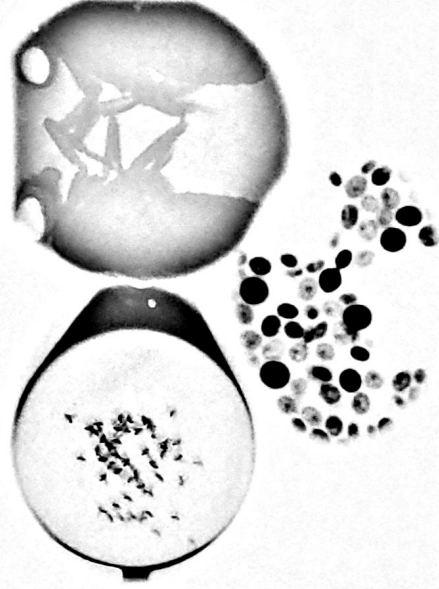


Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Факультет природничих наук
Кафедра біохімії та біотехнології



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ
ДИВОВИЖНИЙ СВІТ ЖИВОГО: ВІД ТЕОРІЇ ДО ЕКСПЕРИМЕНТУ



Івано-Франківськ
2022

УДК 577.112+577.114+577.16

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу
«Дивовижний світ живого: від теорії до експерименту» / Методичні вказівки.
2022. 26 с.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дослідження біомолекул живого організму. Наведено основні методи якісного виявлення амінокислот, вуглеводів та вітамінів у біологічному матеріалі.

Автори-укладачі: Д.Б.Н., проф. Байляк М.М., к.б.н., доц Аброт О.Б.,
к.б.н., доц. Господарьов Д.В., к.б.н. Музальов І.І., к.б.н. Швадчак В.В.

**Схвалено до друку на засіданні кафедри
біохімії та біотехнології
(протокол 13 від 27 травня 2022 р.)**

Зміст

Лабораторна робота № 1. Знайомство із сучасними лабораторними приладами	4
Лабораторна робота №2. Оцінка якості харчових продуктів.....	6
Лабораторна робота №3. Якісні реакції на вуглеводи та білки.....	10
Лабораторна робота №4. Морфологія зразків під світловим мікроскопом..	15
А) Виготовлення та аналіз мазків крові людини.....	18
Б) Виготовлення та мікроскопічний аналіз препаратів бактерій і дріжджів...	21
Лабораторна робота №5. Розглядання зразків під флюоресцентним мікроскопом.....	24

Лабораторна робота № 1. Знайомство із сучасними лабораторними приладами

Теоретичні відомості

Центрифуги. Всі рідини, з якими ми стикаємось в повсякденному житті можна поділити на три категорії: чисті речовини, однорідні розчини, неоднорідні розчини. Рідини які є чистою речовиною – такі, як вода чи спирт – ніколи не розшаровуються і не залишають сухого залишку при випарюванні. Однорідні розчини – такі, як розчин солі в воді – теж не розшаровуються, але при випарюванні часто залишають осад. Це відбувається тому, що розчинена речовина розпадається на окремі молекули чи іони. В неоднорідних розчинах (мутна вода, молоко, кров) розчинена речовина не розпадається на окремі молекули, а просто зависає дрібними шматочками в товщі розчинника. З часом такі розчини здатні розшаровуватися за рахунок того, що важчі частинки під дією гравітації опускаються донизу. Цей процес тим швидший, чим більший розмір частинок. Для дуже дрібних частинок (наприклад, каламуті глини у воді) він може тривати годинами. Щоб прискорити осідання, в лабораторіях використовують **центрифуги** – пристрої, які за рахунок швидкого обертання створюють відцентрову силу, в сотні разів більшу за гравітацію. На практиці їх застосовують, наприклад, при аналізі крові.

Кров складається з води, в якій розчинені солі та органічні речовини, а також знаходяться клітини, переважно еритроцити (які надають їй червоного кольору), тромбоцити та лейкоцити. При центрифугуванні клітини осідають, а плазма крові (розчин білків та солей) залишається згори (рис. 1).

Спектрофотометри. В усіх розчинів є дві незалежні характеристики: колір і каламутність. **Каламутність** – це здатність розсіювати будь-яке світло. Каламутні розчини непрозорі і переважно здаються білими (класичний приклад – молоко), але можуть мати й інший колір (наприклад, непрозора червона кров). Каламутність виникає через наявність в розчині частинок розміром більше одного мікрону (мікрометру) і переважно вказує, що розчин неоднорідний і може з часом розшаруватись. **Колір** – здатність речовини по-різному поглинати світло різної довжини хвилі (різного кольору). Природне сонячне світло є сумішшю світла різного кольору і ми звикли називати таку суміш білим світлом. Коли хлорофіл листя поглинає синю і червону складові сонячного світла, то залишається зеленим, що і зумовлює видимий колір листя. В рослинах наявні два види хлорофілу, А і Б, які поглинають дещо різне світло. Скільки якого з них – залежить від умов росту рослини й виду. Відносну кількість двох хлорофілів можна визначити, порівнявши поглинання світла різного кольору. Це роблять за допомогою **спектрофотометрів** – пристроїв, які здатні точно поміряти скільки світла

кожного кольору поглинає розчин. Найчастіше вони використовуються для швидкого аналізу вмісту певних речовин в крові людини. Завдяки тому, що спектрофотометри можуть визначати поглинання світла навіть з тими довжинами хвиль, які не бачить людське око, вони можуть "бачити" білки і дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) в розчинах, які для людини настільки ж безбарвні, як і чиста вода.

Реактиви:

- кров риби
- м'ясистий листок рослини

Хід роботи

А) Розділення крові на фракції

1. Два мілілітри (мл) крові відібрати в пластикову мікропробірку об'ємом 2 мл та центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв ($t = 4^{\circ}\text{C}$).
2. Розглянути результати центрифугування.
3. Відібрати надосадову рідину (плазму) у окрему мікропробірку і зберігати на льоді.

Висновки: _____

Б) Розділення рослинного гомогенату

1. Зважити на електричній вазі 1 г листя і перенести у ступку.
2. Додати до ступки 0,5 г крейди та 5 мл спирту.
3. Розтерти рослинний матеріал у ступці до однорідної маси – отримання гомогенату.
4. Перенести гомогенат у мікропробірки. Урівноважити мікропробірки.
5. Відцентрифугувати 10 хв при 7 000 об./хв за кімнатної температури.
6. Розглянути результати центрифугування.
7. Відібрати надосадову рідину (супернатант)

Висновки: _____

вою сировиною для харчової, фармацевтичної та технічних галузей промисловості: текстильної, нафтової, паперової та інших. Крохмаль містить велику кількість залишків глюкози, за рахунок чого швидко відновлює потребу людини в енергії. Втім, при надмірному вживанні крохмалю, надлишок калорій може призвести до розвитку ожиріння.

Крохмаль широко застосовується в харчовій галузі як загущувач (додаток E1404), при виробництві патоки різного вуглеводного складу, для одержання декстринів, кристалічної глюкози, глюкозного концентрату, глюкозно-фруктозного сиропу, етанолу, та інших продуктів бродіння. Будь-яка натуральна молочна чи м'ясна продукція, а також мед, позбавлені крохмалю. Наявність крохмалю у сметані чи меді свідчить про те, що виробник застосує згущувач, але обманює споживача, не вказуючи крохмаль у складі.

Найбільш відомий і доступний спосіб перевірити якість молока та інших продуктів – нанести декілька крапель розчину Люголя на продукт для утворення забарвленого комплексу йоду з амілазою. Якщо колір вийшов синім або фіолетовим, тоді крохмаль присутній. Якщо ж колір не змінився, то крохмаль до складу не входить або його відсоток дуже малий.

Реактиви:

- Зразки сметани та меду (попередньо прогріті)
- Розчин Люголя (розчин йоду в калій йодиді)

Хід роботи

1. 2 мл сметани внести у пробірку.
2. 1-2 г меду внести у пробірку. Додати 5 мл води. Розчинити мед.
- 3.В пробірки із сметаною та медом додати по 1-2 краплі розчину Люголя.
- 4.Зробити висновки з отриманих результатів.

Висновки: _____

В) Визначення нітратів у овочах та фруктах та нітритів у ковбасі

Нітрати – солі нітратної кислоти, які є складовою мінерального живлення рослин, джерелом азоту для побудови білків, нуклеїнових кислот та утворення хлорофілу. Якщо азот надходить в рослину у недостатній кількості, вона має бліде забарвлення і росте повільніше. За надмірної кількості азоту його надлишок відкладається в різних органах рослини. Якщо рослина перебуває в умовах, оптимальних для її життєдіяльності, процес

вою сировиною для харчової, фармацевтичної та технічних галузей промисловості: текстильної, нафтової, паперової та інших. Крохмаль містить велику кількість залишків глюкози, за рахунок чого швидко відновлює потребу людини в енергії. Втім, при надмірному вживанні крохмалю, надлишок калорій може призвести до розвитку ожиріння.

Крохмаль широко застосовується в харчовій галузі як загущувач (додаток E1404), при виробництві патоки різного вуглеводного складу, для одержання декстринів, кристалічної глюкози, глюкозного концентрату, глюкозно-фруктозного сиропу, етанолу, та інших продуктів бродіння. Будь-яка натуральна молочна чи м'ясна продукція, а також мед, позбавлені крохмалю. Наявність крохмалю у сметані чи меді свідчить про те, що виробник застосує згущувач, але обманює споживача, не вказуючи крохмаль у складі.

Найбільш відомий і доступний спосіб перевірити якість молока та інших продуктів – нанести декілька крапель розчину Люголя на продукт для утворення забарвленого комплексу йоду з амілазою. Якщо колір вийшов синім або фіолетовим, тоді крохмаль присутній. Якщо ж колір не змінився, то крохмаль до складу не входить або його відсоток дуже малий.

Реактиви:

- Зразки сметани та меду (попередньо прогріті)
- Розчин Люголя (розчин йоду в калій йодиді)

Хід роботи

1. 2 мл сметани внести у пробірку.
2. 1-2 г меду внести у пробірку. Додати 5 мл води. Розчинити мед.
3. В пробірки із сметаною та медом додати по 1-2 краплі розчину Люголя.

4. Зробити висновки з отриманих результатів.

Висновки: _____

В) Визначення нітратів у овочах та фруктах та нітритів у ковбасі

Нітрати – солі нітратної кислоти, які є складовою мінерального живлення рослин, джерелом азоту для побудови білків, нуклеїнових кислот та утворення хлорофілу. Якщо азот надходить в рослину у недостатній кількості, вона має бліде забарвлення і росте повільніше. За надмірної кількості азоту його надлишок відкладається в різних органах рослини. Якщо рослина перебуває в умовах, оптимальних для її життєдіяльності, процес

засвоєння азоту відбувається повніше. За несприятливих погодних умов, надлишкового і нерационального внесення нітратних добрив, концентрація нітратів у рослині підвищується. У цьому разі можна говорити про надлишкове нагромадження нітратів і розглядати їх вже як чинник забруднення харчових продуктів, а також передумову збільшення нітратних навантажень на організм людини. Самі нітрати не шкідливі, але, надходячи до організму людини, вони відновлюються до отруйних речовин – нітритів. Останні здатні зв'язуватися з гемоглобіном, утворюючи пошкоджену форму гемоглобіну – метгемоглобін, який втрачає здатність зв'язувати та переносити кисень. Також нітрити зв'язуються і блокують активність ферментів, які здійснюють клітинне дихання. Загалом, це спричинює в організмі різні зміни, зокрема стан гіпоксії (кисневе голодування) з відповідними її проявами для кожного органу: порушення діяльності ендокринних органів (зокрема щитовидної залози), серцево-судинної та нервової систем. Окрім того, нітрити здатні пошкоджувати ДНК і спричинювати мутації. Особливо небезпечними нітрити є для дитячого організму.

Різні овочі накопичують нітрати по-різному. Найбільше нітратів накопичують рослини з родини Капустяні – капуста, редька, редиска, буряк, – а також зелені овочі – кріп, петрушка, салат. Натомість, томати, баклажани, солодкий перець, часник, горошок, а також фрукти, мають низький вміст нітратів.

Метод визначення нітратів базується на водній екстракції їх з досліджуваних продуктів, кількісному відновленні нітратів до нітритів і наступному спектрофотометричному визначенні нітритів з реактивом Гріса.

Реактиви:

- стандартні розчини KNO_3 з відомими концентраціями нітрат-йонів NO_3^- ;
- реактив для відновлення нітратів до нітритів, який містить 1 г – BaSO_4 , 0,1 г – MnSO_4 , 0,02 г – Zn , 0,06 г – реактиву Гріса, 0,75 г – лимонної кислоти
- зразки ковбас, овочів та фруктів

Хід роботи

Екстракція нітратів з досліджуваних рослинних продуктів: наважку

(1 г) досліджуваного матеріалу розтирають у фарфоровій ступці за допомогою товкачика з 25 мл дистильованої води (співвідношення наважка: вода - 1:25). Настояють 10 хв та фільтрують. У фільтраті визначають вміст нітратів.

Визначення концентрації нітратів у рослинах

1. У 2 пластикові мікропробірки, які містять по 45 мг реактиву для відновлення нітратів до нітритів, додають по 1,5 мл стандартних розчинів KNO_3 , які містять відому кількість іонів NO_3^- .

1 – 0 мкг NO_3^- (дистильована вода);

2 – 50 мкг NO_3^- ;

2. В пробірку № 3 додають 1,5 мл екстракту з досліджуваного овочу чи фрукту.

3. Всі пробірки закривають та струшують протягом 2 хв. Через 10 хв проби центрифугують 5 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину зливають у чисті скляні пробірки та визначають у ній оптичну густину (поглинання світла забарвленими розчинами) на приладі спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм, обнулюючи спектрофотометр проти проби №1 (яка не містить нітратів).

Обрахунок результатів визначення

Розрахунок результатів аналізу проводять за формулами:

$$\text{А) } C_x = \frac{C_{\text{ст}} \cdot A_x}{A_{\text{т}}}, \text{ де}$$

C_x – маса нітрат-йонів в дослідній пробі, мкг;

$C_{\text{ст}}$ – маса нітрат-йонів (мкг) в стандартному розчині;

$A_{\text{ст}}$ – оптична густина стандартного розчину нітрат-йонів;

A_x – оптична густина досліджуваного розчину.

$$\text{Б) } [\text{NO}_3^-] = \frac{C \cdot V_1}{m \cdot V_2}, \text{ де}$$

$[\text{NO}_3^-]$ – вміст нітрат-йонів в овочі чи фрукті, мг/кг;

m – наважка досліджуваного зразка, г;

V_1 – загальний об'єм фільтрату, мл;

V_2 – об'єм фільтрату, взятий для аналізу, мл.

Розрахунки:

Висновки:

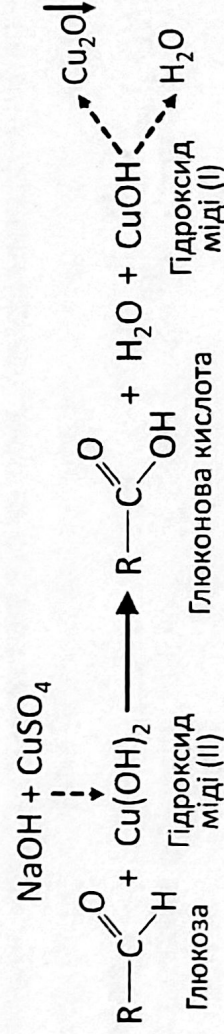
Лабораторна робота №3. Якісні реакції на вуглеводи та білки

А) Якісні реакції на вуглеводи

Теоретичні відомості

Вуглеводи, які містять вільні альдегідні групи, можуть вступати в окисно-відновні реакції. У деяких моно- і дисахаридів у циклічній формі реакційноздатним є глюкозидний (напівацетальний) гідроксил біля першого атома Карбону.

Реакція Тромера полягає в окисленні альдегідної групи вуглеводу з утворенням альдонових кислот при взаємодії з гідроксидом міді (II). При цьому останній відновлюється до гідроксиду міді (I) зі зміною забарвлення розчину із синього на жовтий. Гідроксид міді (I) жовтого кольору при подальшому нагріванні переходить в оксид міді (I) червоного кольору:



При надлишку CuSO_4 у середовищі під час нагрівання може утворюватися оксид міді (II) — осад чорного кольору, який заважає визначенню.

Реактиви

- 1% розчин глюкози
- 1% розчин фруктози
- 1% розчин мальтози
- 1% розчин сахарози
- 1% розчин крохмалю
- 1% розчин невідомого вуглеводу
- 10% розчин NaOH
- 2% розчин CuSO_4

Хід роботи

1. У п'ять пронумерованих пробірок додати:

Пробірка №1 – 1 мл 1% розчин глюкози;

Пробірка №2 – 1 мл 1% розчин фруктози;

Пробірка №3 – 1 мл 1% розчин сахарози;

Пробірка №4 – 1 мл 1% розчин крохмалю;

Пробірка №5 – 1 мл невідомого розчину.

2. У кожен пробірку додати по 1 мл 10% розчину NaOH.

3. Додати краплями 2% розчин або декілька крапель 10% CuSO_4 до утворення блакитного осаду гідроксиду міді.

4. Поставити пробірки на киплячу водяну баню на 3-5 хв.

Результати спостережень записати.

Висновки:

Б) Якісні реакції на речовини білкової природи

Білки – це особливий клас речовин, які є невід'ємною складовою всіх живих організмів. За хімічною структурою білки, або протеїни, – це високомолекулярні азотовмісні органічні речовини, побудовані з амінокислот, які з'єднані між собою пептидними зв'язками. Іншими словами, білки – це високомолекулярні полімери, мономерами яких є амінокислоти. Спільною ознакою для всіх амінокислот є наявність аміної ($-\text{NH}_2$) та карбоксильної ($-\text{COOH}$) груп. До складу природних білків входять 20 α -амінокислот, які кодуються ДНК і називаються протеїногенними або стандартними амінокислотами.

Присутність білків у біологічних об'єктах можна виявити за допомогою кольорових реакцій, зумовлених наявністю в цих органічних біополімерах амінокислот, їх специфічних груп або пептидних зв'язків. Існують універсальні кольорові реакції, характерні для всіх білків незалежно від амінокислотного складу (біуретова, нінгідринова), а також специфічні реакції, у

яких беруть участь тільки певні амінокислотні залишки молекули білка (ксантопротеїнова, Фоля та реакція Паулі).

Реактиви

- 10 та 30% розчини NaOH
- 5% розчин $Pb(CH_3COO)_2$
- 0,5% розчин нігдрину
- 2 % розчин $CuSO_4$

Досліджувані зразки

- 10% розчин яєчного білка;
- молоко;

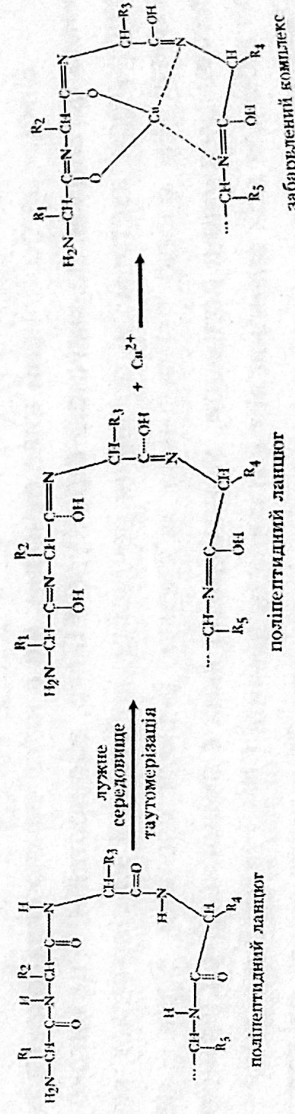
- плазма крові;

-1% розчин желатину (фібрилярний білок сполучної тканини тварин);

1) Біуретова реакція

Позитивну біуретову реакцію можуть давати білки та пептиди, які містяться у молекулі не менше двох пептидних зв'язків. У лужному середовищі йони міді (II) утворюють комплекси з пептидними зв'язками, внаслідок чого розчини білків набувають фіолетового забарвлення з червоним або синім відтінком. Механізм реакції полягає в тому, що при надлишку лугу кетогрупа ($-C=O$) пептидного зв'язку відновлюється до OH -групи. Далі відбувається дисоціація OH -групи, з'являється негативний заряд, за рахунок чого атом кисню взаємодіє з міддю, утворюючи солеподібні зв'язки. Мідь також утворює координаційні зв'язки з атомами азоту пептидного зв'язку. Утворений комплекс стабільний.

Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації білка і йонів міді в розчині.



Хід роботи

1. У три пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів.
2. У кожен із трьох досліджуваних розчинів додати по 1 мл 10% NaOH.
- 3 У кожен із трьох досліджуваних розчинів додати по 0,2 мл 1% розчину сульфату міді (II).
4. За результатами спостережень сформулювати висновки.

ка (ксан-

н);

ци, які
зовищі
к чого
синім
група
ається
атом
також
воре-
міді в



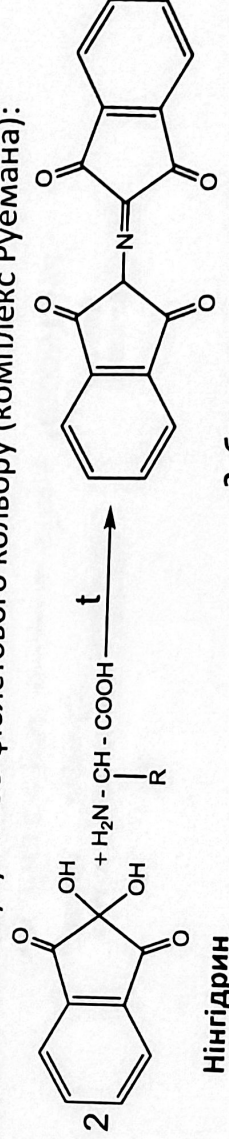
РКС

Н.
1%

Висновки:

2) Нінгідринова реакція (на виявлення альфа-амінокислот)

Реакція властива, як для вільних амінокислот, так і тих, які входять до складу білків та поліпептидів. При кип'ятінні білка з розчином нінгідрину (трикетогіндринденгідрат), амінокислоти окислюються з утворенням вуглекислого газу, аміаку і альдегіду. Нінгідрин при цьому відновлюється. Відновлений нінгідрин з'єднується з аміаком і молекулою окисленого нінгідрину, утворюючи сполуку синьо-фіолетового кольору (комплекс Руемана):



Нінгідрин

Забарвлений комплекс Руемана

Хід роботи

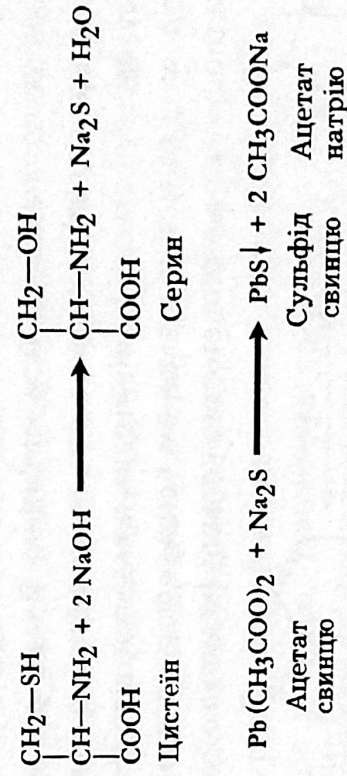
1. У три пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів.
2. У кожен із трьох досліджуваних розчинів додати по 1 мл 0,5% розчину нінгідрину.
3. Суміш кип'ятити 1-2 хвилини.
4. За результатами спостережень сформулювати висновки.

Висновки:

3) Реакція Фоля (на виявлення сірковмісних амінокислот)

Реакція Фоля вказує на наявність у білках, в основному, амінокислоти цистеїну, яка містить сірку. Цистеїн є замінною амінокислотою, яка може синтезуватися у нашому організмі з серину за участю вітаміну В₆. Цистеїн входить до складу білків кератинів, які є складовими нігтів, шкіри і волосся. Крім того, дана амінокислота бере участь у синтезі травних ферментів та важливого клітинного антиоксиданту глутатіону.

Принцип реакції полягає в тому, що сірковмісні амінокислоти білків при нагріванні в присутності NaOH руйнуються з утворенням сульфіді натрію. Останній реагує з іонами свинцю з утворенням чорного осаду сульфіді свинцю:



Хід роботи

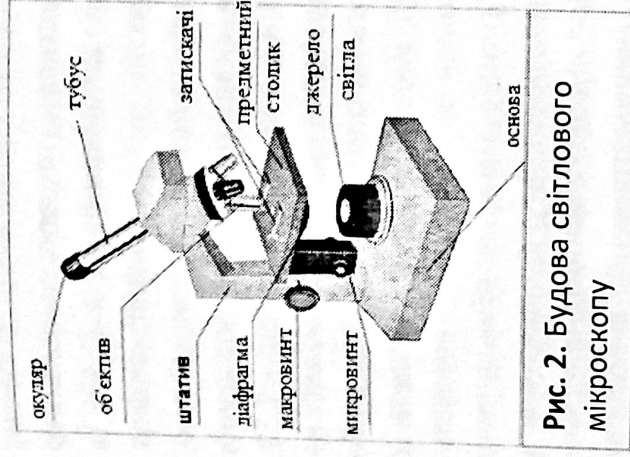
1. У чотири пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів: 10% розчину яєчного білка, синтетичного бульйону, натурального бульйону та 1% розчину желатину.
2. Додати у всі пробірки по 1 мл 30% розчину NaOH.
3. Додати у всі пробірки по три краплі 5% розчину ацетату свинцю.
4. Нагрівати впродовж трьох хвилин на водяній бані або над спиртівкою.
5. За результатами спостережень сформулюйте висновки.

Висновки: _____

Лабораторна робота №4. Морфологія зразків під світловим мікроскопом

Теоретичні відомості. Будова світлового мікроскопу

Неозброєним оком людина може побачити живі об'єкти, розміри яких більші 0,1 міліметра, що відповідає середній товщині волосини. Щоб побачити об'єкти менших розмірів, використовують спеціальні збільшувальні прилади – лупу та мікроскопи. Основною складовою цих приладів є двоопуклі лінзи, які дозволяють збільшити уявне зображення предмета. Принцип роботи світлового або оптичного мікроскопу базується на заломленні світлових променів системою лінз окуляра та об'єктиву, які є компонентами оптичної частини мікроскопу.



Загалом, світловий мікроскоп складається з двох частин – механічної та оптичної. До **механічної частини мікроскопа** входять штатив, предметний столик і тубус (рис. 2). Верхня частина штатива (тубусотримач) може рухатися за допомогою макро- і мікрогвинтів, призначених для грубого і точного фокусування. При обертанні гвинтів за годинниковою стрілкою тубус опускається в напрямку до препарату, при обертанні проти неї – від препарату. Предметний столик, на який поміщають препарат, може рухатися у взаємно перпендикулярних площинах за допомогою спеціальних гвинтів. В його центрі знаходиться отвір для освітлення препарату. На столику вмонтовані два затискачі для закріплення препарату.

Оптична частина мікроскопа складається з освітлювального апарату, об'єктивів і окуляра. До освітлювальної системи, яка знаходиться під предметним столиком, входять дзеркало і конденсор. Один бік дзеркала плоский, інший – увігнутий. Конденсор призначений для фокусування паралельних променів, які йдуть від джерела світла (лампи або сонячного світла), в площину препарату. Тому при роботі з конденсором слід користуватись тільки плоским дзеркалом. Для регулювання інтенсивності освітлення в конденсор вмонтована ірисова (пелюсткова) діафрагма, яка складається зі ставлених серпоподібних пластинок. Для отримання чіткішого зображення досліджуваного об'єкту важливо відрегулювати ступінь розкриття діафрагми. Зафарбовані препарати краще розглядати при майже повній відкритій діафрагмі, незафарбовані – при зменшеному отворі діафрагми.

Об'єктив мікроскопа – це багатолінзова короткофокусна система. Зовнішня лінза, яка обернена до препарату плоским боком, називається фронтальною. Вона забезпечує збільшення. Інші лінзи об'єктива переважно відповідають за корекцію оптичних недоліків, які виникають під час дослідження препаратів. Об'єктиви бувають сухими та імерсійними. Під час роботи із сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом дослідження знаходиться повітря. При роботі з імерсійною системою об'єктив занурюється у краплю рідкого однорідного середовища. У сухому об'єктиві частина світлових променів відхиляється і не потрапляє в око спостерігача через різницю між показниками заломлення скла (1,52) та повітря (1,0). Імерсія (від латинського *immersio* – занурювати) знижує різницю показника заломлення світла на межі з фронтальною лінзою, наближаючи його до показника заломлення скла. Наприклад, показник заломлення світла водою – 1,3, гліцерином – 1,47, а кедровою олією – 1,52, як у скла. Таким чином, використання імерсії дозволяє розглядати об'єкти на великих збільшеннях. Імерсійні об'єктиви мають на оправі чорне кільце або спеціальні позначення для водної чи олійної імерсії. На оправі також є позначення збільшення об'єктива. Крім того, кожен об'єктив характеризується певною величиною робочої відстані. У об'єктивів з малим збільшенням відстань від фронтальної лінзи об'єктива до препарату більша, ніж у об'єктивів із великим збільшенням. В залежності від цього необхідно пильно слідувати якій гвинт, макрометричний чи мікрометричний, використовується при фокусуванні об'єктива. Розглядання препарату рекомендується починати з невеликого збільшення.

Основними технічними характеристиками мікроскопа є збільшення та роздільна здатність. Коефіцієнт збільшення мікроскопа визначається добутком величин збільшення окуляра та збільшення об'єктива. Теоретично мікроскоп може давати збільшення у 2000х та більше разів. Корисне збільшення, при якому ми можемо чітко бачити деталі об'єкта, зазвичай становить трохи більше за 1400х. При більших значеннях, розсіяння світла дрібними структурами всередині об'єкта призводить до розмивання зображення і втрати чіткості. Важливий правильний підбір збільшення об'єктивів та окулярів. Наприклад, для об'єктиву зі збільшенням 40х найкраще брати окуляр 15х, щоб отримати загальне збільшення в межах корисного. Якби при цьому сильніші окуляри не використовувались, виявити тонші структури не вдасться.

Роздільна здатність мікроскопа – це найменша відстань між двома точками на препараті, які можна побачити окремо. Для людського ока роздільна здатність становить близько 0,2 мм. Якщо збільшення мікроскопа залежить від характеристик об'єктива та окуляра, то роздільна здатність – від характеристик об'єктива і конденсора.

Порядок роботи зі світловим мікроскопом

1. Підготувати мікроскоп до роботи. Протерти лінзи окуляра і об'єктива м'якою серветкою, яка не залишає ворси, розмістити лампу та мікроскоп так, щоб було зручно для роботи.
2. Підняти конденсор у максимальне верхнє положення, закрити ірисову діафрагму, вивести світлофільтр. Поставити у робоче положення об'єктив x8.
3. Вийняти окуляр і, дивлячись через тубус у мікроскоп, встановити дзеркало так, щоб джерело світла було чітко видно в центрі поля зору.
4. Встановити окуляр, і, пересуваючи тубус мікроскопа за допомогою макрогвинта, знайти чітке зображення джерела світла. Ввести світлофільтр і відкрити ірисову діафрагму.
5. При роботі з об'єктивами 8x, 40x та 90x конденсор залишити у максимальному верхньому положенні. Ступінь освітлення слід регулювати ірисовою діафрагмою.
6. Покласти предметне скло з препаратом на столик мікроскопа, затиснути його клеммами.
7. При роботі з об'єктивом 40x спочатку знайти зображення об'єкта, користуючись об'єктивом 8x і прикриваючи ірисову діафрагму. Потім, не піднімаючи тубус мікроскопа, перевести в робоче положення об'єктив 40x, злегка відкрити діафрагму і знайти зображення об'єкта, користуючись макрометричним і мікрометричним гвинтами.
8. При роботі з об'єктивом 90x на препарат нанести краплю кедрової олії чи гліцерину. Відкрити повністю ірисову діафрагму.
9. Дивлячись збоку, обережно за допомогою макрогвинта опустити тубус мікроскопа так, щоб лінза об'єктива занурилась в імерсійну рідину і злегка торкнулась поверхні скла. Слід пам'ятати, що при різкому опусканні об'єктива можна розчавити фронтальну лінзу і вивести мікроскоп з ладу.
10. Дивлячись в окуляр, дуже повільно піднімати тубус за допомогою макрогвинта, доки в полі зору не з'явиться зображення досліджуваного об'єкта. Якщо зображення не знайдено, повторити операцію 9 і 10.
11. Поліпшити видимість препарату за допомогою мікрометричного гвинта.
12. Після завершення роботи зняти серветкою кедрову олію чи гліцерин з лінзи об'єктива 90x. Перевести мікроскоп на мале збільшення, дзеркало встановити у вертикальне положення.

А) Виготовлення та аналіз мазків крові людини

До складу крові входить плазма та форменні елементи – еритроцити, лейкоцити і тромбоцити. Основну масу формених елементів становлять еритроцити – червоні клітини крові. Газообмін є основною функцією еритроцитів, який здійснюється завдяки наявності в них дихального пігменту – гемоглобіну. В ссавців еритроцити без'ядерні, ядра зникають на ранній стадії їх розвитку в червоному кістковому мозку. Еритроцити ссавців мають форму двовигнутих дисків і завдяки білку гемоглобіну мають червоний колір. У птахів, риб та рептилій еритроцити овальної форми, мають ядро, розмір їх значно більший. Середня тривалість життя еритроцитів людини складає 100-120 діб.

Кров'яні пластинки – тромбоцити – у крові ссавців є без'ядерними клітинами, а у птахів і всіх інших хребетних мають ядра. Тромбоцити утворюються в червоному кістковому мозку. Тромбоцити виділяють речовини (фактори згортання крові), які необхідні для ущільнення кров'яного згустку.

Лейкоцити – це безбарвні клітини, які беруть участь в імунних реакціях. За розміром вони більші, ніж еритроцити, але їх менше в крові. Живуть лейкоцити від кількох годин до двох тижнів, а деякі форми можуть жити впродовж місяців і років. У крові присутні дві групи лейкоцитів: гранулоцити та агранулоцити. В цитоплазмі гранулоцитів містяться гранули із захисними або гормоноподібними речовинами. Гранулоцити, в свою чергу, поділяють на базофіли, еозинофіли та нейтрофіли. Всі гранулоцити мають витягнуте ядро, яке, до того ж, може бути розділене на декілька частин – сегментів (з віком набуває сегментованої форми). До агранулоцитів належать моноцити та лімфоцити, які мають велике ядро, оточене шаром цитоплазми. Загальною функцією всіх лейкоцитів є захист організму від бактеріальних і вірусних інфекцій, паразитарних інвазій, підтримання тканинного гомеостазу та участь у регенерації тканин. При пошкодженні шкіри лейкоцити направляються із судин у тканини до рани, де захоплюють бактерії і знешкоджують їх (фагоцитоз).

Одним з етапів дослідження лейкоцитів та інших клітин крові є морфологічне дослідження на основі зовнішніх особливостей клітини: величина і форма клітини, забарвлення гранул і цитоплазми, форма ядра та деякі інші характеристики. Такому дослідженню піддаються зафарбовані мазки периферійної крові, препарати кісткового мозку, лімфатичних вузлів, селезінки тощо.

Для мікроскопічного аналізу лейкоцитів необхідно приготувати мазки крові людини. Для виявлення клітин, про які вказано вище, мазки потрібно пофарбувати. У цій роботі пропонується дуже простий метод фарбування – за Папенгеймом. Метод ґрунтується на специфічному зафарбовуванні різних частин клітини барвником еозином, змішаним з метиленовим синім та

азуром. Ядро, яке містить нуклеїнові кислоти, зв'язує переважно основні барвники, такі як метиленовий синій, і зафарбовується у фіолетовий колір. Цитоплазматичні включення мають різне забарвлення залежно від спорідненості до того чи іншого барвника.

Реактиви:

- суміш еозину та метиленового синього (фарба Май-Грюнвальда);
- суміш азуру та еозину (фарба Романовського).

Хід роботи

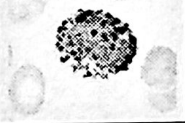
1. Предметні скельця попередньо знежирити у 96% розчині етилового спирту або суміші Нікіфірова (етанол:діетиловий ефір у співвідношенні 1:1).
2. Приготувати мазки крові людини. Для цього невелику краплю крові (~ 2-3 мм у діаметрі) нанести на предметне скельце (на відстані ~1 см від краю) та швидко розтерти шліфувальним склом, поставивши його під кутом 45° до предметного скельця перед краплею крові (рис. 3а, б). При цьому, підвівши скло до краплі, почекати поки кров розпливеться вздовж його ребра. Потім одним швидким легким рухом провести шліфоване скло вперед по всій довжині предметного скла. Правильно зроблений мазок має бути у вигляді комети, тонкий і не повинен торкатися країв скла (рис. 3с). Висушити мазки на повітрі.
3. Фарбування мазків здійснити за Папенгеймом. Для цього близько 1 мл фарби Май-Грюнвальда помістити на мазок, покриваючи його повністю. Через 40 хв фарбу змити водою. Після цього на мазок потрібно рівномірно нанести 1 мл фарби Романовського, покриваючи нею предметне скло повністю. Через 20 хв фарбу змити водою, мазки висушити.
4. Цитологічний аналіз провести під світловим мікроскопом використовуючи імерсійний об'єктив при загальному збільшенні $\times 1000$. Результати аналізу приготовлених мазків крові людини занести в таблицю 1.

Таблиця 1.

Дослідний зразок	Гранулоцити					Агранулоцити	
	Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
			Метамієлоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні		
К-сть							

5. Для кожного мазка проаналізувати відносний вміст всіх видів лейкоцитів (таблиця 2). В результаті такого підрахунку отримаємо **лейкоцитарну формулу** – кількісне співвідношення всіх видів лейкоцитів крові. Для цього на пофарбованому мазку потрібно підрахувати 200 лейкоцитів з наступним обчисленням їх відсоткового співвідношення.

Таблиця 2. Лейкоцитарна формула крові людини (%)

Гранулоцити					Агранулоцити	
Базо-філи	Еозино-філи	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Мета-мієлоцити	Паличко-ядерні	Сегменто-ядерні		
0–1	0,5–5	0–1	1–6	47–72	18–37	3–11
						

Висновки:

Б) Виготовлення та мікроскопічний аналіз препаратів бактерій і дріжджів

Мікроорганізми можна вивчати у живому і неживому (фіксованому) стані. Живі препарати використовують для оцінки життєздатності клітин, виявлення рухливості клітин, спостереження за розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо. Живі препарати можна зафарбовувати без додаткових операцій (вітальне фарбування). Вітальними барвниками є метиленовий синій і нейтральний червоний в концентраціях 0,001–0,0001%. Фіксовані препарати готують у декілька етапів: виготовлення мазка, висушування, власне фіксація та зафарбовування. Фіксація – це, зазвичай, термічна обробка мікроорганізмів, яка дає можливість швидко припинити перебіг життєвих процесів, зберігаючи при цьому тонку структуру клітини. Внаслідок фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще зафарбовуються барвниками. Фіксація є обов'язковою при роботі з патогенними мікробами (для безпеки).

МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ:

Бактерії за формою діляться на кілька груп: сферичні, циліндричні, спіральні, нитчасті і незвичайної форми (рис. 3).

Сферичні бактерії – коки мають форму правильної кулі. Їх розміри знаходяться в межах 1,2-5,0 мкм. Переважно це нерухомі клітини, які не утворюють ендоспор. Вони поділяються на наступні групи.

Мікрококи в природі зустрічаються у вигляді поодиноких клітин.

Диплококи – подвійні коки.

Тетракоки – угруповання чотирьох коків.

Стрептококи – бактерії, які внаслідок поділу клітин у одній площині утворюють різної довжини ланцюжки.

Стафілококи – скупчення коків у вигляді грон винограду.

Сарцини – коки, які діляться у трьох взаємоперпендикулярних площинах, внаслідок чого утворюються пакети з 8, 16, 32 і т.д. клітин.

Найрізноманітнішою та найчисельнішою групою бактерій є **паличкоподібні (циліндричні) форми**. Їх поділяють на дві групи: просто бактерії – нездатні до спорутворення палички і бацили – палички, які утворюють ендоспори.

Бактерії та бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді диплобактерій (диплобацил) та стрептобактерій (стрептобацил) – **нитчасті форми**.

Існують також **звивисті форми**. В залежності від ступеня звивистості розрізняють вібріони, спірили і спірохети.

Вібріони – злегка вигнуті палички у вигляді коми.

Спірили – можуть утворювати один або кілька завитків – у вигляді літер С, S або спіралі.

Спірохети – довгі і тонкі клітини з великою кількістю малих, але крутих завитків, що зумовлене відсутністю твердої стінки і специфічним характером руху. Довжина спірохет перевищує товщину в 5-200 раз

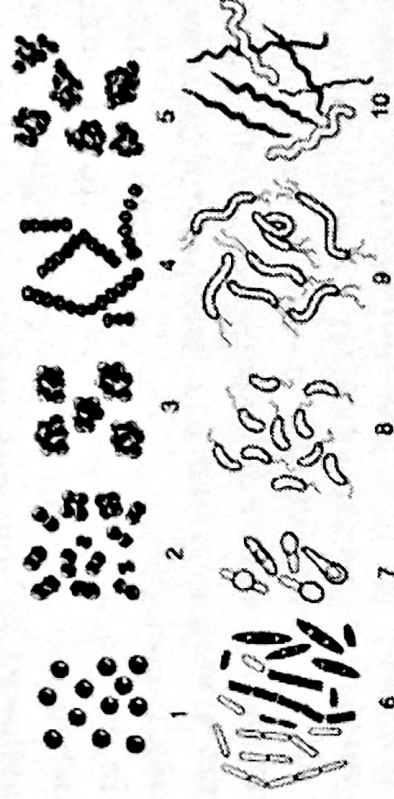


Рис. 4. Основні морфологічні форми бактерій:

1 – монококи; 2 – дипло- та тетракоки; 3 – сарцини; 4 – стрептококи; 5 – стафілококи; 6, 7 – паличкоподібні бактерії; 8 – вібріони; 9 – спірили; 10 – спірохети

Хід роботи

Виготовлення живого препарату “роздушена крапля”

1. На знежирене предметне скельця внести краплю води.
2. Прожареною у полум’ї спиртівки і охолодженою бактеріологічною петлею (або піпеткою Пастера) взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.
3. На отриману суспензію покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
4. Розглянути препарат при збільшенні об’єктиву спочатку 8х, а потім 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.
5. Повторити процедуру лише з додавання до суспензії дріжджів на предметному скельці краплі метиленового синього (зафарбовує мертві клітини). Розглянути при збільшенні 40х.

Завдання: виготовити та розглянути живі препарати пекарських дріжджів. Замалювати форми клітин мікроорганізмів.

Виготовлення фіксованого забарвленого препарату

1. Чисте знежирене предметне скло провести через верхню частину полум'я пальника.
2. На середину скла за допомогою скляної палички нанести краплю води.
3. Прожареною бактеріологічною петлею чи піпеткою внести в неї досліджувану культуру бактерій чи дріжджів і розподілити рівномірно на площі 1-2 см².
4. Препарат висушити, тримаючи скло високо над полум'ям.
5. Зафіксувати препарат, тобто вбити мікроорганізми і забезпечити їх прилипання до поверхні скла. Для цього скло з препаратом провести тричі через верхню частину полум'я пальника (термічна фіксація).
6. Фіксований препарат залити кількома краплями барвника (фуксин основний або метиленовий синій). Розподілити барвник по всій поверхні мазка. Фарбувати препарат фуксином протягом 1-2 хв, а метиленовою синькою – 3-5 хв. Потім фарбу злити, препарат добре промити дистильованою водою.
7. Скло з країв протерти серветкою, препарат висушити. Нанести на сухий препарат краплю кедрової олії і розглядати препарат під мікроскопом (об'єktiv 90х).

Завдання: виготовити і розглянути фіксовані препарати пекарських дріжджів, чайного гриба, настою сіна, молока та бактерій шкіри людини. Замалювати форми клітин мікроорганізмів.

Лабораторна робота №5

Розглядання зразків під флюоресцентним мікроскопом

Теоретичні відомості

Майже всі відкриття в біології клітини були зроблені із застосуванням мікроскопів різних типів. Останнім часом популярними стали флюоресцентна і електронна мікроскопія.

Флюоресцентна мікроскопія – це оптичне дослідження мікрооб'єктів, пофарбованих спеціальними барвниками (флюорохромами), які світяться при опроміненні світлом з певною довжиною хвилі. Явище флюоресценції пов'язане з тим, що деякі речовини збуджуються хвилею світла з певною довжиною, після чого починають випускати промені з більшою довжиною хвилі. Прикладом флюорохромів є барвник акридиновий помаранчевий, який специфічно зв'язується з нуклеїновими кислотами клітини і збуджується синім та синьо-зеленим світлом. При зв'язуванні з дезоксирибонуклеїновою кислотою (ДНК) акридиновий помаранчевий флуоресціює, випромінюючи зелене світло. При зв'язуванні з рибонуклеїновою кислотою (РНК) барвник флюоресціює, випромінюючи червоне світло.

В цитології флюоресцентна мікроскопія дозволяє побачити внутрішню структуру клітини через профарбовування різних її частин (рис. 5). Це також уможливлює вивчення життєвих процесів у динаміці. Зокрема, дослідник здатний побачити розподіл і місцезнаходження невідомого білка в клітині і оцінити зміни його кількості за різних умов. Через, флюоресцентна мікроскопія часто поєднана з гістохімією та цитохімією, експрес-діагностикою, тощо.

За допомогою цього мікроскопу можна оцінювати активність генів. Звісно, що останній підхід тісно пов'язаний з генетичною інженерією, адже досліджувані клітини повинні мати флюорофор. Одними з найбільш розповсюджених флюорофорів є флюоресцентні білки, детально досліджені наприкінці 90-х років минулого століття.

В найпростішому флюоресцентному мікроскопі хвиля збудження утворюється ртутно-кварцові лампи високого тиску, а хвилі з іншими довжинами відсікаються за допомогою світлофільтра. Світло, яке випромінює флюорофор, так само проходить крізь світлофільтр. У складніших флюоресцентних мікроскопах хвиля збудження випромінюється лазером, а зображення також фільтрується складною цифровою камерою.

Матеріали та реагенти

1. Контрольна лінія плодкових мушок і лінія плодкових мушок, які експресують зелений флюоресцентний білок, поміщені в скляні мікропробірки.
2. Калій-фосфатний буфер з концентрацією 50 мілімоль/л (50 мМ).
3. Дві порожні пластикові мікропробірки об'ємом 1,5 мл.
4. Розчин акридинового помаранчевого (0,5 мг/мл) у пластиковій мікропробірці.
5. Автоматичні піпетки на 200 та 20 мкл та змінні пластикові носи́ки до них.
6. Два предметні та покривні скельця.
Не обов'язкові матеріали: імерсійна олія з піпеткою, дистильована вода, планшет для вирощування культур клітин з кількістю чарунок від 6 до 32.

Хід роботи

1. Мушок контрольної та дослідної ліній у скляних мікропробірках кладемо в морозилку (температура – 18-20°C) приблизно на 10-15 хвилин для повного знерухомлення. Доки плодові мушки охолоджуються, проводимо спостереження за клітинами лялечок, в яких фарбуємо ДНК флюоресцентним барвником – акридиновим помаранчевим.
2. П'ять лялечок плодової мушки гомогенізуємо в пластиковій мікропробірці об'ємом 1,5 мл в 150 мкл 50 мМ калій-фосфатного буферу. Буфер додаємо автоматичною піпеткою на 200 мкл. Для гомогенізації використовуємо одноразовий пластиковий товчачик Kontes. Гомогенізуємо декількома несильними натисканнями.
3. Автоматичною піпеткою на 20 мікролітрів відбираємо 25 мікролітрів гомогенату (два рази по 12,5 мкл) і переносимо їх у чисту пластикову мікропробірку. Додаємо до гомогенату 25 мікролітрів розчину акридинового помаранчевого. Перемішуємо розчин акридинового помаранчевого з гомогенатом піпеткою, повільно набираючи і витискаючи суміш в носик піпетки. П'ять рухів достатньо для перемішування.
4. З отриманої суміші відбираємо 30 мікролітрів і переносимо на предметне скло. Краплю суміші накриваємо покривним склом.
5. Тумблером на зовнішньому джерелі живлення вмикаємо ртутну лампу високого тиску у флюоресцентному мікроскопі Evolution LUM LS-8530 для прогрівання.
6. Клітини лялечки розглядаємо під флюоресцентним мікроскопом з використанням зеленого світлофільтра. Препарат можна розглядати

при невеликому збільшенні $\times 160$ (окуляр $16\times$, об'єктив $10\times$) або при збільшеннях $\times 400$, $\times 640$ з використанням масляної або водяної імерсій. При використанні імерсій на поверхню покривного скла наноситься 100 мікролітрів дистильованої води або імерсійної олії, в яку має бути занурений об'єктив.

7. Спочатку потрібно отримати чітке зображення клітин при видимому світлі (положення BF на перемикачі світлофільтрів; має бути включена звичайна лампа розжарювання тумблером на задній стінці мікроскопа). Після наведення чіткості препарату потрібно вимкнути в аудиторії світло, виключити лампу розжарювання мікроскопа і виставити світлофільтр В (світло збудження блакитного кольору).
8. Після закінчення спостереження предметний столик звільняється для наступного препарату. Якщо використовувалась імерсія, об'єктив потрібно ретельно протерти декількома тонкими серветками.
9. Мушок з морозилки поміщаємо на предметне скло (можна використовувати предметне скло з виїмкою або планшет для культур клітин з 6-32 комірками). Препарат розглядаємо, використовуючи світлофільтри В (синє світло збудження і зелений колір флюорофору) та G (зелене світло збудження і червоне світло флюорофору).
10. Записати спостереження.

