

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

Факультет природничих наук

Кафедра біохімії та біотехнології



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
X Осінньої школи юного біохіміка
«Дослідники таємниць живого»



Івано-Франківськ

2023

Зміст

Лабораторне заняття № 1. Виготовлення та мікроскопічний аналіз препаратів бактерій і дріжджів

Лабораторне заняття № 2. Якісні реакції на білки

Лабораторне заняття № 3. Поведінкові тести на мишах

Лабораторне заняття № 4. Поведінка тести плодових мушок

Лабораторне заняття № 5. Хроматографія та флуоресценція

Лабораторне заняття № 1

Виготовлення та мікроскопічний аналіз препаратів бактерій і дріжджів

1. Будова світлового мікроскопу та основні правила роботи з ним

Неозброєним оком людина може побачити живі об'єкти, розміри яких більше 0,1 міліметра, що відповідає середній товщині волосини. Щоб побачити об'єкти менших розмірів, використовують спеціальні збільшувачі 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. 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 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 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'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 слідкувати яким гвинтом, макрометричним чи мікрометричним, слід

користуватись 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 $2000\times$ та більше разів. Корисне збільшення, при якому ми можемо чітко бачити деталі об'єкта, зазвичай становить трохи більше за $1400\times$. При більших значеннях збільшення, розсіяння світла дрібними структурами всередині об'єкта призводить до розмивання зображення і втрати чіткості. Варто правильно підбирати об'єктиви та окуляри. Наприклад, для об'єктиву зі збільшенням $40\times$ найкраще брати окуляр $15\times$, щоб отримати загальне збільшення в межах корисного. Які би 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 $8\times$.

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 клемми.

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'єктив 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.

2. Виготовлення препаратів мікроорганізмів

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).

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 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'єктив 90×).

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

Визначення життєздатних клітин пекарських дріжджів

Для оцінки життєздатності дріжджів проводять визначення кількості живих клітин дріжджів з використанням барвника метиленового синього. Метиленовий синій погано проникає у живі клітини, а якщо проникає, то знебарвлюється під дією спеціальних ферментів. Мертві та пошкоджені клітини легко пропускають барвник у середину клітини, тому зафарбовуються у синій колір.

Хід роботи

1. Невелику кількість сухих дріжджів розчинити у дистильованій воді.
2. Внести по краплі отриманої суспензії дріжджів на два предметні скельця. Одне предметне скло із нанесеною суспензією дріжджів нагріти над полум'ям спиртівки.
3. На обидва скельця внести по 1 краплі 0,23%-го розчину метиленового синього. Витримати 5 хв.
4. Накрити краплі суспензій покривними скельцями.
Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
5. Розглянути препарати при збільшенні об'єктиву спочатку 10×, а потім 40×.

Лабораторне заняття № 2

Якісні реакції на білки

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, що 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 (-NH₂) та карбоксильної (-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 Pb(CH₃COO)₂
- 0,5% розчин нінгідрину
- 2% розчин CuSO₄
- 1% сульфанілова кислота
- 0,5% розчину NaNO₂
- 10% розчину Na₂CO₃

Досліджувані зразки

- 10% розчин яєчного білка
- молоко
- 1% розчин желатину
- бульйон

1) Біуретова реакція

Позитивну біуретову реакцію можуть давати білки та пептиди, які містять у молекулі не менше двох пептидних зв'язків. У лужному середовищі іони 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 ОН-групи, далі відбувається дисоціація ОН-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 4 пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (яєчний білок, молоко, желатин, бульйон).
2. У кожен із чотирьох досліджуваних розчинів додати по 1 мл 10% NaOH.
3. У кожен із чотирьох досліджуваних розчинів додати по 0,2 мл 2% розчину сульфату міді (II).
4. За результатами спостережень сформулювати 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 (трикетогідринденгідрат), амінокислоти окислюються з утворенням вуглекислого газу, аміаку і альдегіду. Нінгідрин при цьому відновлюється. Відновлений нінгідрин конденсується з аміаком і молекулою окисленого нінгідрину, утворюючи сполуку синьо-фіолетового кольору (комплекс Руемана):

Хід роботи

1. У 4 пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (яєчний білок, молоко, желатин, бульйон).
2. У кожен із чотирьох 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.

3) Реакція Фоля (на виявлення сірковмісних амінокислот)

Реакція Фоля вказує на наявність у білках амінокислот цистину та цистеїну, які містять сірку. Цистеїн є замінною амінокислотою, яка може синтезуватися у нашому організмі з серину за участю вітаміну В₆. Цистин складається з двох молекул цистеїну, зв'язаних дисульфідним зв'язком. 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 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 4 пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів (яєчний білок, молоко, желатин, бульйон).
2. У кожен із чотирьох досліджуваних розчинів додати по 1 мл 30% розчину NaOH.
3. У кожен із чотирьох досліджуваних розчинів додати по 3 краплі 5% розчину ацетату свинцю.
4. Суміш нагрівати 3 хвилини на водяній бані або над спиртівкою.
5. За результатами спостережень сформулювати висновки.

4) Реакція Паулі (на виявлення амінокислот гістидину та тирозину)

Реакція Паулі дозволяє виявити в білках амінокислоти гістидин та тирозин. Гістидин є умовно незамінною кислотою (незамінна для дітей). Окрім будівельної функції у білках, гістидин використовується для синтезу гістаміну, важливого медіатора запалення та алергічних реакцій. Тирозин належить до замінних амінокислот в організмі людини і може синтезуватися з незамінної амінокислоти фенілаланіну. Спадковий дефект у ферментах синтезу тирозину з фенілаланіну зумовлює захворювання фенілкетонурію, яке супроводжується ураженням нервової системи. Тирозин необхідний для синтезу меланіну (пігменту, що визначає колір шкіри і волосся), а також гормонів щитовидної залози, наднирників та гіпофізу.

Принцип реакції Паулі полягає у тому, що гістидин і тирозин утворюють з діазобензолсульфоною кислотою комплексні сполуки жовто-червоного кольору. Діазобензолсульфонова кислота утворюється в реакції діазотування при взаємодії сульфанілової кислоти з нітритом натрію у кислому середовищі.

Хід роботи

1. У 4 пробірки налити по 0,25 мл 1% розчину сульфанілової кислоти.
2. До кожної пробірки додати по 0,5 мл 0,5% розчину NaNO_2 .
3. Вміст пробірок струсити і швидко додати по 0,5 мл досліджуваних розчинів.
4. Обережно перемішати та додати у кожен з пробірок по 0,5 мл 10% розчину Na_2CO_3 .
5. За результатами спостережень сформулювати висновки.

Лабораторне заняття № 3

Поведінкові тести на мишах

Поведінка – це система реакцій живої істоти на різноманітні подразники навколишнього середовища. Елементарна поведінка притаманна багатьом живим організмам, навіть найпростішим, проте більш складні процеси, такі як тривожна поведінка, депресія, погіршення пам'яті, утворення умовних рефлексів тощо можуть проявлятися лише у більш складних істот. Поведінкові тести на тваринних моделях, зокрема мишах, останніми роками широко використовуються та вдосконалюються. Завдяки таким тестам можна виявити у мишей наявність стресу або розвиток тієї чи іншої хвороби. Моделі розладів головного мозку на гризунах, включаючи нейропсихічні та нейродегенеративні захворювання є важливими для покращення нашого розуміння основної патології та для доклінічного тестування потенційних методів лікування. Поведінкові тести відіграють ключову роль у таких дослідженнях.

1.1. Тест відкритого поля

Тест відкритого поля (Open field test), розроблений Келвіном С. Холлом, є експериментальним тестом, який використовується для визначення загального рівня рухової активності, тривоги та жаги мишей до дослідження. Тест відкритого поля полягає у поміщенні мишей в просторі з відкритими стінами, де вони можуть вільно рухатись. Поведінка мишей (швидкість руху, тривога, частота переходів між зонами, латентність) записується та аналізується з метою вивчення ступеня експлорації (дослідницької поведінки), тривожності та стану психічного здоров'я тварини. Тест відкритого поля можна використовувати для оцінки пам'яті за здатністю тварин розпізнавати нові та старі подразники або об'єкти.

Арена «відкрите поле» є камерою розміром 40×40×40 см, дно якої розкреслено на 16 квадратів (4×4 квадрати). Внутрішні стінки та дно камери мають бути білого кольору або інших кольорів. Квадрати поділяються на дві групи: зовнішні (12 шт. на периферії) та внутрішні (4) у центрі. Кожну тварину

ставлять індивідуально в центральний квадрат відкритого поля і спостерігають за її поведінкою.



зовнішня частина



внутрішня частина

Реактиви та обладнання: спирт 70%, вата, туалетний папір, квадратна арена «відкрите поле», відеокамера, ноутбук, миші.

Хід роботи

1. Кладемо установку для відкритого поля у зручне місце, встановлюємо над нею відеокамеру. Положення установки не повинно змінюватись протягом усього дослідження.
2. Підключаємо відеокамеру до ноутбука, вмикаємо ноутбук і програму для запису.
3. Беремо мишей з віварію, переносимо в кімнату для поведінкових тестів та акліматизуємо їх протягом 20-30 хв перед тестуванням.
4. Беремо мишу, кладемо її у центр відкритого поля та одночасно вмикаємо запис відео.
5. Запис проводиться протягом 10 хв. На цей час слід вийти із кімнати.
6. Далі після 10 хв запису вимикаємо відео, переносимо мишу в домашню клітку та очищаємо установку ватою, промоченою 70% спиртом, протираємо насухо туалетним папером і чекаємо 2-3 хв до повного випаровування спирту.
7. Проводимо пункти 3-6 з наступними мишами.

Інтерпретація результатів. Висока тривожність мишей супроводжується переважанням страху над дослідницькою поведінкою. При цьому зменшується

загальне число відвіданих квадратів, тварина перебуває переважно на периферії камери (ближче до стінок), здійснює менше стійок (ставання на задні лапи). Висока тривожність також супроводжується вегетативними корелятами – збільшенням рівня дефекації та уринації. Інтерпретація грумінга є менш однозначною. Так, зазначені дії можуть бути наслідком як високої (реакція заміщення) так і низької тривожності ("справжня" гігієнічна поведінка).

1.2. Піднесений плюс лабіринт

Піднесений плюс лабіринт – це тест для досліджень тривоги, і поведінки при розладах таких як ПТСР (посттравматичний стресовий розлад) і ЧМТ (черепно-мозкова травма). Модель базується на відразі піддослідної тварини до відкритого простору та схильності до тигмотаксису. Піднесений плюс лабіринт є одним із найбільш використовуваних поведінкових тестів на тривожність. Лабіринт складається з двох відкритих і двох закритих рукавів. Тест спирається на природну схильність тварини перебувати в замкнутих просторах і страх відкритих просторів і висоти. Загалом тварини проводять більше часу в замкнутих рукавах і менше – у відкритих. Наприклад, лікування тривоги антидепресантами потенційно повинно збільшити час у відкритих рукавах і навпаки – піддавання мишей стресам повинно викликати зворотний ефект.

Реактиви та обладнання: спирт 70%, вата, туалетний папір, піднесений плюс лабіринт, відеокамера, ноутбук, миші.

Хід роботи

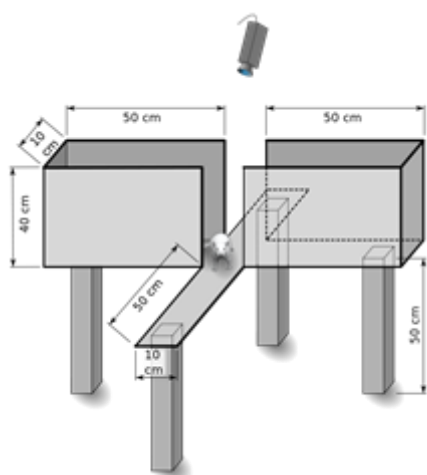
1. Кладемо піднесений плюс лабіринт у зручне місце, встановлюємо над ним відеокамеру. Положення установки не повинно змінюватись протягом усього дослідження.

2. Підключаємо відеокамеру до ноутбука, вмикаємо ноутбук і програму для запису.

3. Беремо мишей з віварію, переносимо в кімнату для поведінкових тестів та акліматизуємо їх протягом 20-30 хв перед тестуванням.

4. Беремо мишу, кладемо її у центр піднесеного плюс лабіринту та одночасно вмикаємо запис відео.
5. Запис проводиться протягом 10 хв. На цей час слід вийти із кімнати.
6. Далі після 10 хв запису вимикаємо відео, переносимо мишу в домашню клітку та очищаємо піднесений плюс лабіринт ватою, промоченою 70% спиртом, протираємо насухо туалетним папером і чекаємо 2-3 хв до повного випаровування спирту.
7. Проводимо пункти 3-6 з наступними мишами.

Інтерпретація результатів. У тесті використовується підвищений у формі плюса (+) апарат з двома відкритими та двома закритими рукавами. Модель



поведінки базується на загальній неприязні гризунів до відкритих просторів. Ця відраза призводить до поведінки, що називається *tigmotaxis*, тобто гризуни намагаються залишатися у закритих просторах або близько до країв обмеженого простору, тобто тварини обмежують своє переміщення до закритого рукава.

Зменшення тривожності позначається у плюс-лабіринті збільшенням частки часу, проведеного на вільному рукаві (без бортиків) (час у відкритому рукаві / загальний час у відкритому і закритому рукавах) та збільшення частки вступу у відкриту ділянку.

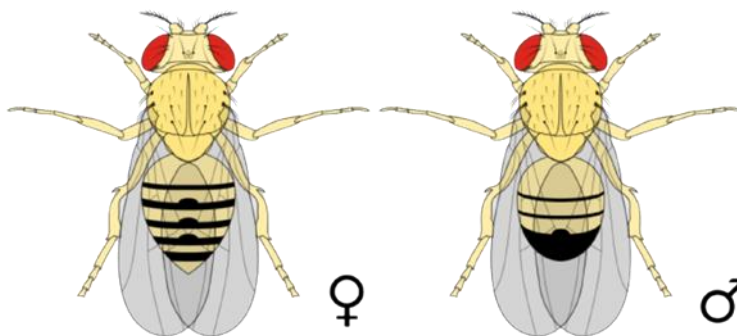
Лабораторне заняття № 4

Поведінкові тести плодових мушок

Понад сотню років плодова мушка – *Drosophila melanogaster*, використовується у різноманітних біохімічних, генетичних та фізіологічних дослідженнях. Мета цієї роботи провести поведінкові тести та ознайомитись з анатомічною будовою та реакцією на подразники *Drosophila*.

Хід роботи

1. Анестезувати мух за допомогою вуглекислого газу.
2. Перенести мух на планшет для поділу.
3. Розділити мух за статтю.
4. Перенести до експериментальних пробірок.



Для *Drosophila melanogaster* притаманний статевий диморфізм. Це відмінності не лише на анатомічному й фізіологічному рівнях, але й на біохімічному, включаючи гормональну регуляцію та метаболізм.

Розуміння біохімічних нюансів дозволяє розшифрувати молекулярні тонкощі, які лежать в основі статевих особливостей і поведінки. Наприклад, наявність або відсутність статевих гребінців на передніх лапках самців мух означає не лише морфологічну відмінність, але й натякає на залучення специфічних генів та сигнальних шляхів.

Крім того, диференціація самців і самок плодових мушок має важливе значення для досліджень, що вивчають вплив статі на генетичну експресію та сприйнятливість до певних захворювань.

Визначення стійкості до холодового стресу

1. Помістити мух у пробірки.

| | Група №1 ♂ | Група №1 ♀ | Група №2 ♂ | Група №2 ♀ |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Кількість мух | | | | |

2. Помістити пробірки у лід на 120 секунд.
3. Витягти пробірки та перенести мух на чашку Петрі.
4. Засікти час моменту виходу із холодової коми (виходом із холодової коми вважається відновлення локомоторної активності мух)



Муха, що перебуває в комі



Функціонально-активна муха

Визначення індукованої рухової активності

1. Відібрати 15 особин кожної статі у довгі, скляні пробірки;

| | Група №1 ♂ | Група №1 ♀ | Група №2 ♂ | Група №2 ♀ |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Кількість мух | | | | |

2. На пробірці зробити позначку на відстані 10 см від дна;
3. Мух обережно струсити на дно та одночасно із цим увімкнути секундомір;
4. Рахувати кожну муху, що перетнула позначку аж поки секундомір не покаже 10 секунд.
5. Зробити висновки.

Лабораторне заняття № 5

Хроматографія та флуоресценція

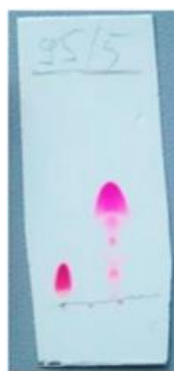
Теоретичні відомості

Хроматографія - це метод розділення сумішей речовин, заснований на різній здатності адсорбуватися ("прилипати") на поверхні певного матеріалу що призводить до того що вони з різною швидкістю змиватися з нього розчинником.

Приклад аналітичної тонкошарової хроматографії полярного (зліва) та неполярного (справа) червоного барвника. Розчинник рухався знизу вгору. Поява другої точки в правому зразку вказує на наявність домішки.

Матеріал на якому речовина сорбується називається "**нерухома фаза**", а розчинник яким змивають з неї – "**рухома фаза**". Нерухома фаза може бути як насипана в скляну чи металеву трубку (**хроматографічна колонка**) так і нанесена тонким шаром на поверхню (**хроматографічна пластинка**). Колонки мають більшу масу сорбенту й застосовуються коли потрібно розділити відносно великі кількості речовини (**препаративна хроматографія**). Пластинки ж використовують коли потрібно розділити тільки невелику кількість – переважно коли хочуть просто встановити склад суміші (**аналітична хроматографія**).

Потік розчинника по нерухомій фазі можна забезпечити за рахунок прокачування насосом (хроматографи високого тиску) або завдяки поступовому



Приклад аналітичної тонкошарової хроматографії полярного (зліва) та неполярного (справа) червоного барвника. Розчинник рухався знизу вгору. Поява другої точки в правому зразку вказує на наявність домішки.

намокання нерухомої фази під дією капілярних сил (аналітична тонкошарова хроматографія). Те яка речовина буде краще триматися за нерухому фазу (повільніше рухатися при хроматографії) залежить від полярності речовини, нерухомої фази та рухомої. Приблизно це можна описати "подібне тримається до подібного". Наприклад на полярній нерухомій фазі (силікагель, папір) краще

затримуються полярні речовини (що містять більше -ОН, -NH₂ груп). Чим полярніший розчинник використовується як рухома фаза, тим швидше рухатиметься речовина (бензин, етилацетат – неполярні розчинники, спирти та вода – полярні).

Якщо речовина забарвлена то те, на скільки вона змістилася можна оцінити візуально. Для того щоб можна було побачити не забарвлені речовини використовують або спеціальні детектори, або хроматографічні пластинки які світяться в УФ світлі (тоді плями речовин видно як темні крапки на світлому фоні).

За допомогою хроматографічного методу можна провести:

- якісний і кількісний аналіз досліджуваної речовини;
- концентрування речовин з дуже розбавлених розчинів;
- розділення складних сумішей органічних і неорганічних речовин;
- розділення і виділення природних речовин;
- очищення речовин від домішок.

Ми будемо виконувати два експерименти типи тонкошарової аналітичної хроматографії: 1) розділення барвників кольорових маркерів на силікагелі та 2) розділення пігментів листків рослин на папері.

Розділення барвників кольорових маркерів на силікагелі

Реактиви та матеріали:

- кілька кольорових маркерів та/або гелевих ручок
- пластини силуфолу (силікагель на фользі з домішкою що світиться в УФ)
- етилацетат, етанол

Хід роботи

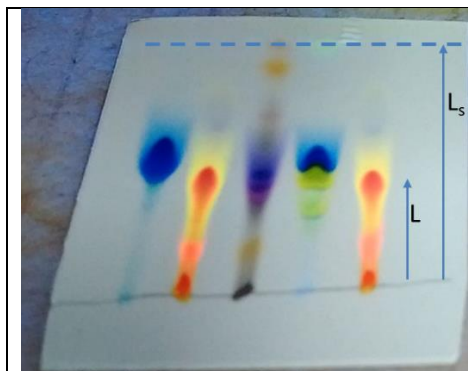
1) Вирізаємо з силуфолу пластинку приблизно $2,5 \times 5$ см.

2) Наносимо на низ пластинки невеликі (1-2мм) точки маркерами з дистанцією 5 мм, 5мм від країв та 5мм від низу.

3) Наливаємо в 100мл стакан 2мл етилацетату, ставимо в нього пластинку (крапки від маркерів не повинні опинитися в розчиннику), накриваємо стакан скляною пластинкою чи фольгою.

4) Чекаємо доки рівень розчинника не добіжить до верху пластини (ідеально зупинити десь за 3мм до верху), витягуємо пластину

5) Дивимося на позиції плям, розглядаємо зміни під УФ лампою. Робимо висновок про склад барвників в маркерах. Порівнюємо відносну рухливість різних барвників (R_f)



$$R_f = L/L_s$$

L – шлях пройдений речовиною

L_s – шлях пройдений розчинником

Висновки:

Розділення пігментів листків росли

Реактиви:

- етанол 96%
- Крейда
- Ацетон
- Різнокольорові листки рослин

Хід роботи

Розтираємо листки у ступці додавши 2-3 мл етанолу 96% та трішки крейди до однорідної маси – отримання гомогенату.

Гомогенат відбрати у пластикову мікропробірку об'ємом 2мл.

Центрифугувати 5 хв при 13 000 об/хв. (не забудьте додати врівноважену мікропробірку для балансу центрифуги)

Відібрати надосадову рідину (супернатант) у чисті пробірки.

У мірний стакан об'ємом 50 мл налити 2 мл ацетону та зробити кришку з фольги.

Вирізати пластинки для проведення хроматографії.

Нанести супернатанти на пластинки та занурити у стакан з ацетоном (важливо, щоб пластинка була під кутом приблизно 45 °С).

Зачекати 1-2 хв поки відбудеться розділення.

Витягнути пластинку та зачекати поки випарується ацетон.

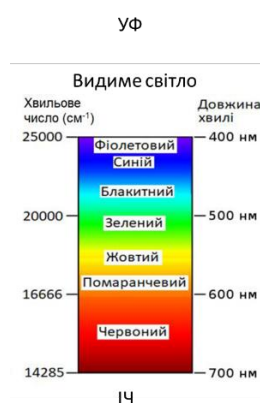
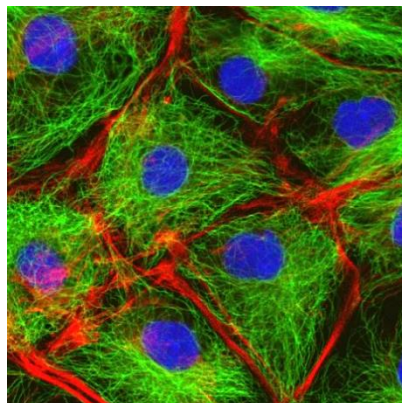
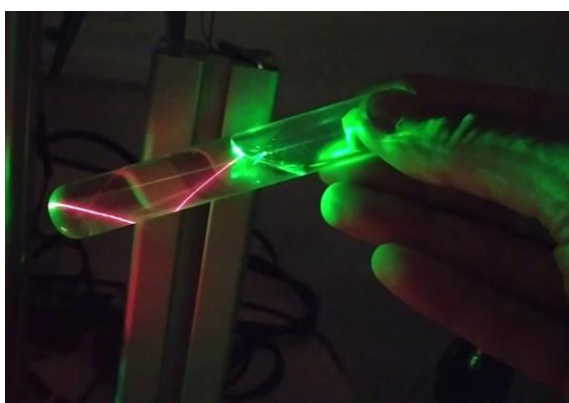
Поглянути на результат хроматографії під звичайний світлом та при опроміненні УФ-випромінюванням. Скільки пігментів було в листку і якого кольору?

Флуоресценція

Флуоресценція це здатність молекули поглинати світло однієї довжини хвилі, а випромінювати світло іншої. Наприклад, коли при збудженні невидимим оком УФ світлом молекула світиться у видимому діапазоні.



Це явище застосовують коли потрібно створити добре помітні об'єкти (наприклад кольорові маркери) або змінити видимий колір об'єкту. Наприклад додавання до дещо жовтого паперу речовини що флуоресціює голубим кольором створює видимість справді білого паперу. Аналогічне оптичне відбілювання застосовують також і для білих сорочок. Окрім того флуоресценція має багато спеціальних застосувань, наприклад спеціальні мітки на грошах. В наукових цілях вона застосовується коли потрібно отримати зображення частин клітини де міститься певна молекула (флуоресцентна мікроскопія) або коли потрібно подивитися на взаємодії конкретних молекул. При флуоресценції довжина хвилі випроміненого світла завжди більша, ніж поглинутого. Наприклад зелене світло може викликати жовту чи червону флуоресценцію, але не синю.



В нашій роботі ми ознайомимося з прикладами флуоресценції різних барвників та краще зрозуміємо природу кольору.