

TBT4102 Biokjemi 2

Oppgave 1: Innføring i bruk av automatpipette og spektrofotometri

Ove Øyås

NTNU, 14. februar 2012

1 Framstilling av standardkurve

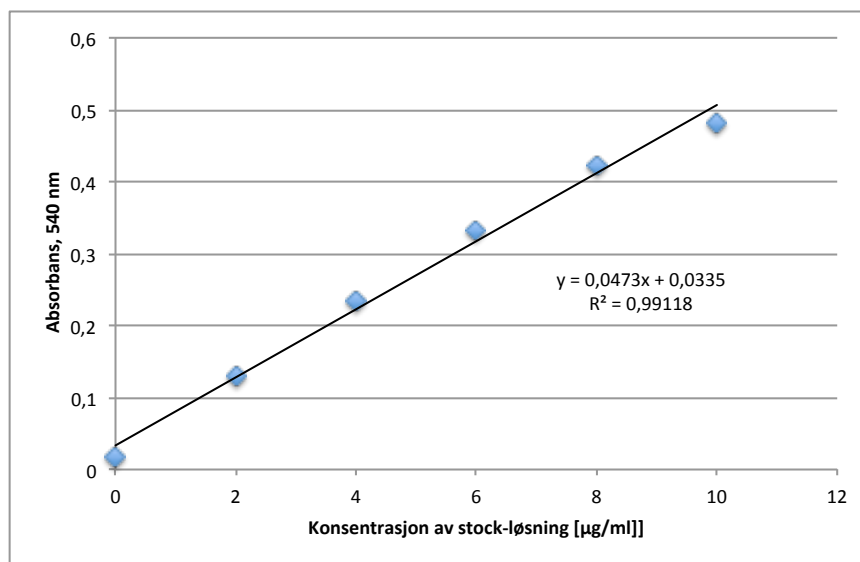
Absorbans ved 595 nm ble målt for ulike konsentrasjoner av stock-løsning. Det ble utført målinger i tre ulike paralleller for hver konsentrasjon og gjennomsnittsverdien til de tre parallellene ble benyttet til å framstille en standardkurve. Data for framstillingen av standardkurven finnes i Tabell 1 og kurven er vist i Figur 1. Kurven ble funnet ved regresjon og beskrives av det lineære uttrykket

$$y = 0,0473x + 0,0335 \quad (1)$$

med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99118$.

Tabell 1: Rådata for framstilling av standardkurve. Absorbans ved 595 nm er målt for ulike konsentrasjoner av stock-løsning, C_{stock} . Absorbansen ble målt i tre ulike paralleller for hver konsentrasjon og en gjennomsnittsverdi ble beregnet.

C_{stock} [µg/ml]	Absorbans, 595 nm			Gjennomsnittlig absorbans, 595 nm
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	
0	0,000	0,019	0,031	0,017
2	0,123	0,135	0,130	0,129
4	0,223	0,234	0,246	0,234
6	0,339	0,334	0,328	0,334
8	0,419	0,428	0,424	0,424
10	0,494	0,476	0,478	0,483



Figur 1: Standardkurve. Absorbans ved 595 nm som funksjon av konsentrasjon av stock-løsning.

2 Resultater og beregninger

Absorbansen ble målt i tre ulike paralleller for en prøve med ukjent konsentrasjon av stock-løsning (prøve nummer 2). Resultatet fra disse målingene er gitt i Tabell 2.

Tabell 2: Absorbans ved 595 nm målt i tre ulike paralleller for en prøve med ukjent konsentrasjon av stockløsning.

Absorbans, 595 nm			Gjennomsnittlig absorbans, 595 nm
Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	
0,256	0,251	0,250	0,252

Korresponderende verdier for konsentrasjon av stock-løsning ble beregnet ved innsetting av verdier fra Tabell 2 i ligning (1). Verdiene er oppgitt i Tabell 3.

Tabell 3: Konsentrasjon av stockløsning, C_{stock} , beregnet fra målte verdier av absorbans i tre ulike paralleller av ukjent prøve.

C_{stock} [µg/ml]			Gjennomsnittlig C_{stock} [µg/ml]
Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	
4,70	4,60	4,58	4,63

Den ukjente prøven ble fortynnet 10 ganger ved forsøkets start, og den reelle gjennomsnittskonsentrasjonen ble derfor beregnet til 46,3 µg/ml ved multiplikasjon med 10.

Standardavviket for konsentrasjonene av stock-løsning beregnet fra målingene av absorbans i den ukjente prøven ble beregnet fra uttrykket

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (2)$$

der x er verdi fra én måling, \bar{x} er gjennomsnittlig verdi for alle målinger og N er antall paralleller. Standardavviket for gjennomsnittskonsentrasjonen ble beregnet fra

$$SDOM = \frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}} = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (3)$$

Ved innsetting av verdier fra Tabell 3 i ligningene (2) og (3) ble standardavviket bestemt til henholdsvis 0,07 µg/ml for de tre konsentrasjonene beregnet fra målinger av absorbans og 0,04 µg/ml for gjennomsnittskonsentrasjonen. Disse tallene må også multipliseres med 10 som følge av fortynning ved starten av eksperimentet, og standardavviket i konsentrasjon for gjennomsnittet blir da 0,4 µg/ml.

3 Konklusjon

Konsentrasjon av stock-løsning i den ukjente prøven ble beregnet til $46,3 \pm 0,4$ µg/ml.

4 Spørsmål til innlevering

1. Gi en kort forklaring på hvordan man pipetterer.

Før pipettering stilles ønsket volum inn på automatpipetten. Sett på spiss og pass på å ikke ta på tuppen som skal ned i løsningen. Trykk stempelet ned til første positive stopp, og hold stempelet der. Hold pipetten vertikalt og dypp pipettespissen ned i prøveløsningen. Spissen skal ikke stikke dypt, kun litt under overflaten. Slipp stempelet sakte opp og vent 1-2 sekunder for å være sikker på at hele prøvevolumet er trukket inn i pipettespissen. Ta pipetten ut av prøveløsningen. Eventuelle dråper av løsning utenpå spissen etterlates ved å føre spissen langs veggen i beholderen. For å få ut løsningen trykkes stempelet sakte ned til første stopp. Vent 1-2 sekunder. Press stempelet videre ned til andre stopp. Dette kan gjentas til all løsningen er kommet ut. Ta pipetten opp fra beholderen du har tilført væske til. Eventuelle dråper av løsning utenpå spissen etterlates ved å føre spissen langs veggen i beholderen. Spissen tas av med et stempel på siden av pipetten.

2. Hvordan skal man holde pipetten når man pipetterer?

Pipetten holdes i én hånd med tommelen på stempelet. Det er viktig å holde pipetten vertikalt.

3. Hvorfor skal man aldri legge ned pipetten med løsning i spissen?

Dersom man legger ned pipetten med løsning i spissen, kan løsning komme inn i pipetten. Pipetten må da renses før videre bruk.

4. Hvorfor er det viktig å alltid se på pipettespiss/løsning når man pipetterer?

Det er viktig å følge med på pipettespissen ved pipettering for å passe på at den hele tiden stikker ned i løsningen.

5. Hvilke konsekvenser kan det få hvis man ikke følger med underveis og ikke pipetterer riktig?

Dersom man ikke pipetterer riktig vil man kunne få betydelige feil i utmålt volum, noe som vil påvirke de eksperimentelle resultatene. Små volumfeil kan ha stor innvirkning på kvaliteten på resultatene.