

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



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ШКОЛИ
ЮНОГО БІОХІМІКА
«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, 16 с.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дослідження біомолекул живого організму. Наведено основні методи, які на основі виявлення окремих органічних речовин дають змогу оцінити якість продуктів харчування. Також у практикумі наведено основні принципи роботи з дослідження формених елементів крові людини і лабораторних тварин.

Автори-укладачі: к.б.н., доц. Абрят О.Б., д.б.н., проф. Байляк М.М., к.б.н., доц. Господарьов Д.В.

**Схвалено до друку на засіданні
кафедри біохімії та біотехнології
(протокол __ від ____ грудня 2022 р.)**

Рецензенти:

Доцент кафедри та біохімії та біотехнології факультету природничих наук Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, кандидат біологічних наук Володимир ШВАДЧАК

Доцент кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, кандидат біологічних наук Віктор ГУСАК

Організаційний комітет

Доктор біологічних наук, професор Марія БАЙЛЯК
Кандидат біологічних наук, доцент Дмитро ГОСПОДАРЬОВ
Кандидат біологічних наук, доцент Олександра АБРАТ
Кандидат біологічних наук, доцент Віктор ГУСАК
Кандидат біологічних наук, доцент Володимир ШВАДЧАК
Завідувач навчально-науковою лабораторією Марія ЛИЛИК
Старший лаборант Галина ШМІГЕЛЬ
Провідний фахівець Анжеліка ПІТУХ
Аспірант Олег ДЕМ'ЯНЧУК
Аспірант Мар'ян ІВАНОЧКО
Аспірант Віталій БАЛАЦЬКИЙ
Магістрант Віталій ДЕРКАЧОВ

Контактна інформація:

Е-mail: kbh@pnu.edu.ua

<http://kbb.pnu.edu.ua>

Кафедра біохімії та біотехнології, тел. 0342-59-61-71

Зміст

Програма школи	2
Лабораторна робота № 1. Дослідження якості молока та молокопродуктів за біохімічними показниками	3
А. Якісні реакції на вуглеводи	3
Б. Якісні реакції на речовини білкової природи	5
В. Якісні реакції на вітаміни	8
Лабораторна робота № 2. Дослідження якості молока та молокопродуктів за мікробіологічними показниками	9
А. Визначення кількості молочної кислоти	9
Б. Розпізнавання маститного молока	10
Лабораторна робота №3. Морфологія зразків крові під світловим мікроскопом	10
НОТАТКИ	16

ПРОГРАМА ШКОЛИ ЮНОГО БІОХІМІКА

Субота, 10 грудня 2022 року

Адреса: Факультет природничих наук ПНУ,
вул. Галицька 201б (зупинка «Радіозавод»), 6-й поверх, 617 аудиторія

9³⁰ – 10⁰⁰ *Реєстрація учасників.*

10⁰⁰ – 10¹⁵ *Офіційне відкриття школи. Вступне слово від організаторів заходу.*

10¹⁵ – 10⁴⁵ *Короткий екскурс у життя і можливості кафедри біохімії та біотехнології (лекція).*

10⁴⁵ – 11¹⁵ *Екскурсія лабораторіями кафедри.*

11¹⁵ – 11⁴⁰ *ПЕРЕРВА НА ЧАЙ*

11⁴⁰ – 12⁰⁰ *Короткий інструктаж із техніки безпеки. Розподіл учасників на групи.*

12⁰⁰ – 14⁰⁰ *Лабораторні роботи в групах.*

14⁰⁰ – 14³⁰ *ПЕРЕКУС*

14³⁰ – 15¹⁵ *Брейн-ринг*

15¹⁵ – 15⁴⁵ *Заключне слово від організаторів та учасників. Вручення сертифікатів.*

15⁴⁵ – 16⁰⁰ *Фотосесія і відправлення учасників.*

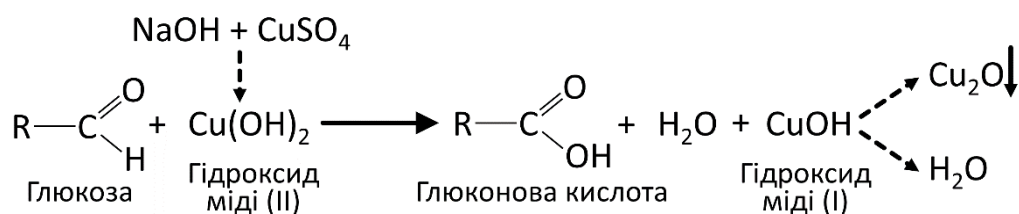
Лабораторна робота № 1. Дослідження якості молока та молокопродуктів за біохімічними показниками

А) Якісні реакції на вуглеводи

1) Реакція Тромера на наявність глюкозидного гідроксилу

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 окисненні 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 крохмалю
1% розчин фруктози	молоко та йогурт
1% розчин мальтози	10% розчин NaOH
1% розчин сахарози	2% розчин CuSO_4

Хід роботи

- 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 №5-6 – по 1 мл молока та питного йогурту відповідно.
- У кожену пробірку додати по 1 мл 10% розчину NaOH.
- Додати краплями 2% розчин або декілька крапель 10% CuSO_4 до утворення блакитного осаду гідроксиду міді.
- Поставити пробірки на киплячу водяну баню на 3-5 хв.
Результати спостережень записати.

Висновки: _____

2) Реакція на наявність крохмалю

Теоретичні відомості

Крохмаль – це запасний рослинний полісахарид, що складається з амілози і амілопектину, мономером яких є глюкоза. Він нагромаджується в результаті фотосинтезу у плодах, зернах, коренях і бульбах рослин. Крохмаль сільськогосподарських культур є компонентом раціону людини, важливою сировиною для харчової, фармацевтичної та технічних галузей промисловості: текстильної, нафтової, паперової та інших. Цей гомополісахарид 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 згущувач (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 застосовує згущувач, але обманює споживача, не вказуючи крохмаль у складі кінцевого продукту.

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

Реактиви:

- Зразки магазинної і домашньої сметани
- Розчин Люголя (розчин йоду в йодиді калію)

Хід роботи

1. По 2 мл зразків сметани
2. внести у пробірки і пропастеризувати (нагріти на водяній бані).
3. В пробірки додати по 1-2 краплі розчину Люголя.
4. Зробити висновки з отриманих результатів.

Висновки: _____

Б) Якісні реакції на речовини білкової природи

Теоретичні відомості

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 амінної ($-\text{NH}_2$) 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, нінгідрінова), а також специфічні реакції, у яких беруть участь тільки певні амінокислотні залишки молекули білка (ксантопротеїнова, Фоля та реакція Паулі).

Реактиви

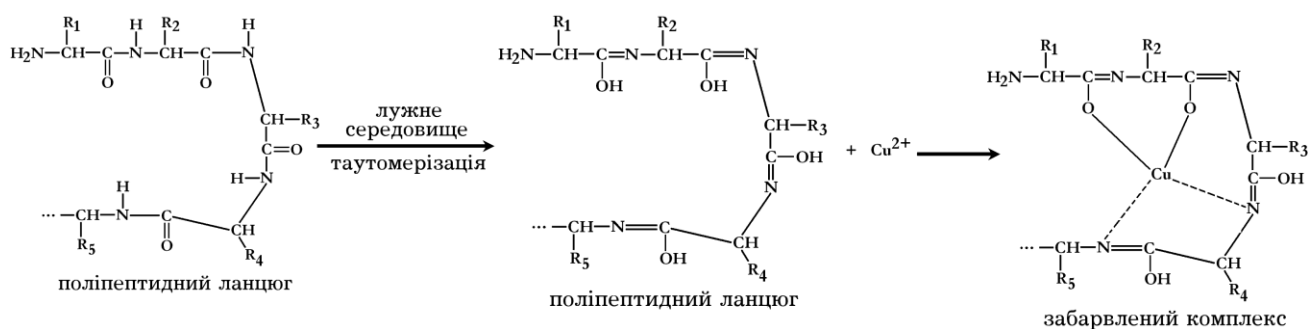
10 та 30% розчини NaOH
5% розчин $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
0,5% розчин нінгідрину
2 % розчин CuSO_4

Досліджувані зразки:
10% розчин яєчного білка
молоко
1% розчин желатину

1) Біуретова реакція

Позитивну біуретову реакцію можуть давати білки та пептиди, які містять 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 ($-\text{C}=\text{O}$) 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.



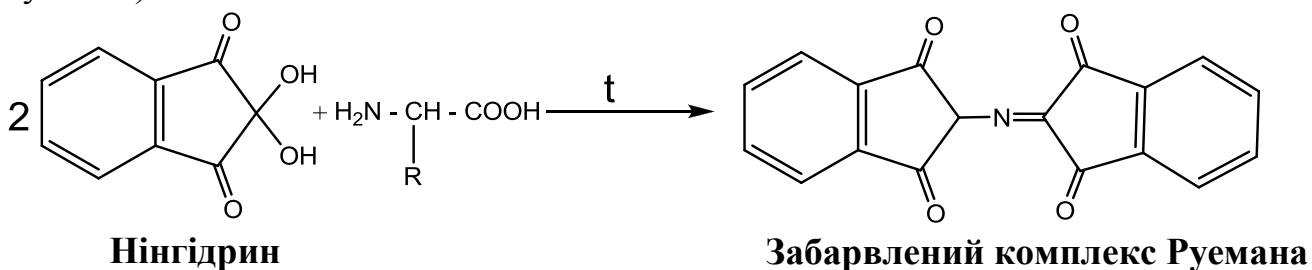
Хід роботи

1. У три пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (білок яйця, молоко, желатин).
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.

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 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 Румана):



Хід роботи

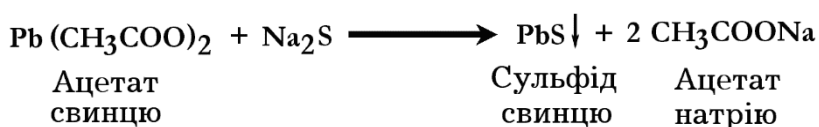
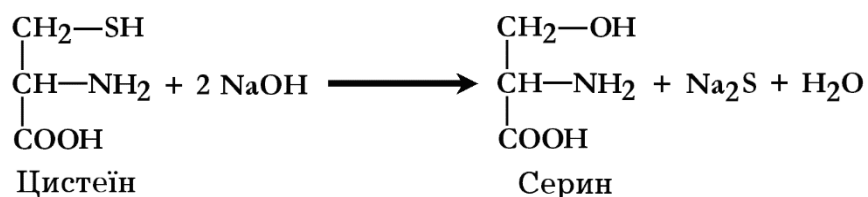
1. У три пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (білок яйця, молоко, желатин).
2. У кожен із трьох досліджуваних розчинів додати по 1 мл 0,5% розчину нінгідрину.
3. Суміш кип'ятити 1-2 хвилини або нагріти над спиртівкою.
4. За результатами спостережень сформулювати висновки.

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 сульфідів натрію. Останній реагує з іонами свинцю з утворенням чорного осаду сульфідів свинцю:



Хід роботи

1. У чотири пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (білок яйця, молоко, желатин).
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: _____

4) Реакція на виявлення казеїногену

Одним з білків молока є казеїноген, який знаходиться у формі аніонів розчинної кальцієвої солі – кальцинат казеїногену. Недисоційовані молекули казеїногену малорозчинні у воді. Ізоелектрична точка казеїногену знаходиться при рН 4,7. Цим пояснюється те, що під час скисання молока до рН 4,7 молоко згортається внаслідок випадання казеїногену в осад.

Реактиви:

Оцтова кислота або ортофосфорна кислота концентрована, молоко.

Хід роботи

До 4 мл молока додати 1-2 краплі концентрованої оцтової кислоти (під витяжною шафою!). Спостерігати випадання осаду та зробити висновок.

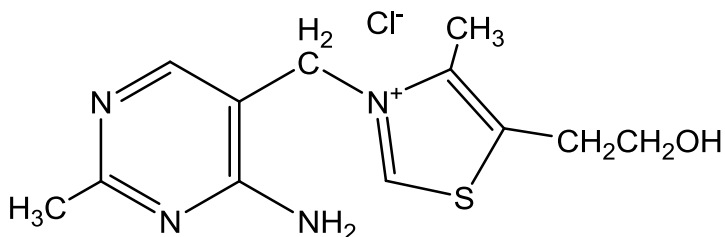
Важливо! Не слід додавати в молоко надлишок кислоти, так як молекули казеїногену перезаряджаються і знову переходять в розчин, що заважає осадженню.

Висновок: _____

В) Якісні реакції на вітаміни

1). Виявлення вітаміну B₁

Вітамін B₁ (тіамін) відіграє важливу роль в організмі, регулюючи обмін білків, жирів і вуглеводів, зокрема він потрібен для нормальної роботи нервової системи та м'язів. Продукти рослинного походження (дріжджі, злаки) багаті на цей вітамін, ніж продукти тваринного походження. Однак у достатній кількості тіамін міститься у печінці, яєчному жовтку та молоці.



Принцип реакції, яка лежить в основі наведеного методу визначення, полягає у здатності тіаміну утворювати в лужному середовищі з діазореактивом (сульфанілова кислота + нітрит натрію) комплекс оранжево-червоного кольору.

Хід роботи

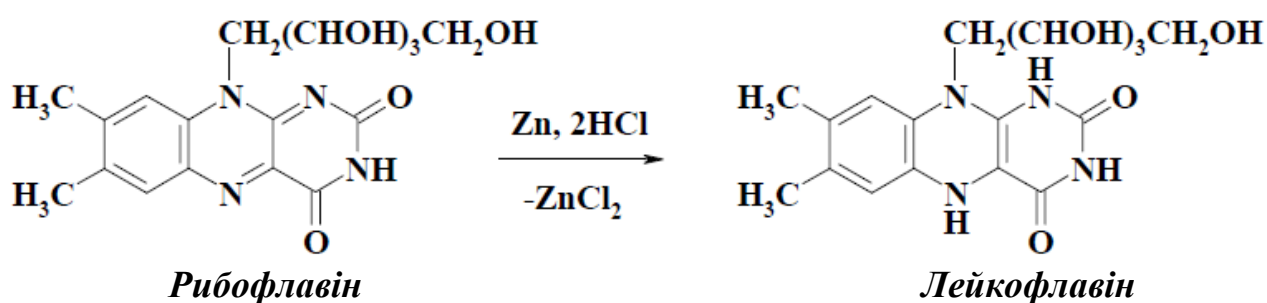
1. У дві пробірки налити по 0,5 мл 1% розчину сульфанілової кислоти та 0,5 мл 5% розчину NaNO₂.
2. У одну пробірку додати 0,2 мл 5% розчину тіаміну, а в іншу – 0,5 мл молока.
3. До обох пробірок обережно по стінці додати по 0,7 мл 10% розчину NaHCO₃.
4. Зробити висновок про наявність вітаміну B₁ у молоці.

Висновок: _____

2). Виявлення вітаміну B₂

Вітамін B₂ (рибофлавін) входить до складу флавінових коферментів, які беруть участь у численних метаболічних процесах у нашому організмі. Він досить поширений у природі та входить до складу практично всіх рослинних та тваринних продуктів. Реакція на вітамін B₂ ґрунтується на його здатності легко відновлюватися. При цьому розчин вітаміну B₂ жовтого забарвлення, набуває

спочатку рожевого кольору за рахунок утворення родофлавіну, а потім знебарвлюється, оскільки відновлена форма вітаміну В₂ (лейкофлавін) безбарвна.



Хід роботи

1. У дві пробірки налити 0,5 мл 0,025% розчину рибофлавіну та 0,5 мл молока відповідно.
2. До обох пробірок додати 0,5 мл 10% розчину HCl.
3. Додати у кожен пробірку одне зернятко Zn.
4. Зробити висновок про наявність вітаміну В₂ у молоці.

Висновок: _____

Лабораторна робота № 2. Дослідження якості молока та молочних продуктів за мікробіологічними показниками

А) Визначення кількості молочної кислоти

Теоретичні відомості

Молочнокисле бродіння – це анаеробне перетворення цукру молочнокислими бактеріями з утворенням молочної кислоти. Молочнокислі бактерії дуже поширені в природі, їх можна знайти скрізь – у повітрі й ґрунті, у молоці і на поверхні овочів та фруктів. Чимало їх є й на поверхні тіла, у кишечнику людини і тварин. Залежно від продуктів, які нагромаджуються під час бродіння, всі молочнокислі бактерії поділяють на дві групи – *гомоферментативні*, що утворюють при зброджуванні цукрів як основний продукт молочну кислоту і незначну кількість інших продуктів (переважно мікроорганізми родів *Streptococcus*, *Pedococcus* і *Lactobacillus*), і *гетероферментативні*, які в процесі зброджування цукрів, крім молочної кислоти, утворюють значну кількість інших речовин: кислоти, спирт, вуглекислий газ тощо (представники родів *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*).

По кількості утвореної молочної кислоти у продуктах можна робити висновок про їхню придатність до використання. Вміст молочної кислоти вимірюють в градусах Тернера (°Т). Під градусами Тернера розуміють кількість мілілітрів 0,1 М розчину NaOH, необхідну для нейтралізації 100 мл молока. Вважають, що допустима кислотність солодкого молока – 15-18°Т, а кисломолочних продуктів – 65-95°Т.

Хід роботи

У хімічну склянку налити 10 мл кисломолочного продукту (йогурту, кефіру) або молока різної свіжості і відтитрувати проби 0,1 М NaOH у присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Визначити процентний вміст молочної кислоти та кислотність продуктів в градусах Тернера (°Т). Обчислення проводити, враховуючи, що 1 мл 0,1 М NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, а 1 мл 0,1 М NaOH, що йде на титрування 100 мл продукту, відповідає 1°Т. На основі отриманого результату зробіть висновок про якість молокопродукту.

Висновок: _____

Б) Розпізнавання маститного молока

Теоретичні відомості

Збудниками маститу (інфекційно-запального процесу молочних залоз) у корів можуть бути різні мікроорганізми. Молоко при цьому змінює смак та в'язкість, а згодом набуває неприємного запаху. Найбільш поширеними збудниками маститу є стафілококи (наприклад, *Staphylococcus aureus*) і стрептококи (наприклад *Streptococcus agalactiae* та *S. haemolyticus*).

Для розпізнавання маститного молока роблять бромтимолові проби, а також проводять бактеріологічні й бактеріоскопічні дослідження.

Хід роботи

В лунку на фарфоровій пластинці внесіть 5 крапель молока і одну краплю 0,2% розчину бромтимолового синього в 60% етанолі. Вміст ретельно перемішайте. Молоко від здорових корів набуває жовтого кольору (рН 6,3-6,5), від маститних корів – зеленого (рН 6,5-7,0) і навіть синього (рН 7,0-7,5). На основі спостережень зробіть висновок.

Висновок: _____

Лабораторна робота №3. Морфологія зразків крові 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** входить штатив, предметний столик і тубус (див. рисунок 1). Верхня частина штатива (тубусотримач) може рухатися за допомогою макро- і мікровинтів, 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 взаємноперпендикулярних 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 площині препарату. Тому при роботі з конденсором слід користуватись тільки плоским дзеркалом. Для регулювання інтенсивності освітлення в конденсор вмонтована ірисова (пелюсткова) діафрагма, яка складається зі сталевих серпоподібних пластинок. Для отримання чіткішого зображення досліджуваного об'єкту важливо відрегулювати ступінь розкриття діафрагми. Зафарбовані препарати краще розглядати при майже повністю 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'єktiv характеризується певною величиною робочої відстані. У об'єktivів з малим збільшенням відстань від фронтальної лінзи об'єктива до препарату більша, ніж у об'єktivів із великим збільшенням. В залежності від цього необхідно пильно слідкувати який 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 2000× та більше разів. Корисне збільшення, при якому ми можемо чітко бачити деталі об'єкта, зазвичай становить трохи більше за 1400×. При більших значеннях, розсіяння світла дрібними структурами всередині об'єкта призводить до розмивання зображення і втрати чіткості. Важливий правильний підбір збільшення об'єktivів та окулярів. Наприклад, для об'єктиву зі збільшенням 40× найкраще брати окуляр 15×, 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'єktiv 8×.
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 8×, 40× та 90× конденсор залишити у максимально верхньому положенні. Ступінь освітлення слід регулювати ірисовою діафрагмою.
6. Покласти предметне скло з препаратом на столик мікроскопа, затиснути його клемами.
7. При роботі з об'єктивом 40× спочатку знайти зображення об'єкта, користуючись об'єктивом 8× і прикриваючи ірисову діафрагму. Потім, не піднімаючи тубус мікроскопа, перевести в робоче положення об'єktiv 40×, злегка відкрити діафрагму і знайти зображення об'єкта, користуючись макрометричним і мікрометричним гвинтами.

8. При роботі з об'єктивом 90× 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 90×. Перевести мікроскоп на мале збільшення, дзеркало встановити у вертикальне положення.

Виготовлення та аналіз мазків крові

До складу крові входить плазма та формені 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 двоввігнутих 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 захищають організм від хвороботворних мікроорганізмів та вірусів. За розміром вони більші, ніж еритроцити, але їх менше в крові. Живуть лейкоцити від кількох годин до двох тижнів, а деякі форми можуть жити протягом 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 формених елементів 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. 2А, В). При цьому, піднісши 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. 2С). Висушити мазки на повітрі.

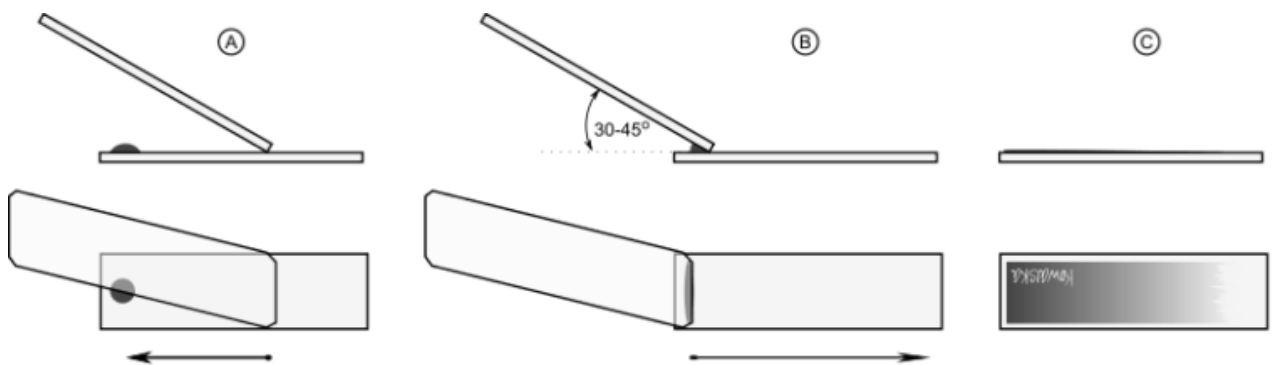


Рис. 2. Приготування мазка крові

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. Провести цитологічний аналіз мазків крові під світловим мікроскопом використовуючи імерсійний об'єктив при загальному збільшенні $\times 1000$. Виявити різні типи формених елементів крові.

Для ілюстративності наводимо фото мазка крові людини (див. рисунок 3) та таблицю із фотографіями різних форм лейкоцитів (білих кров'яних тілець) у мазку крові людини із вказаним їхнім процентним співвідношенням за нормальних умов.

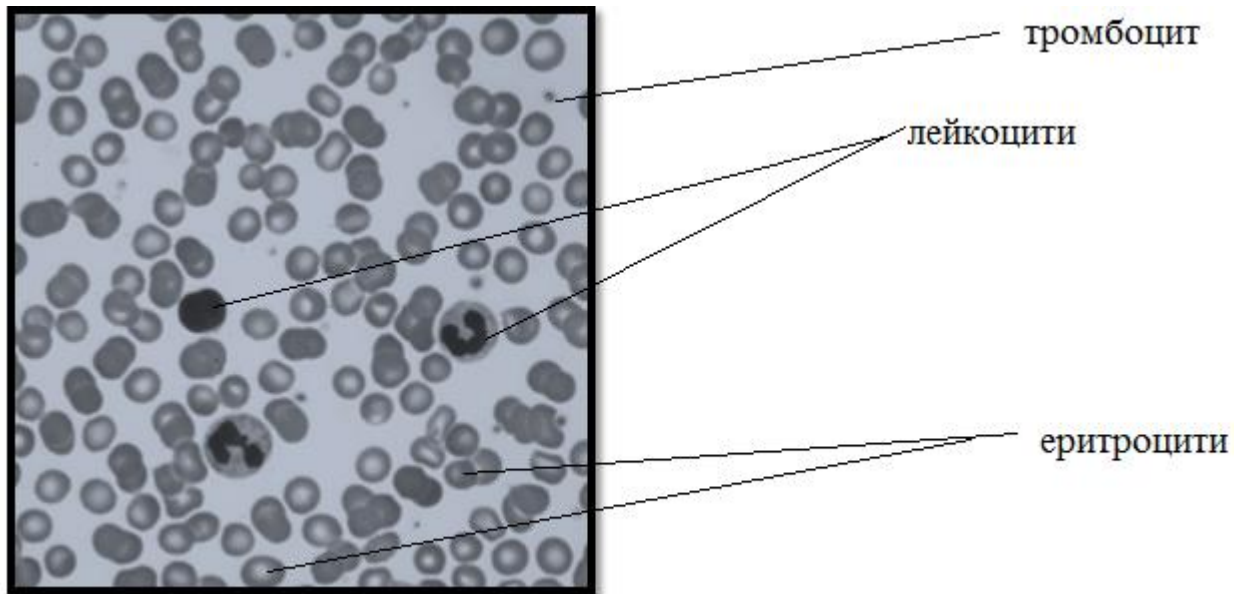
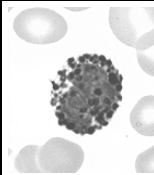
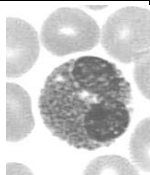
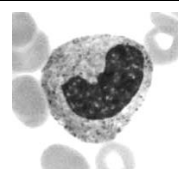
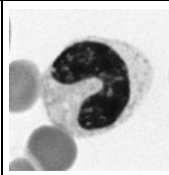
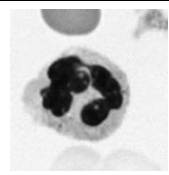
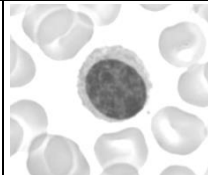
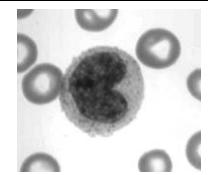


Рисунок 3. Мазок крові людини

Таблиця 1.
Лейкоцитарна формула крові людини (%).

Гранулоцити					Агранулоцити	
Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Метаміелоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні		
0–1	0,5–5	0–1	1–6	47–72	18–37	3–11
						

НОТАТКИ