist valatakse peale 30 ml vett ja lastakse jahtuda.
 Seejärel lisatakse 5 ml 10%-list fosforvolframhapet ja vett
 kuni määrgini. Vähe aja pärast filtreeritakse ekstrakt läbi
 kuiva kurdfiltril kuiva kolbi. Kui lahus on värviline (harili-
 kult kartuli puhul), siis tuleb uuesti filtreerida läbi ak-
 tiivsoe. Lääbipaistev värvitu filtraat valatakse polarisatsi-
 onitorusse ja määragatakse pöördenuak.

Tulemused arvutatakse järgmise valemi kohaselt:

$$\text{Tärgklise \%} = \frac{100 a \cdot 100}{[\alpha] \cdot L \cdot K} ,$$

kus a = pöördenuak,

$[\alpha]$ = antud kultuuri eripööranag,

L = polarisaatori toru pikkus dm-tes,

K = proovi suurus g-des.

T ö ö 23

Taimse materjali tuhaatamine ja mikrokeemiline analüüs

Taimede tuhasisalduse määramine põhineb taimse materjali
 põletamisel vaba õhu juurdepääsul. Põlemisel lenduvad süsi-
 nik, vesinik, lämmastik ja osaliselt ka hapnik. Jäävad ainult
 mineraalained hapendite kujul.

Põlemise kiirendamiseks lisatakse taimsele materjalile mõnda hapendajat, näiteks ammooniumnitraati (NH_4NO_3), lämmastikhapet (HNO_3) või vesinikülihapendit (H_2O_2).

Taimede keemilise koostise selgitamiseks tuleb määrata üldine tuha hulk ja üksikud elemendid.

Õhukuiva materjali tuhastamiseks tuleb see peenestada (mitte väga peeneks) ja kaaluda analüütilistel kaaludel portselankaasis või tiiglis.

Kaalutud materjal asetatakse tiigliga muhvelahju, kusjuures ahju uks jäetakse lahti. Hoitakse ahjus 25-30 minutit, kuni ei tule enam suitsu ning materjal on söestunud. Pärast seda võetakse tiigel ahjust välja ja lastakse õhu käes jahtuda.

Pärast jahtumist viiakse tiiglisse 5-8 tilka kontsentreeritud lämmastikhapet, vesinikülihapendit või 10%-list ammooniumnitraati.

Tiiglid asetatakse uuesti muhvelahju, mis on kuumutatud 80-100°C. Ahju kuumutatakse edasi niikaua, kuni ta hakkab hõõguma. Hõõguvas ahjus hoitakse materjali 25-30 minutit. Kui tuhastamine pole lõpuni jõudnud, lisatakse pärast jahtumist veel kord hapendajat ja tiigel asetatakse uuesti muhvelahju.

Lehtede, varte ja üldse rohtse materjali tuhastamisel lisatakse kaalutisele 5 ml alkoholi, mis süüdatakse põlema. Kui leek on kustunud, asetatakse tiigel muhvelahju ja tuhastatakse nii, nagu eespool kirjeldatud. Saadud tuhast võib määrata üksikuid elemente.

Vahendid

Taimetuhk, mikroskoop, alusklaasid, peenikesed klaaskapillaarid, katseklaasid, väiksed lehtrid, klaaspulgad, filterpaber, lakmuspaber, destilleeritud vesi ja reaktiivid (mis on kõik 1%-lised): PtCl_4 , H_2SO_4 , Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (lahustatud 15%-lises HNO_3 -s), $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$, Ti_2SO_4 või AgNO_3 , 10%-line HCl .

Töö käik

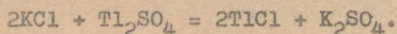
Antud meetodiga võib tuha analüüsi teha väga vähese tuhaga.

Katseklaasidesse valmistatakse 2 tuhalahust:

1) vees, 2) 10%-lises soolhappes.

2 ml lahusti kohta võetakse $1/4 \text{ sm}^3$ tuhka, saadud lahused filtreeritakse. Kõik reaktsioonid tehakse alusklaasil. Peenikese klaaspulga abil viiakse alusklaasile väikesed tilgad uuritavat lahust ja reaktiivi, 5 mm kaugusele teineteisest. Puhta klaaskapillaari abil ühendatakse tilgad omavahel kaarekujulise kanalikesega. Ühinemise kohal toimub reaktsioon, kanalikese äärtel aga reaktsiooniproduktide kiire kristallisatsioon. Kristallilist sadet vaadeldakse mikroskoobis.

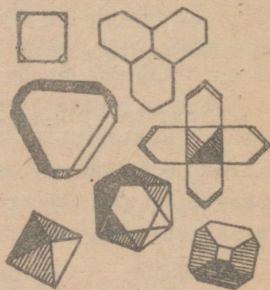
Tuha vesilahuses saab määrata vees lahustuvaid kloriide. Reaktiiviks kloriididele on talliumsulfaat. Reaktsioon toimub järgmiselt:



Talliumkloriid sadeneb mõõga- või ristikujuliste kristallidena, mis on värvuselt mustad (see on tingitud kiirte tugevast murdumisest) (joon. 4).



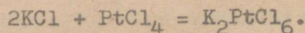
Joon. 4. Talliumkloriidi kristallid.



Joon. 5. Kaaliumkloorplatinaadi kristallid.

Tuha soolhappelises lahuses määratakse kaalium, kaltsium, magneesium, fosfor, väävel ja raud.

Kaalium määratakse PtCl_4 abil:

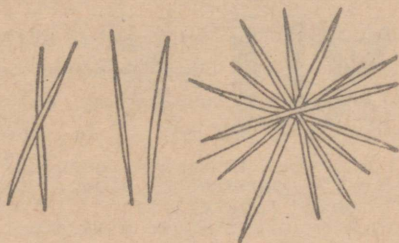


Saadud kaaliumkloorplatinaat kristalliseerub välja kollakasrohelistest ja teiste korrapärase süsteemide kombinatsioonide näol (joon. 5).

Kaltsium määratakse 1%-lise väävelhappega:

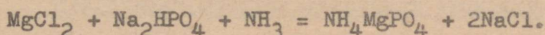


Sadenevad nõelakujulised kipsikristallide kimbud (joon.6).



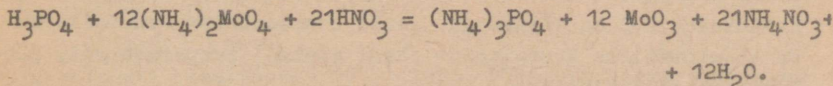
Joon. 6. Kipsikristallid.

Magneesiumi määramiseks tuleb tilk uuritavat lahust neutraliseerida ammooniumiga. Reaktiiviks on 1%-line naatriumfosfaat.

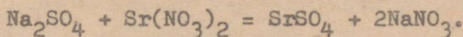


Tekivad kastikeste- või tähekestekujulised kristallid (joon. 7).

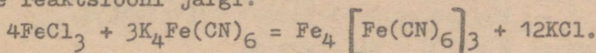
Fosfori määramiseks kasutatakse ammooniummolübdaati. Saadakse rohekaskollane kristalliline sade (joon. 8), mis muutub järjest rohelisemaks. Reaktsioon toimub järgmiselt:

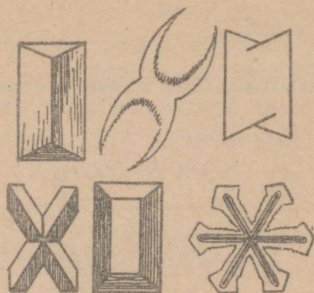


Väävliit vaadeldakse 1%-lise strontsiumnitraadi lisamisel. Moodustuvad peenikesed ümardunud kristallid:

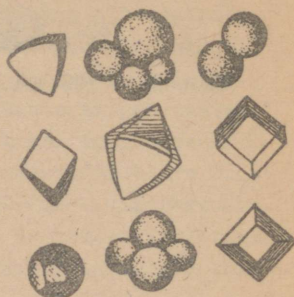


Raua avastamiseks kasutatakse värvilist reaktsiooni 1%-lise kollase veresoola lahusega. Moodustub berliini sinine järgmise reaktsiooni järgi:





Joon. 7. Magneesiumi sisaldavad kristallid.



Joon. 8. Fosforit sisaldavad kristallid.

Reaktsiooni jälgitakse portselanplaadil ilma mikroskoobita.

T ö ö 24

Niiskuse määramine taimses materjalis

Analüütilistel kaaludel kaalutakse kaanega varustatud kaaluklaasis 2-3 g (toore materjali puhul on kaalutis suurem) õhukuiva taimset materjali. Proov asetatakse avatud kaaluklaasiga 3-4 tunniks 100-105 °C temperatuuriga termostaati. Pärast selle aja möödumist suletakse termostaadist väljavõetud kaaluklaas kaanega, lastakse 20-30 minutit eksikaatoris jahtuda ja kaalutakse 0,2 mg täpsusega. Kaalu konstantsust kontrollitakse 45-minutilise kuumutamise järel endisel temperatuuril, jahtumisega ja kaalumisega.

Kaal loetakse konstantseks, kui kahe viimase kaalumise vahe ei ületa 0,5-1 mg.

Niiskuseprotsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$x = \frac{100 (a - b)}{a},$$

kus x on niiskuseprotsent,

a - kaalutise kaal enne kuivatamist,

b - kaalutise kaal pärast kuivatamist.

Kuivaine % = 100 - niiskuse %.

Valgu histokeemiline analüüs lehtedesVahendid

Taimelhed, alkohol, 10%-line NaOH, 5%-line CuSO_4 , kontsentreeritud HNO_3 ja kontsentreeritud NH_4OH .

Töö käik

Lehed pannakse 1-3 minutiks keevasse vette. Edasi asetatakse nad kolbi ja valatakse peale 96°-st alkoholi. Kolb varustatakse tagasivoolujahutiga ja pannakse klorofüllü eks-
traheerimiseks keevasse veevanni. Poole või ühe tunni jooksul muutuvad lehed värvusetuks. Lehtedest ekstraheeruvad peale klorofüllü välja veel kristalliseerunud suhkrud, vabad amino-
happed ja albumiinid. Lehti leotatakse väheses destilleeritud vees ja laotatakse Petri tassidesse. Pärast seda tehakse reakt-
sioonid valkudele.

1. B i u r e e d i r e a k t s i o o n. Lehed pannakse 1 tunniks 5%-lisse CuSO_4 -lahusesse ja hiljem pestakse destil-
leeritud veega ning valatakse peale 10%-list NaOH. Lehed muu-
tuvad mustjaslillaks. See osutab valkude ja teiste peptiid-
sidemetega ühendite olemasolule lehtedes.

2. K s a n t o p r o t e i i n i r e a k t s i o o n.
Lehtedele valatakse kontsentreeritud HNO_3 . 15-30 minuti jook-
sul värvuvad lehed kollaseks. Selle reaktsiooni annavad kõik
valgud peale prolamiinide. NH_4OH lisamisel läheb kollane vär-
vus üle roosaks. Pärast seda valatakse NH_4OH ära. Katse teos-
tada tõmbekapis!

3. M i l l o n' i r e a k t s i o o n. Lehti hoitakse
Millon'i reaktiivis 0,5-1 tund. (Võib ka keeta paar minu-
tit.) Lehed värvuvad lihapunaseks, mis näitab türosiini sisal-
davate valkude olemasolu lehtedes.

Saadud värvuste intensiivsust võib määrata 5-pallilise
skaala järgi. See võimaldab meetodit kasutada füsioloogilis-
tes uurimustes.

M i l l o n' i r e a k t i i v. Lahustatakse üks kaalu-
osa Hg ühes kaaluosas kontsentreeritud HNO_3 -s (teisiti: 1 cm^3
Hg 9 cm^3 -s kontsentreeritud HNO_3 -s). Segu soojendatakse Hg
täieliku kadumiseni. Siis lisatakse kaks mahuosa vett.

Valkude määramine hernestesVahendid

Hernejahu, kolvid, filterpaber, lehtrid, katseklaasid, pipetid, 10%-line $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vesilahus, nõrk NaCl vesilahus, ammooniumsulfaat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, kontsentreeritud HNO_3 , HCl ja H_2SO_4 .

Töö käik

3-4 grammile hernejahule lisatakse 20-30 ml 10%-list $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kolb suletakse korgiga, loksutatakse 3-5 minutit ja jäetakse seisma. Hernes sisalduv valk lahustub 30 minuti pärast. Lahus filtreeritakse läbi kurdfiltrit, mis on eelnevalt niisutatud sama soola lahusega. Kui filtraat on algul hägune, valatakse ta filtrile tagasi. Valgulahusele tehakse järgmised reaktsioonid.

1. Globuliinid ei lahustu vees. Selle tõestamiseks valatakse katseklaasi 1 ml valgulahust ja lisatakse paar milliliitrit vett. Lahus muutub häguseks, sest globuliinid sadestuvad välja. Nõrga $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - või NaCl-lahuse lisamisel sade kaob ja lahus muutub uuesti selgeks.

2. Tugeva kontsentratsiooniga neutraalsoolade lahustes sadestuvad valgud välja.

Katseklaasi valatakse 2-3 ml valgulahust ja lisatakse $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kontsentreeritud lahust või kuiva soola. Kui lahuse kontsentratsioon on üle 50%, siis hakkab globuliin sadestuma. Kui lahusele lisatakse vett, siis kontsentratsioon väheneb, globuliinid lahustuvad ja sade kaob.

3. Keetmisel või kontsentreeritud hapete (HNO_3 , HCl, H_2SO_4) mõjul toimub valkude denatureerimine. Katseklaasi valatakse 2-3 ml valgulahust ja kuumutatakse keemiseni. Tekib sade, mis ei lahustu neutraalsoolade nõrkades lahustes. Kui valgulahusele lisatakse kontsentreeritud hapet, tekib sade (ilma keetmata), mis samuti on nõrkades soolade vesilahustes lahustumatu.

4. Globuliinilahusele tehakse biureedi- ja ksantoproteiniireaktsioon (vt. töö 25).

Varuainete histokeemiline analüüsVahendid

Kõrreliste terised, liblikõieliste, riitsinuse-, kanepi-, lina-, päevalilleseemned, kartulimugulad, maapirnid, sibulad, porgandid, pirnid, viinamarjad, katte- ja alusklaasid, mikroskoop, piirituslamp, tikud, I + KI, alkohol, Fehlingi lahused I, II, alkanna alkohollahus, 0,25-1%-line osmiumhape, Millon'i reaktiiv ja glütseriin.

Töö käik

Glükoosi ja fruktoosi määramiseks võetakse mitmesuguste taimede seemneid, vilju, juurikaid jt. Tärglase määramiseks võivad olla kõrreliste terised, liblikõieliste seemned, kartulimugulad, rasvade määramiseks riitsinuse-, kanepi-, lina- ja päevalilleseemned, valkude määramiseks lupiini- jt. liblikõieliste seemned ning riitsinuseseemned (pärast rasvade ekstraheerimist eetriga).

Reaktsioonid tehakse lõikudega alusklaasil. Igaks reaktsiooniks võetakse värsked lõigud.

1. Tärglasele on reaktiiviks Lugoli lahus. Näiteks kartulimugula lõigule viiakse tilk seda lahust. Tärglisesisalduse korral värvub lõik siniseks.

2. Glükoosi ja fruktoosi määramiseks kasutatakse Fehlingi lahuseid. Lõigud tuleb võtta mitte väga õhukesed (3-4 rakukihilised). Pärast lõikude valmistamist loputatakse neid vees, seejärel pannakse alusklaasile Fehlingi lahuse tilka ja kuumutatakse ettevaatlikult. Taandavate suhkrute olemasolu korral tekib punane Cu_2O sade.

3. Rasvu võib avastada kahe reaktiiviga:

- a) alkanna alkohollahusega,
- b) osmiumhappega.

Alkannaga värvimine toimub järgmiselt: lõigud asetatakse lahusetilgasse, kaetakse katteklaasiga ja vaadeldakse mikroskoobis. Rakkudest väljatungivad rasvatilgad värvuvad punaseks.

Osmiumhape muudab rasva mustaks. Mikroskoobis on rasvatilgad näha ka läikivate tilgakeste näol.

4. Valkudele tehtavad reaktsioonid vt. tööst 25.

Püsiapparaatide valmistamine

1. Materjali fikseerimine

Fikseerimise all mõistetakse histotehnikas kõiki neid menetlusi, mille abil püütakse kinnistada kudede ja rakkude koostist ja nende struktuuri võimalikult sellises seisundis, mis neil on elusana. Selleks kasutatavaid vedelikke nimetatakse fiksaatoriteks.

Fiksaator surmab rakud, hoides seega ära postmortaalse roiskumise ja autolüütilised protsessid. Fiksaatori toime avaldub üldiselt orgaaniliste ainete, eeskätt valkude muutmises lahustumatuteks. Fikseeritud materjal võib säilida aastaid ja sellest võib kergesti saada õhukesi (mõne μ paksusi) lõike. Fikseerimine toob selgemini välja rakkude ja kudede peene struktuuri.

Fikseerimiseks võetud materjal ei tohi olla närtsinud ega riknenud, ta peab olema täiesti värske, normaalselt funktsioneerivate kudedega.

Fikseerimiseks võetakse kōetükid, mille suurus ei ületa $0,5 \text{ cm}^3$. 1 cm^3 -lised ja suuremad taimetükid tavaliselt ei fikseeru ühtlaselt. Materjal tükeldatakse žiletiga või terava habemenoaga nii, et kudesid ei muljutaks. Soovitav on, et fikseeritaval tükil oleks mitu lõikepinda. Fiksaator tungib kudedesse kiiremini läbi lõikepindade kui tervete kattekuded kaudu.

Materjal tuleb tükeldada ja fiksaatorisse panna kiiresti, et rakkude struktuuris ei toimuks sügavaid biokeemilisi muutusi.

Infiltratsioon. Kõige olulisem materjali fikseerimiseks ettevalmistamisel on tema infiltratsioon, s. t. raku-vahe-ruumidest õhu eemaldamine. Raku-vahe-ruumides olev õhk takistab fiksaatori tungimist rakkudesse. Vaakuumpumbaga infiltratsioonil õhk eemaldub kudedest ja fiksaator tungib asemele. Eriti vajalik on infiltratsioon taimekudede fikseerimisel.

Taimekoe tükid pannakse katseklaasi fiksaatorisse. Katseklaas asetatakse õhukindlalt suletud Bunseni kolbi. Kolvi kraan on kummivooliku abil tihedalt ühendatud vaakuumpumbaga, mille kaudu imetaksegi õhk kolvist välja. Vaakuumpumba tiirude

arvu järgi on raske infiltreerimise kestust määrata. Tavaliselt imetakse õhk 4-5 minuti jooksul katseklaasist ning seoses sellega näeme õhumullide eemaldumist koetüki lõikepindade kaudu fiksaatorisse. Fiksaator muutub rohke õhu ja pikaajalise seismise tõttu kõlbatuks. Pärast infiltreerimist pannakse koetükid uude, värskest valmistatud fiksaatorisse.

Korralikult infiltreeritud koetükid vajuvad fiksaatorisse, koed fikseeruvad ühtlaselt ja sisestuvad hästi. Infiltreerimata või halvasti infiltreeritud taimekoed ujuvad fiksaatori pinnal, nad fikseeruvad ebaühtlaselt ja me ei saa edasiseks töötlemiseks sobivat materjali.

Fiksaatoritena kasutatakse näiteks formaliini, kroomhapet, alkoholi, osmiumhapet, äädikhapet, pikriinhapet jt. Nimetatud vedelikke kasutatakse lihtfiksaatoritena harva, sest lihtfiksaatorid põhjustavad materjali kortsumist, pundumist ja mitmesuguseid muid defekte. Et neid puudusi vältida, kasutatakse histotehnikas liitfiksaatoreid, mis koosnevad mitmest fikseerimisvedelikust.

Botaanilises histotehnikas on kasutatavamad Navasini (lk. 57), Carnoy (lk. 57), Bouini (lk. 58) jt. liitfiksaatorid.

Liitfiksaatorite valmistamisel kasutatakse pipette ja bürette. Mensuure kasutada pole soovitatav. Fiksaator valmistatakse otse enne fikseerimist. Üldine nõue on, et fikseerimisvedelik peab 50-100-kordselt ületama fikseeritavate osade mahu.

Fikseerimise kestus oleneb tükeldatud materjali suurusest, selle ehitusest, kudede diferentseerumisastmest, toitainete sisaldusest, fiksaatori koostisest jne. Meristeemsed ja embrüonaalsed koed fikseeruvad kiiremini kui täiesti diferentseerunud koed. Tavaliselt hoitakse materjali fiksaatoris 24 tundi. Õrnad, õhukeste rakuseintega objektid vajavad aga 8-10 tundi või veel vähem.

Uuuritavate koetükikestega koos pannakse fiksaatorisse ka fikseerimise järjekorra number. Järjekorranumber kirjutatakse tavalise pliiatsiga paberitükikesele ja see käib koos objektidega kõigist vedelikest läbi kuni materjali täieliku sisestamiseni. Selle numbri all on vihikus märgitud vastavad andmed:

Jrk. nr.	Kuu- päev, kella- aeg	Fiksaa- tor	Milline taime- osa on fik- seeritud	Fikseeritud tüki iseloo- mustus	Märkused

2. Pesemine ja veetustamine

Enamik fiksaatoreid (näit. kroomhapet sisaldavad) nõuab preparaate edasiseks valmistamiseks fiksaatori väljapesemist vees. Nii toimitakse ka Navašini fiksaatori kasutamisel.

Pärast Navašini seguga fikseerimist pestakse materjal kraanivees või nõus, milles tihti vahetatakse vett. Jooksvas vees pesemisel fikseeritud tükikesed pannakse väikestesse klaasnõudesse, näiteks kaalukaussidesse. Nõud seotakse pealt marliga kinni ja asetatakse valamusse 1,5-2 tunniks nõrgalt jooksva või tilkuva vee alla.

Pärast pesemist materjal veetustatakse, s. t. vabastatakse veest. Selleks pannakse fikseeritud ja pestud tükid pudelitesse (sobivad on penitsilliinipudelid). Veetustamisel on vaja tõusva kontsentratsiooniga alkohollahuste rida, et ei esineks lahuste järske üleminekuid, mis võivad esile kutsuda rakkude rebestusi. Objektid pannakse 10°, 30°, 70°, 96°, 100° I ja II alkohollahustesse. Väga õrnade objektide veetustamisel kasutatakse 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 96°, 100° I ja II alkohollahust. Kahes esimeses lahuses hoitakse objekte 20-30 minutit, teistes 1 tund. Kui aga 100°-st (absoluutset alkoholi) ei kasutata, siis peavad objektid olema 90°-ses I-s 24 tundi ja 96°-ses II-s 1 tund. Vajaduse korral võime materjali jätta 70°-sesse alkoholisse kauemaks ajaks. Veetustamiseks valmistatud alkohollahuseid kasutatakse korduvalt. Lahuste vahetamine pudelites toimub läbi marli, et objektid koos lahusega ei läheks teise pudelisse. Materjali tõstmine pintsetiga ühest lahusest teise pole soovitatav, sest see võib kudesid vigastada.

Veetustamisel on tingimata vaja objektid järk-järgult ühest lahusest teise viia. Vedeliku graduaalsuse jälgimine väldib tugevaid difusioonivoole ning neist põhjustatud koe-rebestusi.

Müügil olev alkohol on 96°-ne, kuid mikrotehnikas on meil vaja absoluutset alkoholi. Seda on lihtne ise valmistada.

Absoluutse alkoholi valmistamine. Enam-vähem (100°) absoluutset alkoholi saadakse kõige lihtsamini vaskvitrioliga. Müügil olev vaskvitriolipulber on veesisalduse tõttu sinise värvusega. Kuumutamisel vesi aurub ja jääb valge vaskvitriolipulber. Pulber asetatakse filterpaberist kotikesse ja pannakse 96°-sse alkoholi. Sama vaskvitrioli võib korduvalt kuumutada ja kasutada. Vaskvitriol ühineb alkoholis oleva veega, mille tulemusena saadakse absoluutne alkohol. Absoluutset alkoholi kasutatakse ka sisestamise-eelsete vahelahuste, nn. intermeediumide valmistamisel.

Intermeediumidega eemaldatakse enne sisestamist materjalist alkohol, mis parafiiniga ei ühine ja takistab kudede sisestamist. Vaatomata fiksaatorile kasutatakse alati ühiseid intermeediume. Siit algab ettevalmistus sisestamiseks. Sisestatav materjal peab olema vee- ja alkoholivaba.

Sisestamise-eelsete intermeediumide koostis on järgmine:

1. lahus: $\frac{3}{4}$ mahuosa 100°-st alkoholi ja $\frac{1}{4}$ mahuosa bensooli,
2. lahus: $\frac{1}{2}$ mahuosa 100°-st alkoholi ja $\frac{1}{2}$ mahuosa bensooli,
3. lahus: $\frac{1}{4}$ mahuosa 100°-st alkoholi ja $\frac{3}{4}$ mahuosa bensooli,
4. lahus: puhas bensool I ja II,
5. lahus: bensool-parafiin.

Kogu sisestamise käigus võivad bensooli asendada ksülool, metüülbensoaat, kloroform jt. vedelikud. Koetükid hoitakse bensool I-s ja bensoolparafiinis üks ööpäev, kõikides teistes lahustes 1 tund.

3. Sisestamine

Selleks et materjali mikrotoomiga lõigata, on vaja objektid sisestada parafiini. Parafiin tungib kudedesse, kui ta on lahustunud ksüloolis, bensoolis, toluoolis, kloroformis või mõnes teises vedelikus. Lahustunud parafiin tungib hästi vaid nendesse kudedesse, mis on täielikult veetustatud.

Parafiini sisestamine toimub termostaadis 56–58 °C temperatuuril. Sisestamisel peab temperatuur vastama kasutatava parafiini sulamistäpile. Liiga kõrge temperatuur (üle 60 °C) muudab taimekoe rabedaks.

Materjalile, millest eemaldati bensool II, valatakse peale täiesti puhas bensool ning ettevaatlikult pudeli seina mööda vedelat filtreeritud parafiini. Parafiin on sobiv valamiseks, kui tema pinnale on tekkinud õrn kile. Bensooli ja parafiini vahekord peab olema 1:3. Pudeli kaetakse pealt korgiga, et bensool väga kiiresti ei auruks. Bensoolis lahustunud parafiin tungib kudedesse.

Suletud pudelid objektidega hoitakse tavaliselt 1 ööpäev termostaadis. Järgmisel päeval pannakse objektid parafiinibensooli segust kas puhtasse parafiini või valatakse kogu pudeli sisu tiiglisse ja jäetakse 24 tunniks termostaati, kus toimub bensooli kiire aurumine. 24 tunni jooksul on materjal parafiini sisestunud, mille järel parafiin koos materjaliga valatakse vastavasse paberist vormi või tiiglisse. Parafiini jahtumist võib kiirendada tiigli panekuga külma vette. Jahtunud materjal säilitatakse karpides või klaaskupli all. Korralikult sisestatud ja fikseerimisnumbriga varustatud materjal võib säilida aastaid.

4. Preparaatide valmistamine

Sisestatud materjalist valmistatakse lõigud mikrotoomiga. Mikrotoomi ehitus võimaldab saada lõikude ühtlast ja soovikohaselt reguleeritavat paksust ning lõikude liitumist lindikujuliseks seeriaks. Oluliseks mikrotoomi osaks on nuga, sest korralikult teritatud ning vajalikult kinnitatud noata ei saada rebenemata ja siledapinnalisi lõike.

Lõikude paksus oleneb taimerakkude suurusest. Objekti anatoomilisel uurimisel loetakse sobivaks paksuseks seda, kui preparaadi lõikudel on näha üks terve rakukiht. Seepärast on suurte rakkudega kudedel paksemad lõigud kui väikeste rakkudega kudedel. Anatoomiliseks uurimiseks määratud lõikude tavaline paksus kõigub 10-15 μ piires, tsütoloogiliseks uurimiseks valmistatava lõigu paksus on 8-10 μ . Mikrotoomiga töötamisel peab lõigud võtma noalt ettevaatlikult pintseti või pintsliga, et mitte puutuda noa tera.

Parafiinplokkide valmistamine. Mikrotoomiga lõikude tegemiseks valmistatakse sisestatud materjalist parafiinplokid. Kõigepealt sulatatakse sisestatud tükid ettevaatlikult sooja lantsetiga parafiinist välja. Samaaegselt võetakse 2-2,5 cm suurune puuplokk, mille ühte otsa tilgutatakse parafiini kõrge tilgana. Vedelasse parafiinitilka pannakse varem väljasulatatud tüki, millele lisatakse veel mõni tilk parafiini. Nõrgalt sooja lantseti otsaga paigutatakse objekt parafiinis soovitud asendisse.

Teine plokki valmistamisviis on lihtsam. Sisestatud objekt lõigatakse välja koos ümbritseva parafiiniga. Uuritavat tükikest sisaldav korrapäraselt kandiliseks lõigatud parafiinplokk kinnitatakse sulaparaafiiniga puitalusale. Puitalus keedetakse kruviga kõvasti mikrotoomi külge kinni.

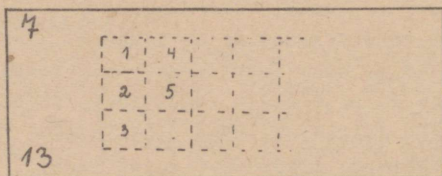
Lõigud kleebitakse täiesti puhastele alusklaasidele. Alusklaaside korralik puhastamine on väga tähtis, sest pesemata alusklaasidelt lõigud eemalduvad värvimisel.

Alusklaaside puhastamine. Alusklaasid pannakse algul külma vette, kuhu on lisatud tugevaid aluseid (KOH või NaOH) ja keedetakse 10-15 minutit. Siis pestakse neid soolhapet sisaldava veega. Pärast seda loputatakse alusklaase mitmel korral puhta kraaniveega ja lõpuks destilleeritud veega. Alusklaasid kuivatatakse rätikuga ja pannakse alkoholi. Kui kasutatakse tarvitatud preparaadiklaase, siis tuleb nad enne vees keetmist kanada palsamist puhastada. Selleks pannakse preparaadid küülooli, toluooli või bensooli, milles nad seisavad mõni ööpäev. Alusklaasid loputatakse alkoholiga, keedetakse, ja toimitakse edasi nii, nagu eespool kirjeldatud.

Lõikude kleepimine. Et lõike värvida ja püsipreparaate

valmistada, kleebitakse lõigud alusklaasile. Kleepimisel kasutatakse valkglütseriini. Alusklaasi pind kaetakse häguselt valkglütseriiniga (valkglütseriini segu valmistatakse järgmiselt: teatud hulga filtreritud kanamunavalgele lisatakse võrdne kogus glütseriini). Valkglütseriini ei tohi alusklaasile palju panna, see takistab lõikude kuivamist ja värvimisel lõigud eemalduvad. Nõrgalt valkglütseriiniga määritud alusklaasile lisatakse destilleeritud vett, millesse pannakse lõikude lint vastavalt katteklaasi suurusele (joon. 9).

Äsja valmistatud preparaadid hoitakse elektripliidi kohal ühtlases soojuses, et lõigud korralikult sirguksid. Seejärel kõrvaldatakse liigne vesi alusklaasi kallutamisel ja äärte kuivatamisel filterpaberiga. Igale preparaadile kirjutatakse tusiga järjekorra- ja fikseerimisnumber. Sellised nummerdatud preparaadid jäetakse vähemalt 24 tunniks sooja kohta kuivama, et neid hiljem värvida.



Joon. 9. Lõikude kleepimine alusklaasile. 7 - fikseerimise järjekorra number, 13 - preparaadi järjekorra number, 1, 2, 3, 4... lõigud alusklaasil.

5. Preparaatide värvimine ja sulundamine

Värvimine. Värvimist tuleb kooskõlastada fiksaatoritega, sest värv toob esile üksnes neid struktuure, mis pole hävinud fikseerimisel või mille värvimist fiksaator ei takista. Nii ei õnnestuks meil mitokondrite värvimine piirituses fikseeritud preparaadis, sest mitokondrid lahustuvad alkoholis. Carnoy' fiksaatoriga fikseerimisel võime kasutada kõiki värve. Formaliinisaldus fiksaatoris intensiivistab tuumade värvumist hematoksiiliiniga, aga takistab mõnevõrra värvimist kar-

miiniga. Botaanilises histotehnikas kasutatakse preparaatide värvimisel kõige sagedamini raud-hematoksüliini e. Heidenhaini hematoksüliini. Ta värvib tuumas oleva kromatiinaine mustaks, raku protoplasma ja kesta halliks.

Deparafineerimine. Enamik histotehnikas kasutatavaid värvilahuseid on vesi- või alkohollahused, mistõttu enne värvimist tuleb lõikudest parafiin kõrvaldada. Selleks tehakse läbi parafiini sisestamisele vastupidine tee.

Deparafineerimisel asetatakse preparaadid 10-30 minutiks näiteks toluooli või ksülooli, mis lahustab kudedes parafiini ja see eemaldub. Nii saame parafiinivabad lõigud.

Pärast deparafineerimist hoitakse preparaadid 96°-ses alkoholis umbes 5 minutit. Raskesti töödeldavate, näiteks toitaineterikaste kudedega preparaadid, mille lõigud võivad kergesti alusklaasilt eemalduda, kastetakse pärast 96°-ses alkoholis hoidmist 0,5%-lisse tselloidiinlahusesse. Tselloidiinlahus katab lõigud kilena ega takista nende edasist töötlemist.

Preparaadi värvimisel tuleb jälgida, et lõigud ühest lahusest teise tõstmisel vahepeal ei kuivaks. Sellepärast pannakse preparaadid kiiresti ühest nõust teise. Pärast tselloidiinlahust viiakse preparaadid 70°-sesse ja 30°-sesse alkohollahusesse, mõlemas hoitakse 2-3 minutit, ja lõpuks vette. Veest pannakse preparaadid 2-12 tunniks 2,5%-lisse raudalaunilahusesse.

Preparaatide värvimise eelne peitsimine raudalauniga soodustab raku ja tuuma värvumist. Raudalaunist loputatakse preparaadid veega ja pannakse 1-4 tunniks (mõnikord 24 tunniks) raudhematoksüliinilahusesse. Diferentseerunud koed värvuvad aeglasemalt kui meristeemkoed.

Lõigud muutuvad värvilahuses peaaegu mustaks. Pärast veega loputamist preparaadid diferentseeritakse (üleliigne värv eemaldatakse) 0,5%-lise raudalaunilahusega. Lõikude diferentseerumist kontrollitakse mikroskoobiga. Mida kauem toimub diferentseerimine, seda sagedamini tuleb lõikusid kontrollida. Kui lõigud on vajaliku värvumisintensiivsusega, siis pestakse preparaate mitmel korral kraanivees.

Värvitud preparaadid veetustatakse 30°-se, 70°-se ja

96^c-se I ja II alkohollahusega. Igas lahuses hoitakse preparaate 3-5 minutit.

Alkoholi kõrvaldamiseks lõikudelt pannakse preparaadid algul karboolksülooli ja hiljem ksülooli 3-5 minutiks.

Sulundamine. Ksüloolist väljavõetuna peavad preparaadid olema piimja emulsioonita, läbipaistvad ja ilma värvisademeta. Piimjas emulsioon viitab kudede puudulikule veetustamisele. Korralikult värvunud preparaadid sulundatakse kanada palsamisse.

Preparaatide sulundamisel pannakse lõikudele 1 tilk kanada palsamit ja sellele katteklaas, nii et õhumullid ei satuks klaasi alla. Õhk katteklaasi all takistab preparaatide analüüsimist ja rikub lõikusid.

Pärast kanada palsami täielikku kuivamist (paari kuu pärast) võib preparaadil katteklaasi servad lakiga kinni määrida, see pikendab preparaatide iga. Hästi sulundatud preparaadid võivad säilida aastaid.

Sulundatud preparaadid hoitakse vastavates karpides või kappides.

6. Kasutatavamaid fiksaatoreid ja värvi- lahuseid

Fiksaatorid. Kaasaja botaanilises mikrotehnikas on üks kasutatavamaid fiksaatoreid Navasini segu, mille koostis on järgmine:

- 10 sm³ 1%-list kroombappe vesilahust,
- 4 sm³ 40%-list formaliini
- 1 sm³ jää-äädikhapet.

Fiksaator, kuhu pannakse infiltreeritud koetükid, peab olema värvuselt punakaskollane. Seismisel muutub fiksaator rohekaks.

Taimede embrüonaalse materjali, samuti ka sammalde fikseerimisel kasutatakse väga sageli Carnoy fiksaatorit.

Carnoy fiksaatori koostis:

- 6 sm³ 100^c-st alkoholi,
- 3 sm³ kloroformi,
- 1 sm³ jää-äädikhapet.

Fiksaator tungib väga kiiresti kudedesse. 1-2 mm suurused tükikesed fikseeruvad juba 1 tunniga, 3-5 mm suurused 3-5 tunniga. Mitte kunagi aga ei tohi materjali fikseerimine kesta üle 12 tunni. Kui tükikesed on kaua fiksaatoris, muutuvad nad väga kõvaks.

Pärast fikseerimist pestakse tükke 100°-se piiritusega seni, kuni kaob äädikhape lõhn. Edasi järgneb sisestamine parafiinis vastavalt eespool käsitletud meetodile (lk. 53).

Bouin'i fiksaator. Bouin'i fiksaatorit kasutatakse tuuma peenstruktuuri ja kondriosoomide ehituse uurimisel. See on spetsiaalne tuuma fiksaator.

Bouin'i fiksaatori koostis:

- 15 sm³ küllastatud pikriinhappe vesilahust (ca 1 g kristalset pikriinhapet 100 sm³ veele),
- 5 sm³ formaliini (keemiliselt puhast),
- 1 sm³ jää-äädikhapet.

Fiksaator peab olema värske, ta valmistatakse kohe enne materjali fikseerimist. Fiksaator tungib kudedesse 2-24 tunni jooksul. Isegi mõnepäevane fikseerimiskestus ei mõju materjalile halvasti.

Pärast fikseerimist pestakse objektid 70°-80°-ses alkoholilahuses. Alkoholilahuseid vahetatakse 2-3 korda. Fikseeritud objektid jäävadki esialgu nõrgalt kollaseks. Nende sisestamine toimub eespool käsitletud meetodi järgi (lk. 53).

Värvilahused. Preparaatide värvimisel tuleb paremini nähtavale rakkude ja tuumade ehitus. Sageli kasutatakse ühtede preparaatide värvimisel mitut värvilahust, sest üks lahus värvib hästi kesti, teine tuumi, kolmas protoplasmat jne.

Heidenhaini hematoksüliini värvilahuse valmistamine.

0,5 g hematoksüliini lahustatakse 10 sm³ 96°-ses alkoholis ja lisatakse 90 sm³ destilleeritud vett. Värvilahus jäetakse avatud klaasnõusse 4-5 nädalaks seisma. Iga kord enne värvimist lahust fikseeritakse. Värvilahust kasutatakse korduvalt.

Raudhematoksüliin värvib preparaate seda paremini, mida kauem ta on seisnud. Heidenhaini hematoksüliiniga värvimisel peitsitakse preparaadid eelnevalt rauaalauniga (lk. 56).

Raudalaunilahuse valmistamine. 10 g helevioletse raudalauni kristalle lahustatakse 100 sm³ destilleeritud vees. See on alglahus, millest valmistatakse värvimisel vajalikke 2,5%-lisi ja 0,5%-lisi lahuseid.

Gentsiaanaviolett. Sagedasti värvitakse 1%-lise gentsiaanavioleti vesilahusega raku puitunud kesti. See värvilahus mõjub väga intensiivselt, mõne minutiga on lõigud värvunud. Teda kasutatakse sageli koos 0,5%-lise kongo punase vesilahusega. Pärast gentsiaanavioletiga värvimist hoitakse preparaadi 1 minut kongo punases. Raku tuumad värvuvad tumepunaseks.

Eosiin. Preparaadid värvitakse 1%-lise eosiini vesi- või alkohollahusega. Alkohollahuse valmistamisel lahustatakse eosiin 70^o-ses alkohollahuses. Eosiini värvilahuseid kasutatakse sageli koos metüleensinise vesilahusega.

Värvimiseks asetatakse preparaadid 1 ööpäevaks 1-2%-lisse metüleensinise vesilahusesse. Pärast värvimist lõigud loputatakse hästi vees. Täiendavaks värvimiseks pannakse preparaadid 1-2 tunniks eosiini, sellest väljavõetult loputatakse nad 96^o-se alkoholiga. Puitumata rakukestad on värvunud roosaks ja puitunud kestad helesiniseks.

Safraniin on üks kasutatavamaid värvaineid anatoomilises mikrotehnikas. Safraniin värvib eriti hästi kudesid, mis on fikseeritud alkoholi või kroomhapet sisaldava liitfiksaatoriga. Kõige sagedamini kasutatakse 1-2%-list safraniini vesilahust.

Rakkude tuumi värvitakse safraniinilahusega, mis on valmistatud järgmiselt:

1 g värvainet lahustatakse 100 ml absoluutses alkoholis. Absoluutset alkoholi lahjendatakse destilleeritud veega kahekordselt, et saada sobiva kontsentratsiooniga värvilahust.

7. Lühike kokkuvõtte töö käigust

Püsipreparaatide valmistamise põhiastapid Navašini fiksaatori kasutamise korral on järgmised:

1. Materjali fikseerimine 24 t.
2. Fiksaatori väljapesemine 1,5-2 t.
3. Materjali veetustamine

a) tugevamate kudede korral		
10°-ses	alkohollahuses	20-30 min.
30°-ses	"	1 t.
70°-ses	"	1 t. (või enam)
96°-ses	"	1 t.
100°-ses	I alkoholis	1 t.
100°-ses	II "	1 t.
b) õrnemate kudede korral		
10°-ses	alkohollahuses	20-30 min.
20°-ses	"	20-30 "
30°-ses	"	1 t.
40°-ses	"	1 t.
50°-ses	"	1 t.
60°-ses	"	1 t.
70°-ses	"	1 t. (või enam)
80°-ses	"	1 t.
96°-ses	"	1 t.
100°-ses	I alkoholis	1 t.
100°-ses	II alkoholis	1 t.

4. Ettevalmistus sisestamiseks.

Intermeediumid.

I lahus - 100°-st alkoholi $\frac{3}{4}$ mahuosa ja $\frac{1}{4}$ mahuosa
bensooli - 1 t.

II lahus - 100°-st alkoholi $\frac{1}{2}$ mahuosa ja $\frac{1}{2}$ mahuosa bensooli
- 1 t.

III lahus - 100°-st alkoholi $\frac{1}{4}$ mahuosa ja $\frac{3}{4}$ mahuosa
bensooli - 1 t.

bensool I-s - 24 t.

bensool II-s - 1 t.

bensoolparafiinis - 24 t.

5. Sisestamine parafiini termostaadis 24-48 tundi.

6. Parafiinplokkide valmistamine.

7. Lõikude tegemine mikrotoomiga.

8. Lõikude kleepimine.

9. Preparaatide kuivatamine (vähemalt 24 tundi).

10. Preparaatide deparafineerimine toluoolis või teistes parafiini lahustavates vedelikes.

11. Deparafineeritud preparaate töötlemine (ettevalmistamine värvimiseks).

96°-ses	alkohollahuses	5 minutit
70°-ses	"	2-3 "
30°-ses	"	2-3 "
vees		1-2 "
2,5% raudalaunilahusega		2-12 tundi
destilleeritud vees		1-2 minutit

12. Preparaatide värvimine raudhematoksüliinis 1-4 tundi
(harva 24 tundi),
destilleeritud vees 1-2 minutit.
13. Preparaatide diferentseerimine 0,5%-lises raudalaunilahuses,
kraanivees 1-2 minutit.
14. Preparaatide veetustamine.
- | | | |
|----------------|----------------|-------------|
| 30°-ses | alkohollahuses | 3-5 minutit |
| 70°-ses | " | 3-5 " |
| 96°-ses I | " | 3-5 " |
| 96° II | " | 3-5 " |
| karboksüloolis | | 3-5 " |
| ksüloolis | | 3-5 " |
15. Preparaatide sulundamine kanada palsamisse.

T ö ö 29

Nukleiinhapete histokeemiline määramine

Nukleiinhapped on kõrgmolekulaarsed ühendid, mis nukleo-
proteiidide koostises sisalduvad kõigis elusates rakkudes.
Nukleiinhapete lokalisatsiooni kindlakstegemisel kasutatakse
histokeemilisi meetodeid.

Ribonukleiinhappe määramine

Uuritavad taimeosad fikseeritakse. Fiksaatoriks on al-
koholkloroform (vahekord 3:1) või Carnoy'segu (vt. töö 28).
Kroome sisaldavaid fiksaatoreid ei tohi kasutada, sest need
nõrgendavad metüleensinise adsorptsiooni. Fikseerimise aeg
oleneb materjalist, tavaliselt on see ühest kuni kolme tunni-
ni.

Etüüalalkoholi lahjendamine veega

Vajalik kontsentratsioon (°-des 20 °C temperatuuril)		Lahjendatava alkoholi kontsentratsioon (°-des 20 °C temperatuuril)																	
		100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	10
90		90,0	94,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85		85,0	89,5	94,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80		80,0	84,2	88,9	94,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75		75,0	78,9	83,3	88,2	93,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70		70,0	73,7	77,8	82,4	87,5	93,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65		65,0	68,4	72,2	76,5	81,2	86,7	92,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60		60,0	63,2	67,7	70,6	75,0	80,0	85,7	92,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55		55,0	57,9	61,1	64,7	68,8	73,3	78,6	84,6	91,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50		50,0	52,6	55,6	58,8	62,5	66,7	71,4	76,9	83,3	90,9	-	-	-	-	-	-	-	-
45		45,0	47,4	50,0	52,9	56,3	60,0	64,3	69,2	75,0	81,8	90,0	-	-	-	-	-	-	-
40		40,0	42,1	44,4	47,1	50,0	53,3	57,4	61,5	66,7	72,7	80,0	88,9	-	-	-	-	-	-
35		35,0	36,8	38,9	41,2	43,8	46,7	50,0	53,8	58,3	63,6	70,0	77,8	87,5	-	-	-	-	-
30		30,0	31,6	33,3	35,3	37,5	40,0	42,9	46,2	50,0	54,5	60,0	66,7	75,0	85,7	-	-	-	-
25		25,0	26,3	27,8	29,4	31,3	33,3	35,7	38,5	41,7	45,5	50,0	55,6	62,5	71,4	83,3	-	-	-
20		20,0	21,1	22,2	23,5	25,0	26,7	28,6	30,8	33,3	36,4	40,0	44,4	50,0	57,1	66,7	80,0	-	-
15		15,0	15,8	16,7	17,6	18,8	20,0	21,4	23,1	25,0	27,3	30,0	33,3	37,5	42,9	50,0	60,0	75,0	-
10		10,0	10,5	11,1	11,8	12,5	13,3	14,3	15,4	16,7	18,2	20,0	22,2	25,0	28,6	33,3	40,0	50,0	-
5		5,0	5,3	5,6	5,9	6,3	6,7	7,1	7,7	8,3	9,1	10,0	11,1	12,5	14,3	16,7	20,0	25,0	50,0

Pärast fikseerimist materjal veetustatakse absoluutse alkoholiga. Järgnevalt pannakse preparaadid ksülooli-alkoholi segusse, siis ksülooli ja lõpuks parafiini. Parafiini sisestamine ja lõikude tegemine toimub tavaliselt eespool näidatud metoodika kohaselt (töö 28).

Deparafineeritud preparaadid hüdrolüüsitakse 1 N HCl (20 °C temperatuuril) 5-12 minutit, olenevalt objektist. Diferentseerunud kudede hüdrolüüsimine kestab kauem kui embrüonaalsetel kudedel, isegi 2 tundi. Pärast hüdrolüüsi loputatakse lõikusid veega ja värvitakse metüleenroheline-püroniiniga. (Värvi valmistamine töö lõpus.) Värvitud preparaadid loputatakse veega, kuivatatakse filterpaberil, viiakse kiiresti läbi absoluutse alkoholi. Alkoholist vabastamine toimub atsetooni-ksülooli (1:1) seguga kahel korral (teisel korral on atsetooni-ksülooli segu vahekord 1:10). Lõpuks pannakse preparaadid puhtasse ksülooli ja sulundatakse kanada palsamisse.

Värvunud preparaadis on näha, et tsütoplasma, mis sisaldab ribonukleiinhapet, on värvunud punaseks.

Värvilahuse valmistamine Unni järgi

Metüleenroheline (0,15 g), püroniin (0,25 g), absoluutne alkohol (2,5 ml), glütseriin (20,0 ml), 0,5%-line karbolhape (77,5 ml).

Trevan'i ja Sharrock'i järgi

5%-line püroniini vesilahus (17,6 ml), 2%-line metüleenroheline vesilahus (10 ml), destilleeritud vesi (250 ml).

Enne kasutamist lisatakse segule 0,2 M atsetaatpuhvrit (pH 4,8).

Desoksüribonukleinhappe määramine

Uuritav materjal fikseeritakse alkoholi-kloroformi segus (7:3) või Carnoy segus, pestakse absoluutse alkoholiga ja viiakse ksülooli. Ksüloolist pannakse materjal ksüloolparafiini ning sisestatakse parafiinis.

Lõigud lõigatakse mikrootoomiga ja kleebitakse alusklaasile (vt. töö 28). Enne värvimist deparafineeritakse preparaadid ksüloolis. Ksüloolist pannakse preparaadid algul 96°-sesse alkoholi, siis järk-järgult nõrgemasse kuni lõpuks vette.

Veest võetakse preparaadid ja hüdrolüüsitakse kolm korda. Esiteks hoitakse neid 1 N HCl vesilahuses 18 °C temperatuuril kaks minutit, 60 °C temperatuuril 4 minutit ja lõpuks jälle 18 °C temperatuuril, kuid ainult 1 minut. Pärast hüdrolüüsi pannakse preparaadid kaheks tunniks Schifffi reaktiivi. Siis pestakse neid küllastatud väävelhappeveega kolm korda, iga kord 15 minutit. Lõpuks pestakse kraaniveega ja veetustatakse alkoholiga. Alkoholist lähevad preparaadid ksülooli ja sulundatakse kanada palsamis. Desoksüribonukleiinhape on lokaliseerunud tuumas ja tuumad värvuvad punakasvioletseks. Protoplasma jääb värvumata.

Schifffi reaktiivi koostis (Tomase järgi): 1 g aluselist fuksiini lahustada 200 sm³ keevas vees. Loksutada 5 minutit ja siis jahutada täpselt 50 °C-ni. Pärast filtreerimist lisada filtraadile 20 sm³ 1 N HCl. Jahutatakse 25°-ni ja lisatakse 1 g Na-metabisulfaati (Na₂S₂O₅) või kaalium-metabisulfaati).

Lahus jäetakse 14-24 tunniks pimedasse seisma. Siis lisatakse 2 g aktiivsütt ja loksutatakse 1 minut. Filtreeritakse. Lahus hoitakse alal pimedas 0-4 °C temperatuuril.

K a s u t a t u d k i r j a n d u s

Б а с л а в с к а я , С . С . , Т р у б е ц к о в а , О . М . ,

Практикум по физиологии растений, М. 1964.

Е р м а к о в , А . И . , А р а с и м о в и ч , В . В . , С м и р -

н о в а - И к о н н и к о в а , М . И . , М у р р и , И . К . ,

Методы биохимического исследования растений, М.-Л. 1952.

П е т р о в , К . П . , Практикум по биохимии пищевого раститель-

ного сырья, М. 1965.

В г а у н е r u n d В у к а т s c h , F . , Das kleine Pflanzen-

physiologische Praktikum, Jena 1964.

S i s u k o r d

TAIMEDE BIOKEEMIA JA HISTOKEEMIA	3
1. Vaakuum-infiltratsioonimeetod	3
2. Fermentide määramine kudedes vaakuum-infiltratsiooni- meetodiga	6
3. Tärklise hüdrolüüsi skaala saamine diastaasi toimetel	9
4. Diastaasi tekkimine tärkliserikaste seemnete idane- misel	10
5. Invertaasi määramine pärmiseentes ja selle mõju sahharoosile	11
6. Temperatuuri ja keskkonnareaktsiooni mõju invertaa- si aktiivsusele	12
7. Oksüdaasi määramine taimedes	13
8. Katalaasi kvalitatiivne määramine	14
9. Katalaasi aktiivsuse määramine (A. N. Bachi ja A. I. Oparini järgi)	14
10. Katalaasi aktiivsuse määramine taimses materjalis	16
11. Peroksüdaasi aktiivsuse määramine	17
12. Peroksüdaasi määramine kartulimugulates	20
13. Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramine	21
14. Dehüdrogenaasi aktiivsuse määramine	22
15. Dehüdrogenaasi määramine	23
16. Monosahhariidide, disahhariidide, polüsahhariidide lahuste saamine ja nende omaduste uurimine	24
17. Varuvalgud ja nende omaduste uurimine	27
18. Taandavate suhkrute kvantitatiivne määramine (Bertrand'i järgi)	28
19. Mono- ja disahhariidide määramine taimlehtedes ...	34
20. Paberelektroforeesikamber	36
21. Askorbiinhappe (C-vitamiini) määramine	39

22. Tärklise määramine polarimeetriliselt	40
23. Taimse materjali tuhastamine ja mikrokeemiline analüüs	42
24. Niiskuse määramine taimses materjalis	46
25. Valgu histokeemiline analüüs lehtedes	47
26. Valkude määramine hernestes	48
27. Varuainete histokeemiline analüüs	49
28. Püsipreparaatide valmistamine	50
29. Nukleiinhapete histokeemiline määramine	62
Kasutatud kirjandus	66

-40

Hind 10 kop.

A

3

27603

199880

TÜ RAAMATUKOGU



1 0300 00399322 9