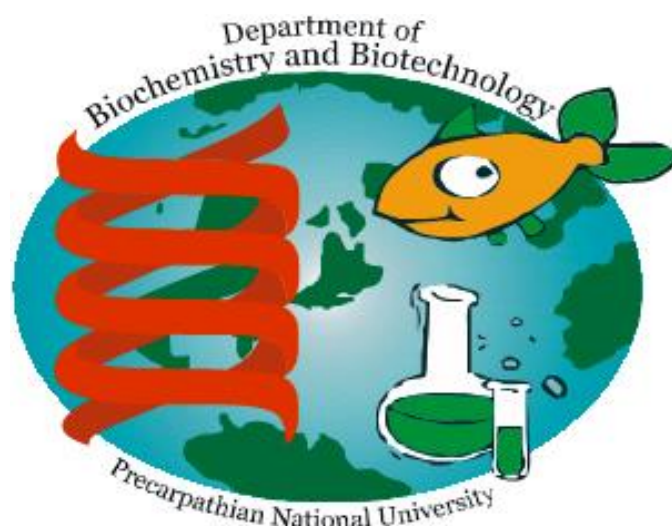


ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя
Стефаника»
Факультет природничих наук
Кафедра біохімії та біотехнології



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



Івано-Франківськ
-2017-

УДК 577.112+577.114+577.16

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Дивовижний світ живого: від теорії до експерименту» / під заг. ред. Н.М. Мосійчук//
Методичні вказівки. 2017. – 22 с.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дослідження біомолекул живого організму. Наведено основні методи приготування мікроскопічних препаратів, правила роботи з мікроскопом, а також реакції для якісного виявлення амінокислот, вуглеводів та вітамінів у біологічному матеріалі.

Під заг. редакцією к.б.н. Мосійчук Н.М.

Автори-укладачі: к.б.н. Мосійчук Н.М., к.б.н., доц. Байляк М.М., к.б.н., викл. Абрам О.Б., к.б.н., доц. Господарьов Д.В., к.б.н. Стамбульська У.Я., к.б.н. Дрогомирецька І.З.

**Схвалено до друку Вченою радою
факультету природничих наук**

Рецензенти:

Професор, завідувач кафедри та біохімії факультету природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», доктор біологічних наук Лушак В.І.

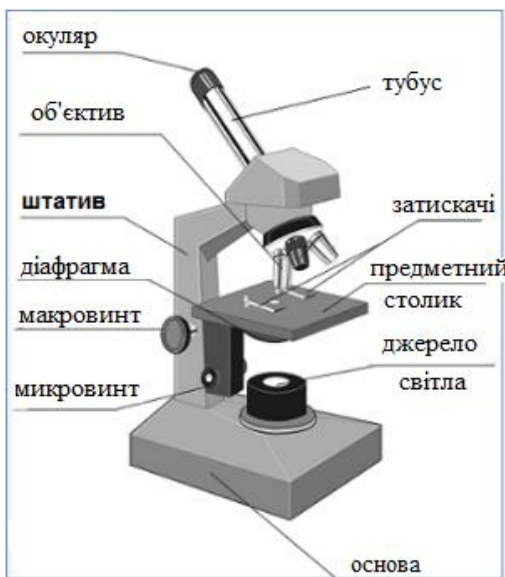
Професор кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», доктор біологічних наук Семчишин Г.М.

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× та більше разів. Корисне збільшення, при якому ми можемо чітко бачити деталі об'єкта, зазвичай становить трохи більше за 1400×. 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'єктива 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'єтивів 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'єтивами 8×, 40× та 90× конденсор залишити у максимальному 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'єтивів 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).

2.1. 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 8×, а потім 40×. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

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

2.2. 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'єktiv 90×).

Завдання: виготовити та розглянути фіксовані препарати пекарських дріжджів, бактерій з розсолу квашеної капусти та настою сіна. Замалювати форми клітин мікроорганізмів.

2.3. 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 8×, а потім 40×.

Спостереження:

Висновки:

Лабораторне заняття № 2 Виготовлення та аналіз мазків крові риби та миші

До складу крові входить плазма та форменні елементи – еритроцити, лейкоцити, тромбоцити. Основну масу їх 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 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 мікробів. 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). 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. Важливою функцією лейкоцитів є захист організму від проникнення хвороботворних мікроорганізмів. При пошкодженні шкіри лейкоцити направляються із судин у тканини до рани, де захоплюють бактерії і перетравлюють їх (фагоцитоз).

У крові риб представлені всі типи клітин, що беруть участь в імунних реакціях у вищих хребетних. На відміну від ссавців, у риб немає кісткового мозку, тому у них в периферійній крові присутні бластні форми лейкоцитів: мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити та метамієлоцити.

Одним з етапів дослідження лейкоцитів та інших клітин крові є морфологічне дослідження. Воно включає низку особливостей клітини: величину і форму клітини, забарвлення гранул і цитоплазми, форму ядра та деякі інші характеристики. Такому дослідженню піддаються зафарбовані мазки периферійної крові, препарати кісткового мозку, лімфатичних вузлів, селезінки тощо.

Мета даної роботи – порівняти лейкоцити теплокровних та холонокровних тварин. Для мікроскопічного аналізу лейкоцитів необхідно приготувати мазки периферійної крові риб та мишей. Для виявлення рис клітин, про які вказано вище, мазки потрібно пофарбувати. В даній роботі пропонується дуже простий метод фарбування – за Паппенгеймом-Крюковим. Метод ґрунтується на специфічному зафарбовуванні різних частин клітини барвником еозином, змішаним з метиленовим синім та азуром Б. Ядро, яке містить нуклеїнові кислоти, зафарбовується у темно-фіолетовий колір метиленовою синькою та азуром Б. Цитоплазма клітин зафарбовується у світло-блакитний колір метиленовою синькою або у світло-рожевий – метиленовим синім та еозином. Еозинофільні гранули фарбуються у яскраво-рожевий колір еозином, а базофільні – метиленовою

синькою та азуром Б у темно-синій або фіолетовий колір. Еозинофільні гранули містять білки, тоді як у базофільних переважає гістамін – гормоноподібна сполука, яка походить від амінокислоти гістидину.

Реактиви:

- суміш еозину та метиленового синього (фарба Май-Грюнвальда);
- суміш азуру Б 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 периферійної крові риб та мишей (рис. 1). 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. 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. Висушити мазки на повітрі.



Рис. 1. Приготування мазка крові.

3. Фарбування мазків здійснити за Паппенгеймом-Крюковим. 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 $\times 1000$. При цьому для кожного мазка проаналізувати відносний вміст всіх видів лейкоцитів (таблиця 1). В результаті такого підрахунку отримаємо **лейкоцитарну формулу** – кількісне співвідношення всіх видів лейкоцитів периферійної крові. Для цього на пофарбованому мазку потрібно підрахувати 200 лейкоцитів з наступним обчисленням їх відсоткового співвідношення.

Таблиця 1. Лейкоцитарна формула периферійної крові мишей (%).

Гранулоцити					Агранулоцити	
Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Мета-мієлоцити	Паличко-ядерні	Сегментоядерні		
0–1	0,5–5	0–1	1–6	47–72	18–37	3–11
						

5. Результати аналізу приготвлених мазків крові мишей та риб занести в таблицю 2.

Об'єкт дослідження	Бластні форми				Гранулоцити					Агранулоцити	
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
							Метамієлоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні		
Кров миші											
Кров риби											

БІЛКИ

Лабораторна робота № 3 Дослідження складу яєчного білка та желатину

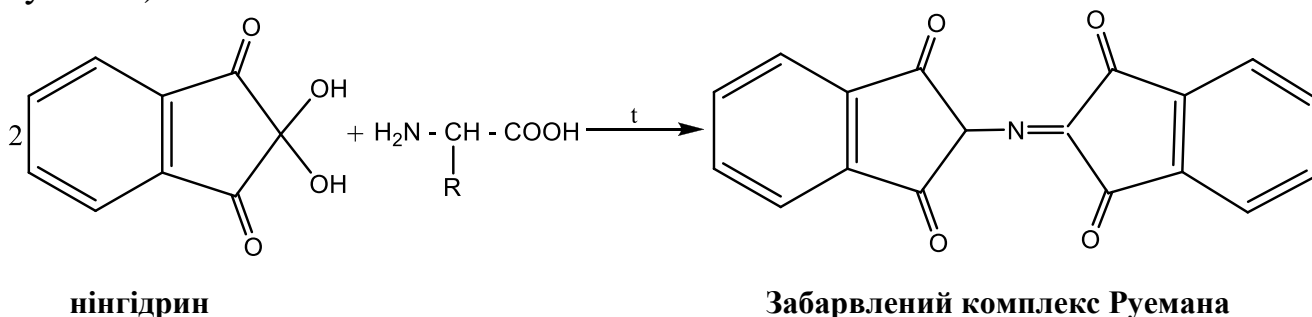
Білки – це органічні речовини, які входять до складу всіх живих істот, включаючи віруси. Білки є полімерами, тобто являють собою великі молекули, які складаються великої кількості менших за розміром молекул – мономерів. Мономерами білків є амінокислоти, які в молекулі білка з'єднані між собою пептидними зв'язками. Спільною ознакою для всіх амінокислот є наявність амінної ($-\text{NH}_2$) та карбоксильної ($-\text{COOH}$) груп. Відрізняються амінокислоти тільки бічним радикалом (R), який може містити додаткові аміно- та карбоксильні групи, а також специфічні групи, такі як гідроксильна, бензольне кільце або атоми сульфуру.

Хід роботи

1. У 2 пробірки налити по 1 мл досліджуваних зразків.
2. Додати по 2 мл 10% NaOH.
3. Додати по 0,1 мл 2% розчину сульфату міді (II).
4. Результати спостережень занести до таблиці 3.

3.2. 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):



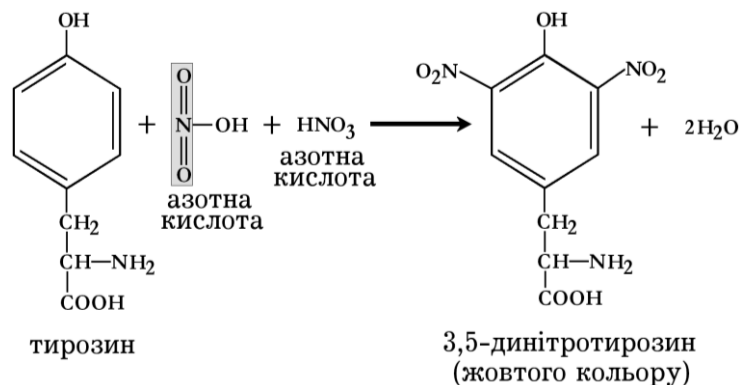
Хід роботи

1. У 2 пробірки внести по 1 мл досліджуваних зразків.
2. Додати по 1 мл 0,5% розчину нінгідрину.
3. Суміш кип'ятити 1-2 хвилини.
4. Результати спостережень занести до таблиці 3.

3.3. Ксантопротейнова реакція (на виявлення ароматичних амінокислот)

Ксантопротейнова реакція застосовується для визначення наявності ароматичних амінокислот: триптофану, фенілаланіну, тирозину. Ароматичні амінокислоти входять як до складу білків і є попередниками багатьох нейромедіаторів (наприклад, серотоніну) та гормонів (наприклад, адреналіну).

В цій реакції залишки амінокислоти тирозину, наявні в білку, взаємодіють з нітратною кислотою з утворенням динітротирозину. Динітротирозин має жовтий колір, який після додавання лугу переходить в оранжевий.



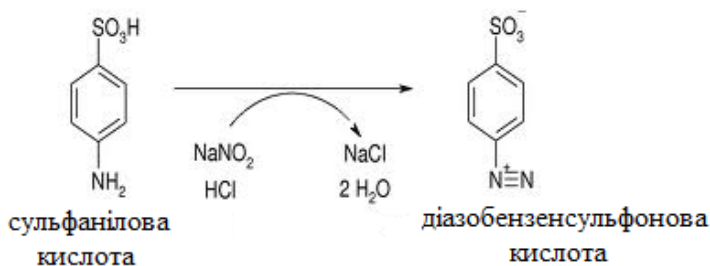
Хід роботи

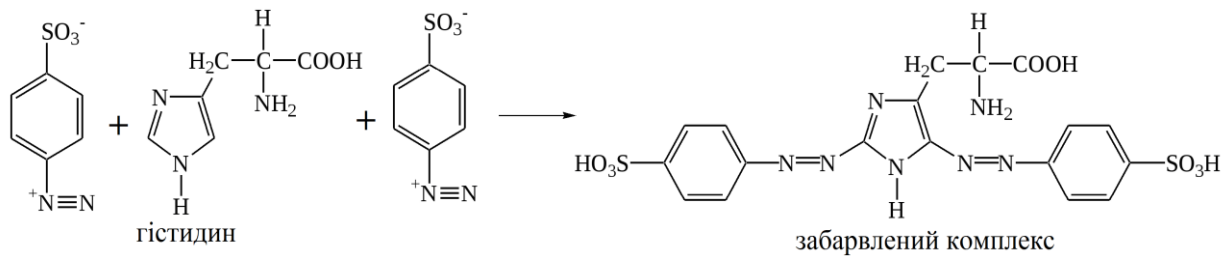
1. У 2 пробірки внести по 1 мл досліджуваних зразків.
2. Додати по 0,5 мл концентрованої HNO_3 .
3. Обережно нагріти на водяній бані.
4. Охолодити та додати по 2 мл 10 % розчину NaOH .
5. Результати спостережень занести до таблиці 3.

3.4. 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 фенілкетонурию, 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.





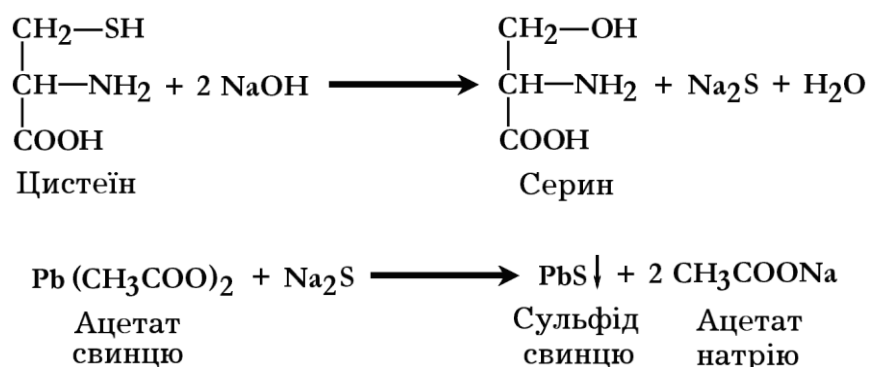
Хід роботи

1. У 2 пробірки налити по 0,25 мл 1% розчину сульфанілової кислоти.
2. Додати по 0,5 мл 0,5% розчину NaNO_2 .
3. Вміст пробірок струсити і швидко додати по 0,5 мл досліджуваних зразків.
4. Перемішати та додати по 0,5 мл 10% розчину Na_2CO_3 .
5. Результати спостережень занести до таблиці 3.

3.5. 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 B_6 . 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 амінокислоти (цистин і цистеїн) 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 дві пробірки налити по 1 мл досліджуваних зразків.
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.
5. Результати спостережень занести в таблицю 3.

Таблиця 3

Назва реакції	Спостереження	Чим зумовлена реакція
<i>Біуретова</i>		
<i>Нінгідринова</i>		
<i>Ксантопротеїнова</i>		
<i>Паулі</i>		
<i>Фоля</i>		

ВУГЛЕВОДИ

Вуглеводи – це органічні сполуки, які за хімічною природою є полігідроксиальдегідами чи полігідроксикетонами. Вуглеводи є джерелом енергії для клітин всіх живих організмів. Вони також входять до складу клітинної стінки бактерій, рослин та грибів. Вуглеводи можуть входити і до складу певних білків – глікопротеїнів. Багато глікопротеїнів знаходяться на поверхні тваринних клітин, беручи участь у взаємному розпізнаванні клітин. Вуглеводи можуть бути полімерами. За кількістю мономерів, виділяють три основні класи вуглеводів: моносахариди, олігосахариди і полісахариди. *Моносахариди* або прості вуглеводи – це похідні багатоатомних спиртів, які містять альдегідну або кетонну групу. Найпоширеніші в природі моносахариди – глюкоза та фруктоза. *Олігосахариди* – це коротколанцюгові молекули, що складаються з 2-10 моносахаридних одиниць, з'єднаних глікозидними зв'язками. Найпоширенішими серед них є дисахариди, що містять дві моносахаридні одиниці. Типовими представниками дисахаридів є сахароза (тростинний чи буряковий цукор), мальтоза та лактоза. *Полісахариди* – складаються з десятків та сотень моносахаридів, які зв'язуються один з одним глікозидними зв'язками та утворюють лінійні або розгалужені ланцюги. Полісахариди поділяються на гомополісахариди, які складаються тільки з моносахаридних одиниць одного типу, і гетерополісахариди, які містять два і більше типів моносахаридних одиниць. До найбільш відомих гомополісахаридів належать целюлоза, крохмаль, глікоген та хітин, до гетерополісахаридів – гіалуронова кислота та гепарин.

Реактиви

цукор	10% розчин NaOH
Натуральний мед	2% розчин CuSO ₄
Цукрозамінник	Реактив Селіванова: 0,5% розчин резорцину в 20% HCl
1% розчин крохмалю	10% розчин H ₂ SO ₄
Розчин Люголя	Na ₂ CO ₃ сухий
(0,1 % р-н I ₂ в 1 % р-ні KI)	2% розчин CoSO ₄

Лабораторна робота № 4

Порівняння вуглеводного складу цукру, меду та цукрозамінників

Тростинний чи буряковий цукор за хімічною структурою належить до дисахаридів і складається з двох компонентів – глюкози і фруктози, які поєднані глікозидним зв'язком. В організмі сахароза розщеплюється на складові частини і служить джерелом швидкої енергії.

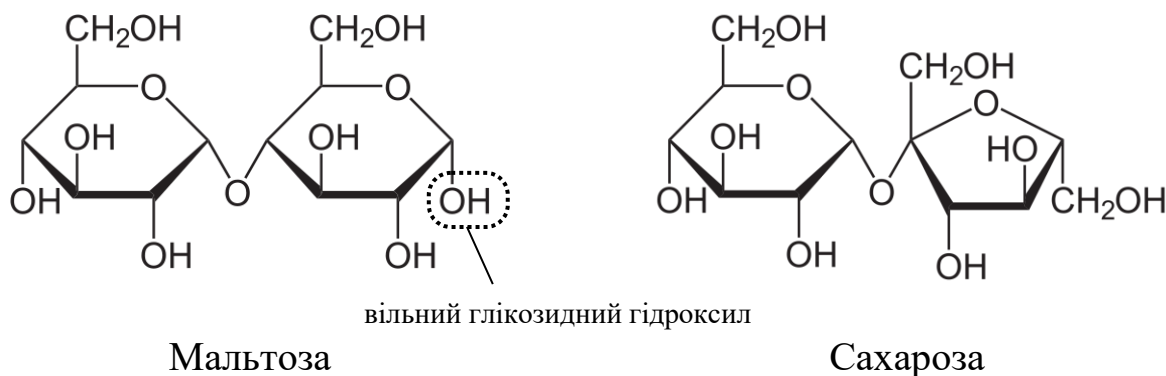
У складі натурального меду вуглеводи займають близько 86%. Серед них основними компонентами є моносахариди – глюкоза (35%) і фруктоза

(40%). Інші складові вуглеводної природи – складні оліго- і дисахариди, в тому числі сахароза. Вміст останньої у складі меду – в середньому 3%. Основна відмінність меду від цукру полягає в тому, що організм практично не потребує додаткових затрат енергії, щоб розщепити складніші вуглеводи до простих, як у випадку цукру.

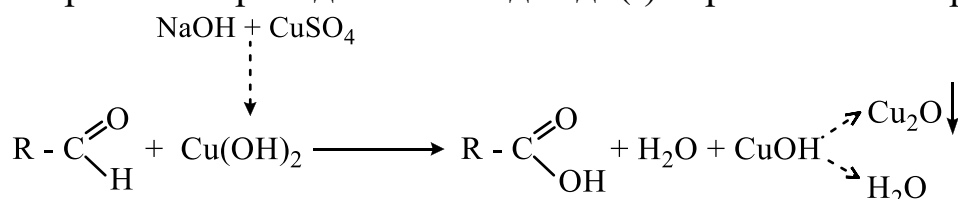
В даний час багато людей хворих на цукровий діабет споживають цукрозамінники. Серед сучасних цукрозамінників виділяються дві групи – натуральні та штучні (синтетичні). Натуральні цукрозамінники (фруктоза, ксиліт, сорбіт, сироп агави, стевія) не шкідливі для організму та беруть участь у процесах метаболізму подібно до цукру. Синтетичні підсолоджувачі (сахарин, цикламат, аспартам, сукразит) не мають ніякої енергетичної цінності і не беруть участь у процесах обміну речовин. За хімічною будовою вони не є вуглеводами. Крім того, тривале вживання цукрозамінників може мати негативні наслідки для організму. Велику кількість цукрозамінників додають до безалкогольних газованих напоїв.

4.1. Реакція Тромера

Вуглеводи, такі як глюкоза та фруктоза, містять вільні альдегідні групи та 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:



Хід роботи

1. У три пронумеровані пробірки додати:

Пробірка №1 – 1 мл розчину цукру;

Пробірка №2 – 1 мл розчину меду;

Пробірка №3 – 1 мл розчину цукрозамінника.

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

3. По краплях додати 2% розчин CuSO_4 до утворення голубого осаду гідроксиду міді (при надлишку CuSO_4 у середовищі під час нагрівання може утворюватися оксид міді (II) – осад чорного кольору, який заважає визначенню).

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

5. Результати спостережень занести в таблицю.

№ проб	Досліджуваний розчин	Колір після нагрівання	Висновки
1	Цукор		
2	Мед		
3	Цукрозамінник		

4.2. Гідроліз сахарози

При нагріванні з кислотами або під дією ферменту сахарози (інвертази) відбувається гідроліз сахарози з утворенням вільної глюкози і фруктози, які можна виявити у реакції Тромера.

Хід роботи

1. У пробірку налити 1 мл розчину цукру та 0,5 мл 10% H_2SO_4 .

2. Поставити пробірку на киплячу водяну баню на 1-3 хв.

3. Після охолодження нейтралізувати розчин у пробірці сухим Na_2CO_3 до припинення виділення газу.

4. Додати 1 мл 10% розчину NaOH.

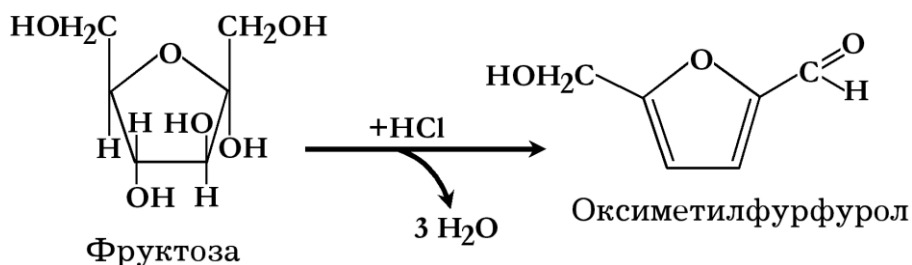
5. По краплях додати 2% розчин CuSO_4 до утворення голубого осаду гідроксиду міді.

6. Нагріти пробірку на водяній бані 3-5 хв.

Спостереження та висновки:

4.3. Виявлення фруктози (реакція Селіванова)

Принцип якісної реакції Селіванова ґрунтується на здатності кетоз у вільному стані реагувати з концентрованою соляною кислотою. У випадку фруктози ця реакція проходить з утворенням оксиметилфурфуролу:



Оксиметилфурфурол в присутності резорцину при нагріванні дає продукти конденсації, які мають червоне забарвлення.

Хід роботи

1. У три пробірки додати:

Пробірка №1 – 1 мл розчину цукру;

Пробірка №2 – 1 мл розчину меду;

Пробірка №3 – 1 мл розчину цукрозамінника.

2. У кожен пробірку додати по 2 мл реактиву Селіванова.

3. Вміст пробірок перемішати і помістити у водяну баню на 5 хв.

Висновки:

4.4. Виявлення сахарози

Сахароза (або звичайний цукор) є найпоширенішим дисахаридом у нашому раціоні. Вона складається з моносахаридів глюкози і фруктози. При взаємодії з іонами кобальту Co^{2+} в лужному середовищі сахароза утворює сполуку фіолетового забарвлення.

Хід роботи

1. У три пробірки додати:

Пробірка №1 – 2 мл 1% розчин сахарози.

Пробірка №2 – 2 мл 1% розчин мальтози.

2. У кожен пробірку додати по 1 мл 5% розчину NaOH.

3. У кожен пробірку додати по 2 краплі 2% CoSO_4 .

4. Вміст пробірок струсити.

Висновки:

Лабораторна робота № 5

Кислотний та ферментативний гідроліз крохмалю

Крохмаль – рослинний гомополісахарид, який складається з двох фракцій – амілози та амілопектину. Амілоза – лінійний полісахарид, молекули якого містять від 200 до 1000 мономерів (залишків глюкози), тоді як амілопектин – розгалужений полісахарид із залишків глюкози. При додаванні йоду амілоза зафарбовується в синій колір, а амілопектин – у червоно-фіолетовий. Поява синього забарвлення зумовлена утворенням комплексу (клатрату), в якому частинки йоду («молекули-гості») вбудовуються в кристалічну структуру амілози («молекул-господарів»).

При нагріванні крохмалю з мінеральними кислотами або при дії ферментів амілаз, які містяться у слині та шлунковому соці, відбувається гідроліз з утворенням проміжних продуктів розпаду – декстринів, – та кінцевих – дисахариду мальтози і моносахариду глюкози. Продукти гідролізу не дають інтенсивного синього забарвлення при взаємодії з йодом.

Хід роботи

1. У дві пробірки додати:

Пробірка №1 – 3 мл 1% розчину крохмалю та 1 мл 10% H_2SO_4 ;

Пробірка №2 – 3 мл 1% розчин крохмалю та 1 мл слини;

2. Вміст пробірок перемішати та помістити на 15 хв на водяну баню з температурою $38^{\circ}C$.

Через кожні 5 хв інкубації здійснювати відбір частини суміші і у кількості 2 краплі переносити у підготовлені пробірки, які містять розчин йоду.

3. Результати спостережень занести в таблицю.

№ проб	Час інкубації	Колір з розчином I_2		Продукт гідролізу
		10% H_2SO_4	Слина	
1	0 хв			
2	5 хв			
3	10 хв			
4	15 хв			

Для доведення повноти гідролізу, у суміші після 15 хв інкубації провести якісну реакцію Тромера на вуглеводи.

Хід роботи

1. У чисті пробірки відібрати по 0,5 мл гідролізату.

2. У кожену пробірку додати по 0,5 мл 10% розчину $NaOH$.

3. По краплях додати 2% розчин $CuSO_4$ до утворення голубого осаду гідроксиду міді.

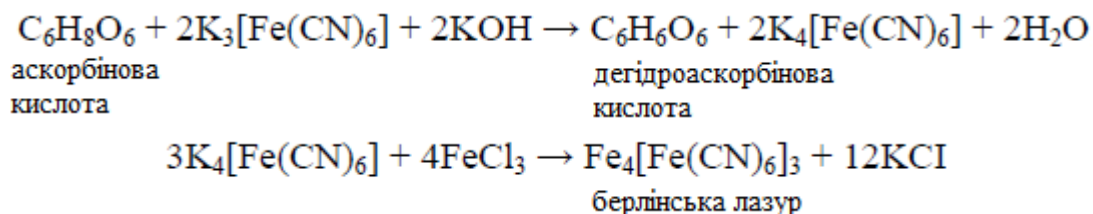
4. Поставити пробірки на водяну баню на 3-5 хв.

ВІТАМІНИ
Лабораторна робота № 6
Визначення вітаміну С у фруктах та овочах

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, що мають різноманітну хімічну природу та є вторинними метаболітами здебільшого рослин і грибів. Проте деякі вітаміни можуть утворюватися в організмі тварин. Розрізняють водорозчинні вітаміни (С, Р, В₁–В₁₂, РР) та жиророзчинні вітаміни (А, D, Е, К, F). Вітаміни відносяться до незамінних факторів харчування людини, оскільки вони не синтезуються нашим організмом (окрім вітаміну D), але необхідні для нормальної життєдіяльності. Більшість вітамінів міститься в достатній кількості у звичайних продуктах харчування тваринного і рослинного походження – овочах, фруктах, соняшниковій олії, м'ясі, печінці, яйцях, різних крупах та ін. Для виявлення вітамінів у харчових продуктах і біологічних об'єктах використовуються якісні реакції.

Вітамін С (аскорбінова кислота) є потужним водорозчинним антиоксидантом, має важливе значення в імунному захисті та утворенні колагену – білка, який надає капілярам міцності. Багато вітаміну С міститься в плодах шипшини, червоного перцю, смородини, зеленої цибулі та лимонах.

Виявлення вітаміну С ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти відновлювати гексаціаноферат (III) калію до гексаціаноферату (II) калію. Останній утворює з ферум (III) хлоридом малорозчинну у воді сіль феруму (III) – берлінську лазур, яка випадає у вигляді темно-синього осаду.



Реактиви

Витяжки з фруктів та овочів	1% розчин FeCl ₃
1% розчин аскорбінової кислоти	10% NaOH
5% розчин K ₃ [Fe(CN) ₆]	10% розчин HCl
5% розчин (CH ₃ COO) ₂ Cu	10% розчин NaOH

Хід роботи

Приготування витяжок з фруктів та овочів: певну кількість продукту розтерти у порцеляновій ступці, додаючи в процесі розтирання невелику кількість дистильованої води. Гомогенат профільтрувати. В отриманих фільтратах визначити наявність вітамінів.

1. У пробірки з витяжками з фруктів та овочів додати по 1 краплі 10% NaOH.
2. У всі пробірки додати по 1 краплі 5% розчину $K_3[Fe(CN)_6]$. Суміш струсити.
3. Додати по 3 краплі 10% розчину HCl.
4. Додати по 1 краплі 1% розчину $FeCl_3$.
5. Інтенсивність забарвлення у пробірках оцінити за 5 бальною шкалою та записати у таблицю.

Досліджуваний розчин	Інтенсивність забарвлення

ЗМІСТ

Лабораторна робота № 1. Виготовлення та мікроскопічний аналіз препаратів бактерій та дріжджів	1
Будова світлового мікроскопу та основні правила роботи з ним.....	1
Виготовлення препаратів мікроорганізмів	3
Виготовлення живого препарату “роздушена крапля”	4
Виготовлення фіксованого забарвленого препарату	5
Визначення життєздатних клітин пекарських дріжджів	6
Лабораторна робота № 2. Виготовлення та аналіз мазків крові риби та миші.....	6
Лабораторна робота № 3. Дослідження складу яєчного білка та желатину..	9
<i>Біуретова реакція</i>	10
<i>Нінгідрінова реакція</i>	11
<i>Ксантопротеїнова реакція</i>	11
<i>Реакція Паулі</i>	12
<i>Реакція Фоля</i>	13
Лабораторна робота № 4. Порівняння вуглеводного складу цукру, меду та цукрозамінника.....	15
<i>Реакція Тромера</i>	16
<i>Гідроліз сахарози</i>	17
<i>Виявлення фруктози (реакція Селіванова)</i>	18
<i>Виявлення сахарози</i>	18
Лабораторна робота № 5. Кислотний та ферментативний гідроліз крохмалю	19
Лабораторна робота № 6. Визначення вітаміну С у фруктах та овочах.....	20