

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

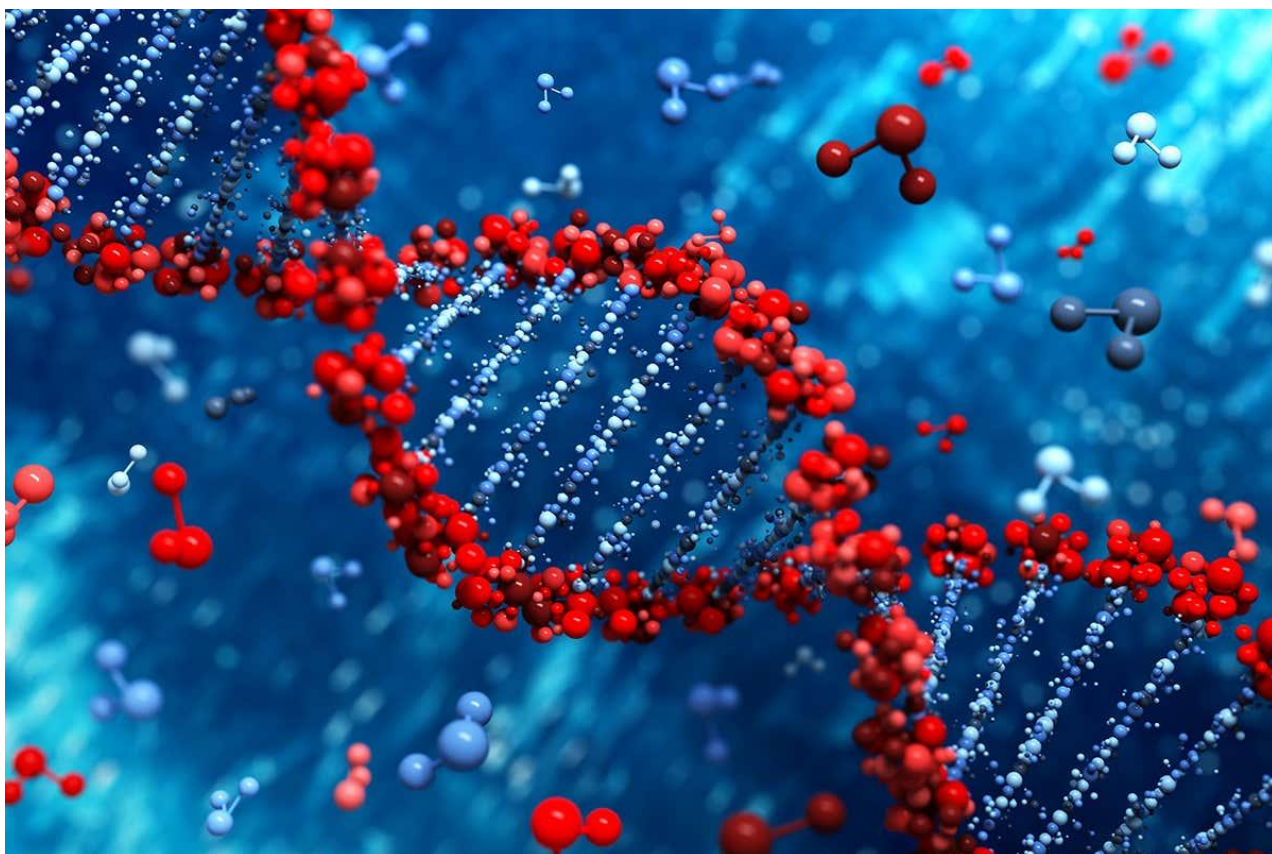
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

**Методичні рекомендації для проведення
лабораторних занять з курсу**

«КЛІТИННА БІОХІМІЯ»

*для студентів освітнього рівня «Магістр»
спеціальності 091 «Біологія»*



Умань - 2022

Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дисципліни «Клітинна біохімія» для студентів освітнього рівня «Магістр» спеціальності 091 Біологія. Умань: Уманський національний університет садівництва, 2022 р. 44 с.

Укладач: Леонтюк І.Б.– кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Рецензент: Валюк В.Ф. – кандидат хімічних наук

Методичні вказівки схвалені на засіданні кафедри біології (протокол № 2 від 29.08.2022 р.)

Затверджено і рекомендовано до видання методичною комісією факультету плодощовківництва, екології та захисту рослин (протокол № 1 від 31. 08. 2022 р.)

УДК 664.34:581

@ Леонтюк І.Б., 2022

ЗМІСТ

Вступ	4
Загальні заходи безпеки під час виконання лабораторних робіт	5
Робота 1. Правила роботи з мікроскопом. Методика виготовлення тимчасових препаратів. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот.	6
Робота 2. Будова рослинної клітини	12
Робота 3. Вплив розчинів з різним осмотичним тиском на еритроцити та рослинні клітини	17
Робота 4. Вплив різних чинників на ступінь пошкодження клітинних мембран	21
Робота 5. Визначення в'язкості цитоплазми рослин методом центрифугування	23
Робота 6. Виділення нуклеопротейнів та нуклеїнових кислот із біологічного матеріалу	25
Робота 7. Спектрофотометричне визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот за методом Спіріна	28
Робота 8. Кількісне визначення АТФ у тканинах	30
Робота 9. Визначення швидкості руху хлоропластів (за Смірноюю, Сіренко)	32
Робота 10. Визначення міцності зв'язку хлорофілу з білок-ліпідним комплексом	35
Робота 11. Будова хромосом. Мітотичний поділ клітини. Порівняння мітозу, мейозу	37
Рекомендована література	44

В С Т У П

Клітинна біохімія - це наука, що вивчає сучасні уявлення про біохімічні процеси та їх інтеграцію в клітинах, методи їх дослідження. В курсі розглядаються молекулярні основи виділення, особливості організації генетичного та білок-синтезуючого апарату клітин еукаріот; біохімічні стратегії енергетичного метаболізму, шляхи катаболізму та біотрансформації речовин в клітинах; біосинтез і збирання клітинних компонентів; порівняльна характеристика молекулярних механізмів інтеграції метаболізму та компарменталізація біохімічних процесів в клітинах еукаріот; сучасні методи вивчення біохімічних процесів в клітинах.

Клітинна біохімія базується на фундаментальних досягненнях біофізики, біохімії, молекулярної біології, генетики, які відкрили нові можливості для вивчення внутрішньої організації живої клітини і її фізіологічної функції.

Даний практикум містить перелік лабораторних робіт із клітинної біохімії, які укладено за програмними питаннями курсу "Клітинна біохімія" для студентів освітнього рівня «Магістр» спеціальності 091 Біологія. В методичних рекомендаціях наведені лабораторні роботи з усіх основних розділів курсу.

Розділи містять інформаційний матеріал для засвоєння теми, лабораторний практикум з акцентом на якісне та кількісне визначення біологічних молекул, питання для самоконтролю. В лабораторних роботах викладено принцип метода з наведенням реакцій взаємодіючих речовин, детально описаний хід роботи та очікувані результати.

Структура лабораторних робіт дозволяє проводити їх без додаткових вказівок, що особливо актуально в зв'язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного рішення проблем в навчально-дослідницькій та практичній роботі. Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у біохімічній лабораторії.

Результати виконаних лабораторних робіт оформляються студентами у вигляді звітів, які повинні містити: назву лабораторної роботи, її мету, короткі теоретичні відомості (не більш 0,5 – 1 стор.), експериментальну частину з результатами виконаних дослідів, а також кожна лабораторна робота повинна містити висновок (узагальнення результатів).

Лабораторний практикум визначає той необхідний мінімум знань, які повинен засвоїти студент на лабораторних заняттях. Більш детальні відомості в області різних розділів біохімії студенти одержують в лекційних курсах.

ЗАГАЛЬНІ ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

До виконання лабораторних робіт слід приступати тільки після проходження інструктажу з правил безпеки робіт у навчальній лабораторії та протипожежної безпеки і дозволу викладача. Студенти мають поставити підписина контрольному листі інструктажу з правил безпеки.

При роботі в лабораторії необхідно дотримуватися таких вимог: виконувати роботу потрібно акуратно, сумлінно, уважно і зосереджено, не поспішаючи, а також бути спостережливим, раціонально і правильно використовувати час, відведений для роботи.

Працювати в лабораторії необхідно в халаті, що захищає одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами та контамінації мікроорганізмами.

Кожний студент має працювати на закріпленому за ним робочому місці. Перехід на інше місце без дозволу викладача не допускається. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не обтяжувати його побічними речами.

Категорично забороняється працювати у лабораторії студентові наодинці (без присутності викладача), а також у невстановлений час без дозволу викладача.

Приступаючи до роботи, необхідно усвідомити методику роботи, правилаї безпечного виконання; перевірити відповідність взятих речовин тим речовинам, які вказані у методиці роботи.

Якщо є деякі сумніви щодо певних етапів роботи, особливо тоді, коли це стосується нових операцій чи роботи з невідомою вам речовиною або приладом, то за роз'ясненням потрібно звернутися до викладача.

Дослід необхідно проводити у відповідності з його описом в методичних рекомендаціях, особливо дотримуватися черговості додавання реактивів.

Для виконання досліду слід користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом.

Для взяття кожного реактиву передбачено певний мірний посуд (піпетки, самплери, мірний циліндр або мірна склянка). Не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у тару, щоб не зіпсувати реактив. Працюючи з хімічними речовинами слід уникати їх потрапляння на шкіру.

Під час роботи у лабораторії не можна торкатися руками обличчя і очей. Споживати їжу та напої заборонено!

Суворо забороняється пробувати хімічні речовини на смак. За необхідності понюхати їх, варто обережно спрямовувати до себе пари чи газ помахом руки.

Засмоктувати в піпетку будь-які розчини (навіть воду) ротом забороняється.

Роботи, пов'язані з утворенням летких речовин, з випарюванням і кип'ятінням розчинів, використанням ефірів, концентрованих кислот та інших небезпечних розчинників, слід виконувати лише у витяжній шафі. Під час

роботи у витяжній шафі з метою ефективної вентиляції та безпеки, дверцята шафи слід підняти лише на 1/3. Після закінчення роботи їх слід щільно зачинити.

Якщо у ході досліду необхідне нагрівання реакційної суміші, треба дотримуватись виключно передбаченого методичними рекомендаціями способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці, на газовому пальнику, спиртівці тощо. Леткі горючі речовини неможна нагрівати на відкритому вогні.

Розлиті на підлогу і стіл хімічні речовини знешкоджують і прибирають підкерівництвом інженера (викладача) у відповідності з правилами.

Після закінченні роботи слід привести в порядок своє робоче місце: робочі суміші вилити у вказану ємність, робочий посуд промити під струменем води, стерти спиртом (денатурованим) написи маркером на посуді, скласти посуд до кошика, протерти поверхню робочого лабораторного столу, закрити водопровідні крани, вимкнути електричні прилади.

Прибране робоче місце необхідно здати інженеру присутньому на лабораторному занятті.

Після закінчення досліду та прибирання свого робочого місця необхідно обов'язково ретельно помити руки з милом.

Робота 1. Правила роботи з мікроскопом. Методика виготовлення тимчасових препаратів. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот

Мета заняття: ознайомитись з будовою мікроскопа, сформувати навички користування ним; порівняти будову клітин прокариот та еукаріот.

Матеріали та обладнання: цибуля ріпчаста з забарвленими лусками; елодея канадська; фільтрувальний папір; 1% розчин йоду в KI або 5% спиртовий розчин йоду (розчин Люголя); 0,2 М розчин KNO_3 ; розбавлений етанол; нагріта дистильована вода ($30^\circ C$); предметні та покривні скельця; піпетки Пастера; крапельниці; промивалка з дистильованою водою; препарувальні голки; пінцети; леза; мікроскоп.

Будова мікроскопа

У кожному світловому мікроскопі розрізняють три основних частини: механічну, освітлювальну та оптичну. Механічна частина мікроскопа складається з штатива, тубуса, револьвера, предметного столика, мікрометричного гвинта (або кремальєри) і мікрометричного гвинта. Штатив складається з масивної підковоподібної ніжки, на якій кріпиться весь мікроскоп і тубосотримач. До тубосотримача прикріплено тубус (зорова труба), який

пересувається вгору і вниз за допомогою мікрометричного і мікрометричного гвинтів. До штативу прикріплено предметний столик. У центрі столика є отвір, над яким кладуть предметне скло. Воно фіксується двома затискачами (клемами). Знизу до тубуса рухомо прикріплено револьвер-пластинку з трьома-чотирма об'єктивами. Освітлювальна частина мікроскопа складається з дзеркала, конденсора та діафрагми. Дзеркало закріплене рухомо під предметним столиком. З одного боку воно плоске, а з другого – увігнуте. Плоскою і увігнутою поверхнею користуються залежно від джерела світла і особливостей об'єкта. Конденсор, що знаходиться між предметним столиком і дзеркалом, складається з кількох лінз. Діафрагма закріплена на нижній поверхні конденсора. Промені від джерела світла відбиваються дзеркалом і спрямовуються в конденсор. Лінзи конденсора концентрують світлові промені і спрямовують їх через отвір предметного столика на досліджуваний предмет та в об'єктив. Діафрагма регулює ширину пучка, збільшує або зменшує освітлення предмета. Оптична частина мікроскопа складається з системи лінз, окуляра і об'єктивів. Окуляр встановлений у тубус зверху. На оправі окуляра є цифри, які показують його збільшення (наприклад 7х, 10х, 15х). Об'єктив - це система лінз, вправлених у трубку-гільзу. Об'єктиви закріплені у револьвері. Вони можуть давати від малого (7х, 8х, 10х) до великого (40х, 90х) збільшення. Щоб знати загальне збільшення мікроскопа, слід перемножити цифри, що стоять на оправі окуляра і об'єктива.

Правила роботи з мікроскопом

1. Мікроскоп зберігають захищеним від вологи, пилу та світла. При перенесенні мікроскоп беруть правою рукою за колонку штатива, а лівою підтримують знизу.

2. Окуляр, об'єктив, дзеркало протріть серветкою. Поставте мікроскоп перед собою ближче до лівого плеча. Праворуч від мікроскопа покладіть альбом.

3. Вивчення будь-якого об'єкта починають з малого збільшення. Поставте в робоче положення об'єктив малого збільшення (х8). Для цього повертайте револьвер, поки потрібний об'єктив не займе центроване положення (над отвором предметного столика), про що буде свідчити легке клацання спеціального пристрою револьвера.

4. Підніміть за допомогою макрогвинта об'єктив над предметним столиком на висоту 0,5 см. Відкрийте діафрагму і підніміть конденсор.

5. Дивлячись в окуляр (лівим оком), поверніть дзеркало в напрямку до джерела світла, поки поле зору не буде освітлено яскраво і рівномірно.

6. Покладіть на предметний столик препарат з перехрещених волосин накривним скельцем догори, щоб об'єкт знаходився в центрі отвору предметного столика.

7. Потім під контролем зору повільно опустіть тубус за допомогою макрометричного гвинта, щоб об'єктив знаходився на відстані біля 2 мм від препарату.

8. Дивіться в окуляр і одночасно повільно піднімайте тубус за допомогою макрогвинта, поки в полі зору не з'явиться зображення об'єкта. Запам'ятайте, що фокусна відстань для об'єктива малою збільшення дорівнює приблизно 0,5 см.

9. Щоб перейти до розглядання об'єкта при великому збільшенні мікроскопа, необхідно відцентрувати препарат, тобто помістити точку перехрещення волосин точно в центр поля зору. Для цього, дивлячись в окуляр, пересувайте препарат руками, поки він не займе необхідне положення. Якщо об'єкт не буде відцентрований, то при великому збільшенні точка перехрещення волосин залишиться поза полем зору.

10. Поворотом револьвера за годинниковою стрілкою переведіть в робоче положення об'єктив великого збільшення (x40). Опустіть тубус під контролем ока (дивіться, як опускається тубус, не в окуляр, а збоку) майже до препарату. Запам'ятайте, що фокусна відстань для об'єктива великого збільшення дорівнює приблизно 1 мм.

11. Дивлячись в окуляр, повільно піднімайте тубус, поки в полі зору не з'явиться зображення. Застосовуючи мікрометричний гвинт, потрібно одержати контрастне зображення волосин. Мікрометричний гвинт можна повертати не більше, як на півоберта. Якщо не видно зображення волосин під великим збільшенням, це означає, що препарат був не відцентрований або пропущена фокусна відстань. У цьому випадку перейдіть знову до малого збільшення і виконайте пункти 9-11.

12. При малюванні препарату дивіться в окуляр лівим оком, а в альбом - правим.

Характеристика рослинної та тваринної клітини

Основними функціональними структурами клітини є її поверхневий комплекс, цитоплазма та ядро.

Поверхневий комплекс включає в себе глікокалікс, плазматичну мембрану (цитолему) та кортикальний шар цитоплазми. Неважко помітити, що чіткої межі поверхневого комплексу від цитоплазми немає.

У *цитоплазмі* виділяють гіалоплазму (матрикс, цитозоль), органели і включення.

Основними структурними компонентами *ядра* є каріолема (каріотека), нуклеоплазма та хромосоми; петлі деяких хромосом можуть переплітатись і в цій області утворюється ядерце.

Цитолема, каріолема та частина органел утворені біологічними мембранами.

Основними відмінними ознаками рослинної і тваринної клітини є відсутність в тваринній клітині вакуолей, пластид і клітинної стінки.

Наявність пластид з хлоропластами і хлорофілом дає можливість рослинній клітині синтезувати органічну речовину (крохмаль) при допомозі процесу фотосинтезу. Тому рослини в основному мають аетрофічний спосіб живлення.

Цитоплазма - це напіврідка, в'язка, без кольору маса, яка має властивості колоїдного розчину. Основними речовинами, які входять в її склад є колоїдно-органічні сполуки: білки, вуглеводи, жири, ліпіди (жироподібні речовини), РНК, вода і деякі інші речовини.

Кількість води в цитоплазмі змінюється на протязі вегетації рослин. Цитоплазма складається з 3-х шарів: плазмолемми – тоненької плівки, яка прилягає до клітинної оболонки; мезоплазми, складаючої основну масу цитоплазми, і на кінець тонопласта – внутрішньої тоненької плівки, яка обтягує вакуоль і регулює обмін речовин між мезоплазмою і клітинним соком вакуолі.

Цитоплазмі властиві фізіологічні функції: живлення, дихання, рух, подразливість, обмін речовин, розмноження. Рухається цитоплазма постійно, але іноді це важко помітити. Вона допомагає переміщенню ряду речовин з однієї клітини в іншу. Важливими властивостями цитоплазми являються: в'язкість і напівпроникність.

Колоїди цитоплазми здатні ставати більш в'язкими (гель) і більш рідкими (золь), що допомагає рослині швидко пристосовуватись до змін умов зовнішнього середовища. Висока в'язкість цитоплазми збільшує стійкість рослин до підвищених температур.

ХІД РОБОТИ

1. У м'ясистій лусочці цибулини з випуклої сторони вирізати в радіальному напрямку невеликий кусочок. Потім препарувальною голочкою або пінцетом відділити кусочок шкірочки в декілька квадратних міліметрів. Нанести на предметне скельце і виготовити тимчасовий препарат. Спочатку шкірочку цибулини розглядаємо під малим, а потім під великим збільшенням.

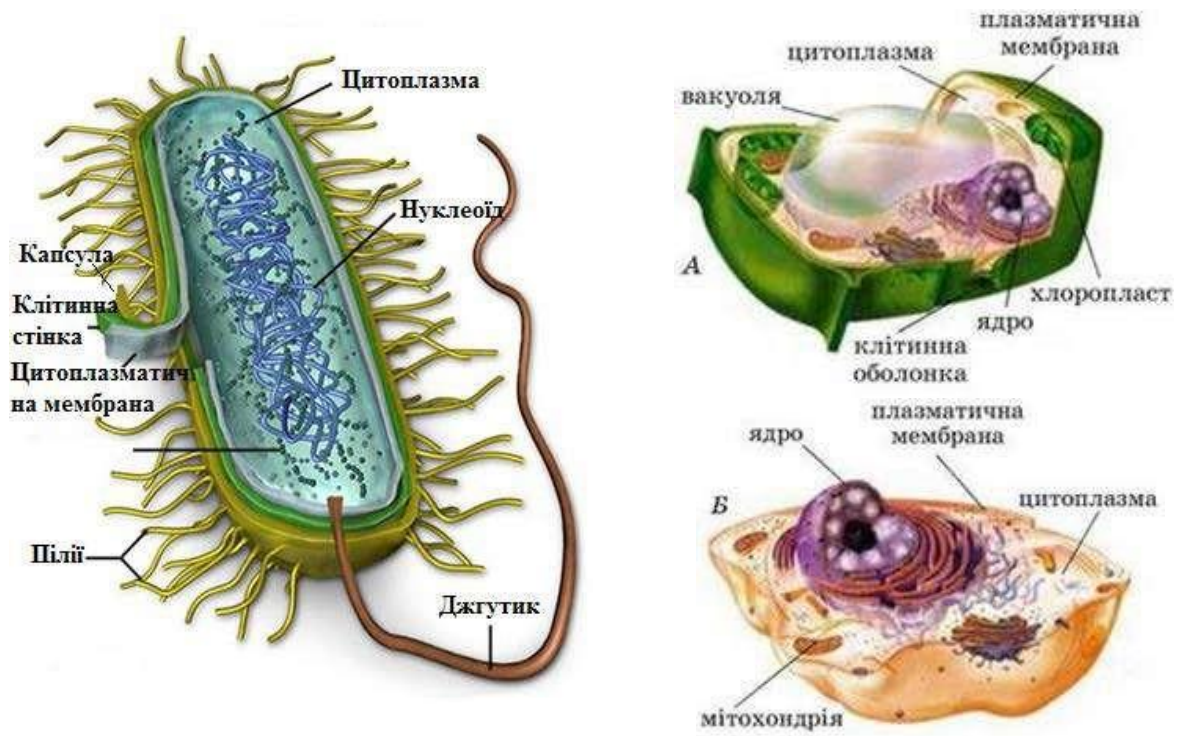
Шкірочка цибулини являє собою покривну тканину, яка складається з шару продовгуватих клітин щільно прилягаючих одна до одної. Після розгляду препарату в такому стані, його слід закрасити розчином йоду в йодистому калії. Клітини шкірочки цибулини замалювати.

2. Свіжий листок елодеї або валіснерії треба відірвати і покласти нижньою частиною на предметне скло в краплю води, накрити покривним скельцем. Спочатку препарат розглядають при малому, а потім при великому збільшенні. При великому збільшенні ми можемо розглянути хлорофілові зерна округлої або овальної форми. В краєвих клітинах листка, де мало хлорофілових зерен і вони маленькі, можна розглянути також вакуоль, ядро і цитоплазму.

Клітини з хлорофіловими зернами і органоїдами замалювати.

3. На готових препаратах і таблицях розглянути будову тваринної клітини. Замалювати будову тваринної клітини.

4. Користуючись малюнком 1. та додатковою літературою порівняйте будову клітини прокаріот та еукаріот та заповніть таблицю 1.



Таблиця 1. Порівняльний аналіз будови клітин прокаріот та еукаріот:

№ п/п	Органели	Прокаріоти	Еукаріоти	
			Рослини	Тварини
1.	Клітинна стінка			
2.	Цитоплазм.мембрана			
3.	Нуклеоїд			
4.	Ядро			

5.	Вакуолі			
6.	Мітохондрії			
7.	Хлоропласти			
8.	Рибосоми			
9.	ЕПС			
10.	Комплекс Гольджі			
11.	Клітинний центр			
12.	Лізосоми			
13.	Пероксисоми			
14.	Пілії/війки			
15.	Джгутики			

Питання для самоконтролю

1. Яку форму зазвичай мають рослинні клітини?
2. Чому під мікроскопом у рослинних клітин зазвичай не видно вакуоліта цитоплазми?
3. За рахунок якого барвника зовнішня епідерма луски цибулі забарвлена у фіолетовий колір? Чому для приготування тимчасового препарату було використано цибулю із забарвленими лусками?
4. Наведіть етапи приготування тимчасового препарату зовнішньої епідерми луски цибулі.
5. Наведіть етапи приготування тимчасового препарату внутрішньої епідерми луски цибулі.
6. Для чого до одного з препаратів епідерми луски цибулі додавали розчин J_2 в КJ?
7. Які органели можна спостерігати в цитоплазмі зелених частин рослини? Яку форму мають ці органели?
8. Наведіть етапи приготування тимчасового препарату елодеї.
9. В чому полягають переваги застосування елодеї для вивчення руху цитоплазми в клітині?
10. З якої частини гілки елодеї необхідно взяти листок для вивчення руху

цитоплазми в клітині і чому?

11. Які типи руху цитоплазми існують в клітинах? Намалюйте схематично типи руху і/або опишіть.
12. Який тип руху цитоплазми Ви спостерігали на лабораторній роботі?
13. За рахунок чого можна спостерігати рух цитоплазми в клітині, якщо цитоплазма безбарвна?
14. Вкажіть три способи інтенсифікації руху цитоплазми.
15. Яким чином іони калію впливають на в'язкість цитоплазми?
16. За рахунок чого деякі речовини прискорюють рух цитоплазми?
17. Які органели беруть участь в русі цитоплазми? Дайте характеристику цим органелам.

Робота 2. Будова рослинної клітини

Мета заняття: ознайомитися з будовою рослинної клітини, навчитися розпізнавати структурні елементи клітини, вивчити зовнішню будову і локалізацію органел в клітині; набути навичок визначення структурних компонентів оболонки клітини за допомогою якісних реакцій, набути навичок виконання масштабованого рисунку мікрооб'єктів, закріпити навички мікроскопування та виготовлення мікропрепаратів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; препарувальні інструменти (препарувальні голки, пінцети, леза) скляні палички або піпетки; фільтрувальний папір; предметні і покривні скельця; листки елодеї канадської (*Elodea canadensis*); листки валіснерії (*Vallisneria spiralis*); м'якоть зрілих плодів глоду (*Crataegus*); шипшини (*Rosa canina*); горобини (*Sorbus aucuparia*); стручкового перцю (*Capsicum annuum*); листки традесканції (*Tradescantia*); плід айви (*Cydonia oblonga*); бульба картоплі (*Solanum tuberosum*); вата; розчин йоду в калій йоді; розчин флороглюцину в 50% спирті; концентрована сірчана (H_2SO_4) або соляна (HCl) кислоти; сірчаноокислий анілін; судан Ш; хлор-цинк-йод; гліцерин.

Ядро - має оболонку з двох мембран, які пронизані ядерними парами і хроматин (в такій формі розкручені хромосоми знаходяться в інтерфазі). Є ще ядерний сік і ядерце. Розміри його не більше 2-20 мкм.

Ф у н к ц і ї – хромосоми містять ДНК, а це речовина спадковості. Ділення ядра лежить в основі розмноження клітин. В ядерці утворюються р и б о с о м и.

Плазматична мембрана складається з трьох шарів - в центрі мембрани ліпідний бішар, а по боках білкові шари.

Ф у н к ц і ї - одна з основних властивостей біологічної мембрани - її вибіркова проникність (напівпроникність) - одні речовини проходять через неї важко, інші легко і навіть в бік більшої концентрації. Так, для більшості клітин концентрація іонів Na^+ всередині клітини значно нижча, ніж у навколишньому середовищі. Для іонів K^+ характерне протилежне співвідношення: їхня концентрація всередині клітини вища, ніж зовні. Через це іони Na^+ завжди намагаються проникнути в клітину, а іони K^+ - вийти назовні. Вирівнюванню

концентрацій цих іонів перешкоджає дія особливої системи клітинної мембрани, яка виконує роль насоса, що відкачує іони Na^+ із клітини і одночасно накачує іони K^+ всередину (так званий натрій-калієвий насос).

Прагнення іонів до переміщення всередину використовується для транспорту цукрів і амінокислот в клітину. При активному видаленні іонів Na^+ з клітини створюються умови для надходження глюкози і амінокислот всередину неї.

У багатьох клітин поглинання речовин відбувається також шляхом фагоцитозу і піноцитозу. При фагоцитозі гнучка зовнішня мембрана утворює невеликі заглибини, куди потрапляє захоплювана тверда частинка. Це заглиблення поступово збільшується, стає глибшим, і частинки, які потрапили в неї, занурюються в середину клітини. Явище фагоцитозу властиве амебам і деяким іншим найпростішим, також лейкоцитам (фагоцитам). Аналогічно відбувається поглинання клітинами і рідин, які містять необхідні клітинні речовини. Це явище назване піноцитозом (гр. сл. піно - п'ю, цитос – клітина). Для клітинної мембрани характерна також дифузія – рух газів, наприклад при диханні, осмос – рух води з розчиненими в ній речовинами в клітину, а також екзоцитоз - видалення з вакуолей неперетравлених частин.

Ендоплазматична сітка - система мембранних мішечків у вигляді трубочок і пластинок, які утворюють єдине ціле з зовнішньою мембраною ядерної оболонки.

Ф у н к ц і ї. Якщо поверхня ендоплазматичної сітки покрита рибосомами, то її називають шорховатою. На рибосомах синтезується білок, який транспортується по цистернах ендоплазматичної сітки. Гладка ендоплазматична сітка (без рибосом) служить місцем синтезу ліпідів і стероїдів.

Рибосоми. Містять білок і РНК (65% всієї РНК клітини) в рівних кількостях. Їх знайшли в мітохондріях і в хлоропластах рослин.

Ф у н к ц і ї. На рибосомах синтезується білок.

Мітохондрії. Мають оболонку з двох мембран. Зовнішня мембрана гладенька, а внутрішня утворює складки – кристи. Містять мітохондрії і матрикс, де є рибосоми, одну кільцеву молекулу ДНК і фосфатні гранули.

Ф у н к ц і ї. Мітохондрії – енергетичні станції клітини. Внаслідок дихання відбувається розклад речовин з утворенням енергії. В кристах при аеробному диханні проходить окислювальне фосфорилування і перенос електронів, а в матриксі працюють ферменти, які приймають участь в циклі Кребса (цикл лимонної кислоти) і в окисненні жирних кислот. Синтезується на рибосомах і білок.

Апарат Гольджі. Це стопка мембранних мішечків. На одному кінці стопки мішечки безперервно утворюються, а з другого підшнуровуються у вигляді бульбашок.

Ф у н к ц і ї. Транспорт. Клітинні матеріали, наприклад ферменти і ендоплазматична сітка модифікуються в цистернах і транспортуються у бульбашках. Синтез лізосом.

Лізосоми. Сферичний мембранний мішечок, який заповнений перетравлювальними ферментами (мембрана одинарна).

Ф у н к ц і ї. Перетравлення поживних Хлоропласти. Це велика пластида, що містить в собі хлорофіл. В хлоропластах проходить фотосинтез. В хлоропластах є оболонка, яка складається з двох мембран. Хлоропласти заповнені стромою. В стромі знаходиться система мембран зібраних в стопки, які з'єднуються між собою ламетами. В стромі може відкладатися крохмаль, крім того в ній є рибосоми, ДНК і крапельки масла.

Лейкопласти – без кольору, хлоропласти – зелені, хромопласти – жовті, червоні і т. д.

Ф у н к ц і ї. Фотосинтез з утворенням вуглеводів з води, CO₂ і сонячної енергії. В хлоропластах сонячна енергія перетворюється в хімічну енергію, тобто енергію хімічних зв'язків.

Плазмодесми. Тонка цитоплазматична нитка, що поєднує цитоплазму двох сусідніх клітин через тонку пору в клітинній стінці.

Ф у н к ц і ї. Об'єднує протопласти сусідніх клітин в єдину безперервну систему, по якій проходить транспорт речовин між клітинами.

Вакуолі - мішок, обтягнутий одинарною мембраною, яку називають тонопластом. У вакуолях знаходиться клітинний сік, де є мінеральні солі, цукри (вуглеводи), пігменти, органічні кислоти і ферменти.

Ф у н к ц і ї. Тут зберігаються різноманітні речовини, в тому числі і кінцеві продукти обміну. Від вмісту вакуолей залежать осмотичні властивості клітини. В клітині є ще різні включення.

Таким чином, клітина має цілий комплекс, що допомагає їй функціонувати як єдиному цілому організмові. Ядро – передача спадковості, рибосоми – синтез білка, мітохондрії – енергетичні станції, вакуолі - осмос, хлоропласти – фотосинтез, апарат Гольджі, ендоплазматична сітка – транспорт, лізосоми – перетравлення, плазмодесми – зв'язок між клітинами, плазматична мембрана – обмін між клітиною і середовищем.

речовин і клітинних компонентів, які відслужили свій строк.

Клітинна стінка. Жорстка клітинна стінка складається з целюлозних волокон.

Ф у н к ц і ї. Забезпечує механічну опору і захист клітини. Завдяки їй в клітині виникає тургорний тиск, не допускає осмотичного розриву клітини.

ХІД РОБОТИ

1. Вивчення будови типової рослинної клітини на прикладі клітин листка елодеї канадської (або на прикладі клітин листка валіснерії).

На виготовленому мікропрепараті листка елодеї канадської розглянути будову клітини, при великому збільшенні виявити круговий рух цитоплазми в клітинах листка. Забарвити мікропрепарат розчином йоду в йодиді калію. При малому та великому збільшенні роздивитися основні структурні компоненти клітин – оболонку, цитоплазму, пластиди. Замалювати при великому збільшенні схему будови рослинної клітини, зробити позначення, стрілками позначити напрямки руху органел.

Пагони елодеї (або валіснерії) за 30 хвилин до роботи поміщають в теплу воду (23-30 °С) і витримують на яскравому світлі. Пінцетом або лезом відділити шматочок листка елодеї, занурити в краплю води на предметному склі зовнішньою стороною догори, накривають накривним скельцем. При великому збільшенні мікроскопу добре видимі світлі стінки клітин, в яких помітні непотовщені місця - пори. В середині кожної клітини в безбарвній зернистій цитоплазмі добре видно ядро з одним-двома ядерцями. В молодих клітинах ядро знаходиться в центральній частині і оточене цитоплазмою, яка розходиться від центру тяжами. Між тяжами цитоплазми розташовані вакуолі, заповнені клітинним соком. В більш старих клітинах ядро лежить в пристінному шарі цитоплазми, а центральну частину займає велика вакуоль.

Використання розчину йоду в йодистому калії робить чітко помітною границю між цитоплазмою і вакуолями. Даний реактив також є реактивом на білок, тому в результаті реакції білки цитоплазми набувають жовтого кольору, білки ядра - темно-жовтого, вакуолі - більш світлого кольору, клітинна оболонка залишається безбарвною.

Мікроскопують в краплині води при малому збільшенні. При великому збільшенні в клітинах спостерігається переміщення пластид вздовж клітинної стінки, навколо великої вакуолі (вона займає центр клітини). Це пов'язано з рухом цитоплазми, яка підхоплює їх за собою. Такий рух називається круговим або ротаційним.

2. Ідентифікація основних хімічних компонентів клітинних стінок об'єктів рослинного походження. Проведення якісної реакції на целюлозні оболонки клітини.

Виготовити тимчасовий мікропрепарат волоконцець бавовника. Провести кольорову реакцію на целюлозу (дія Cl-Zn-I). Розглянути, замалювати наслідки кольорової реакції при великому збільшенні, зробити висновок.

Тонкий шматочок волоконцець вати кладуть на предметне скло в краплю хлорцинк-йоду і накривають накривним скельцем. Реактив зафарбовує целюлозну оболонку в синьо-фіолетовий колір. При малому збільшенні знайти тонші ділянки, де клітини розміщуються в один шар, перевести на велике збільшення і більш детально вивчити будову оболонки.

3. Проведення якісної реакції на суберинізовані вторинні оболонки.

Виконати кольорову реакцію на визначення хімічного складу клітинних стінок перидерми картоплі дією судану III (реакція на суберин). Виготовити тимчасовий мікропрепарат, розглянути при малому та великому збільшенні, спостерігати дію реактиву. Замалювати декілька клітин, зробити висновки.

З бульби картоплі лезом зрізати тонкий шматочок шкірки, приготувати препарат в краплі судану III. При великому збільшенні відмічається зафарбування зкорковілих суберинізованих клітинних оболонок у жовтогарячий колір.

4. Вивчення осмотичних явищ (плазмолізу і деплазмолізу) в рослинній клітині.

Виготовити мікропрепарат епідерми соковитої луски цибулини цибулі та дослідити осмотичні явища — плазмоліз і деплазмоліз. Замалювати схему цих процесів.

Пінцетом або препарувальною голкою знімають епідерму з поверхні лусочки цибулі, занурюють в краплю води на предметному склі зовнішньою стороною догори, накривають накривним скельцем. При великому збільшенні мікроскопу добре видимі світлі стінки клітин, в яких помітні тонкі місця - пори. В середині кожної клітини в безбарвній зернистій цитоплазмі добре видно ядро з одним-двома ядерцями. В молодих клітинах ядро знаходиться в центральній частині і оточене цитоплазмою, яка

розходиться від центру тяжами. Між тяжами цитоплазми розташовані вакуолі, заповнені клітинним соком. В більш старих клітинах ядро лежить в пристінному шарі цитоплазми, а центральну частину займає велика вакуоль.

Піпеткою з одного боку накривного скельця наносять розчин плазмолітика. З протилежного боку, не зрушуючи препарату, починають відсмоктувати воду фільтрувальним папером. При цьому необхідно дивитися в мікроскоп і слідкувати за тим, що відбувається в клітинах – повинно спостерігатися поступове відходження протопласту від оболонки клітини внаслідок виходу води з вакуолі. Наступає такий момент, коли протопласт повністю відходить від оболонки і набуває округлої форми (повний плазмоліз клітини). Потім наносять краплю води, яка за законом діалізу заміщує плазмолітик в клітині. При цьому повинно відбуватися поступове заповнення вакуолей клітинним соком та притискання цитоплазми до оболонки (деплазмоліз).

5. Заповнити таблиці 1 та 2.

Таблиця 1. Будова рослинної клітини.

№	Структурні компоненти рослинної клітини	Будова та локалізація в клітині	Функція

Таблиця 2. Порівняльна характеристика первинної та вторинної оболонок.

Характеристики	Первинна оболонка	Вторинна оболонка
Хімічний склад Фізичні властивості Особливості будови порового апарату Біологічна роль		

Питання для самоконтролю

1. Охарактеризувати будову та властивості структурних компонентів, характерних лише для рослинної клітини.
2. Цитоплазма, її структура. Хімічний склад та властивості цитоплазми живої клітини.
3. Будова і функції мембран рослинних клітин. Значення напівпроникності біологічних мембран.
4. Загальна характеристика і хімічний склад клітинної оболонки.
5. Будова порового апарату первинної оболонки. Плазмодесми. Пори.
6. Вторинні зміни хімічного складу і властивостей оболонки (здерева́ння, зкоркові́ння, ку́тинізація, ослизнення, мінералізація). Біологічне значення вторинного потовщення оболонки.

Робота 3. Вплив розчинів з різним осмотичним тиском на еритроцити та рослинні клітини

Мета заняття: дослідити вплив розчинів, які мають різний осмотичний тиск на характер змін еритроцитів крові та зміни в рослинній клітині.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; препарувальні інструменти (препарувальні голки, пінцети, леза) скляні палички або піпетки; пробірки; предметні і покривні скельця; NaCl 10%, NaCl 0,8%, NaCl 0,1%, цитратна кров; цибуля.

Дифузія в розчинах буває пряма і непряма. При непрямій дифузії частки розчиненої речовини та розчинника натрапляють на проникливу органічну перегородку, (наприклад, перегородку з колодію), і вільно проникають через неї. Але, якщо поміж чистим розчинником та розчином помістити напівпроникливу перепону, то через неї можуть проходити тільки молекули розчинника. Однобічна дифузія розчинника через напівпроникливу перегородку називається осмосом.

Осмос (від грецьк. *ōsmos* – поштовх, тиск) – це однобічна дифузія молекул води через напівпроникну мембрану з ділянки з низькою концентрацією розчиненої речовини в ділянки з більшою концентрацією.

Осмос відіграє велику роль у фізіологічних процесах організму. Засвоєння їжі, обмін речовин тісно пов'язані із різною проникною здатністю клітинної мембрани для води та розчинених речовин.

Осмос обумовлений прагненням системи до термодинамічної рівноваги і вирівнювання концентрацій розчину з обох сторін мембрани. Таким чином, будь-яка осмотична система припускає наявність мембрани, проникної у першу чергу для молекул води. Молекули розчинника при своєму русі, натрапляючи на напівпроникну перегородку, вільно проникають через неї, молекули розчиненої речовини перебувають у стані теплового руху, наштовхуються на напівпроникну перегородку, ударяються об неї, утворюючи при цьому певний тиск. Такий тиск називається осмотичним.

Осмотичний тиск – сила, що визначає рух розчинника через напівпроникну мембрану з менш концентрованого розчину в більш концентрований.

Показник осмотичного тиску визначається за рівнянням: $P = CRT$

де С – концентрація речовини;

R – універсальна газова стала;

T – температура.

Величина осмотичного тиску виражається в атмосферах або в міліметрах ртутного стовпчика. В живих організмах осмотичний тиск регулює розподіл води між тканинами і клітинами.

Онкотичний тиск – це осмотичний тиск органічних речовин плазми.

У тваринному організмі плазматична напівпроникна мембрана здатна пропускати розчинник (воду) і не пропускати розчинені в ній речовини, зокрема, солі, концентрація яких як у плазмі, так і в клітинах однакова і складає близько 0,9 %. Таким чином, осмотичний тиск залежить від кількості неорганічних сполук, розчинених у рідині.

Осмотичний тиск плазми крові в нормі складає 7,6 атм (5600 мм рт. ст., чи 745 кПа) і обумовлений, в основному, концентрацією NaCl. Розчини, що мають однаковий з плазмою осмотичний тиск, одержали назву фізіологічних чи ізотонічних.

Залежно від величини осмотичного тиску розчини поділяють на ізотонічні, гіпотонічні та гіпертонічні. В ізотонічних розчинах тваринні та рослинні клітини не підлягають фізичним змінам. У них проходить двобічний осмос розчинника, і клітини не підлягають ні набуханню, ні зморщуванню.

Ізотонічність розчинів має важливе значення для життєдіяльності клітин і, зокрема, для еритроцитів, у цитоплазмі яких кількість NaCl відповідає його вмісту в плазмі. Це вирівнює осмотичний тиск з обох боків мембрани і не приводить до руйнування еритроцитарної клітини, що виконує важливу функцію переносу газів.

Розчини, осмотичний тиск яких вищий (вміст натрій хлориду вищий 0,9 %), ніж у плазмі, належать до гіпертонічних, і в їхньому середовищі еритроцити будуть втрачати воду (зневоднюватися). До гіпотонічних розчинів належать розчини, осмотичний тиск яких, а отже і вміст NaCl, буде нижчим, ніж у плазмі. У цих розчинах еритроцити за рахунок поглинання води будуть набрякати аж до розриву мембрани (гемоліз) (рис. 1). Гемоліз є наслідком надмірного розтягування оболонок еритроцитів, через що зростає їх пористість і вміст еритроцитів переходить у навколишній розчин.

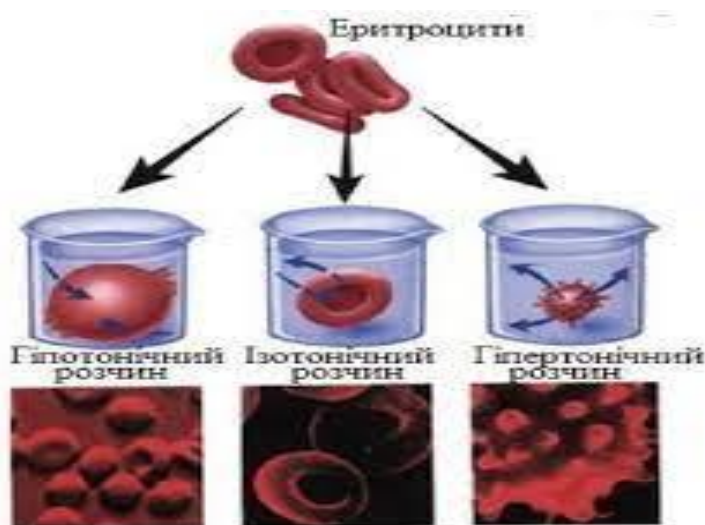


Рис 1. Вплив осмосу на еритроцити, що перебувають у розчинах з різною концентрацією NaCl

У рослинній клітині роль напівпроникної перетинки виконує вся цитоплазма, зокрема її граничні шари. Осмотичний тиск клітинного соку є регулятором пересування води по рослині, розподілу її між окремими органами. Цей тиск є основою тургору, завдяки якому ніжні, збагачені водою тканини рослини здатні зберігати певну форму, а також пружність і еластичність.

В ізотонічних розчинах рослинні клітини не підлягають фізичним змінам. У них проходить двобічний осмос розчинника, і клітини не підлягають ні набуханню, ні зморщуванню. В гіпотонічних розчинах розчинник осмотично всмоктується в клітини – відбувається ендосмос, який у рослинних клітинах викликає тургор.

У гіпертонічних розчинах рослинні клітини підлягають екзосмосу, який призводить до зморщування клітин. Це явище дістало назву плазмолізу (рис. 2).

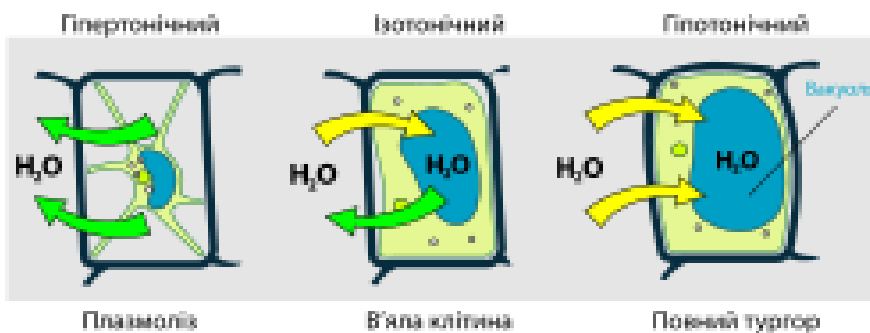


Рис 2. Вплив осмосу на рослинні клітини, що перебувають у розчинах з різною концентрацією NaCl

ХІД РОБОТИ

1. У три пробірки наливають по 2 – 3 мл таких розчинів хлористого натрію: в пробірку № 1 – 10 процентний, в пробірку № 2 - 0,8 процентний, в пробірку № 3 – 0,1 процентний.

У кожен пробірку додають по 1 – 2 краплини цитратної крові.

Вміст кожної пробірки перемішують і відразу ж беруть скляною паличкою краплину вмісту з пробірки № 3 на предметне скло, накривають покривним склом і розглядають під мікроскопом при великому збільшенні. Коли дослід виконується швидко, то в полі зору мікроскопа можна побачити окремі еритроцити, які швидко збільшуються в об'ємі та поступово втрачають свої обриси в зв'язку з гемолізом.

Після спостереження за поведінкою еритроцитів у гіпотонічному розчині (0,1% процентний розчин хлористого натрію по відношенню до еритроцитів є гіпотонічним), спостерігають дію на еритроцити ізотонічного та гіпертонічного розчинів, для чого вміст пробірки № 1 та пробірки № 2 по краплині поміщують на предметне скло і розглядають під мікроскопом при великому збільшенні.

2. У три пробірки наливають по 2 – 3 мл розчинів хлористого натрію різної концентрації, як і в попередньому досліді. В кожен з пробірок поміщують по невеликому шматочку тонкої плівки цибулі, відпрепарованого препарувальною голкою. За 10 хвилин після розміщення плівок цибулі в розчинах з різним осмотичним тиском, їх витягують, поміщують на предметне скло, накривають покривним склом і розглядають під мікроскопом при великому збільшенні.

Розглянуті під мікроскопом зміни еритроцитів та рослинних клітин під впливом розчинів хлористого натрію з різною концентрацією, а отже і з різним осмотичним тиском, нарисувати в зошиті, вказати характер змін.

Таблиця 1. Вплив розчинів з різним осмотичним тиском на еритроцити крові

№	Реактиви, послідовність додавання	Пробірки		
		1	2	3
1	NaCl 10%, мл	2		
2	NaCl 0,8%, мл		2	
3	NaCl 0,1%, мл			2
4.	Цитратна кров, краплі	1-2	1-2	1-2

Таблиця 2. Вплив розчинів з різним осмотичним тиском на рослинні клітини

№	Реактиви, послідовність додавання	Пробірки		
		1	2	3
1	NaCl 10%, мл	2		
2	NaCl 0,8%, мл		2	
3	NaCl 0,1%, мл			2
4.	Зріз плівки цибулі	1	1	1

Питання для самоконтролю

1. Що називається осмосом, осмотичним тиском?
2. Яким рівнянням описується осмос? Від чого він залежить?
3. Які розчини називають ізотонічними, гіпертонічними, гіпотонічними?
4. Яке значення має осмотичний тиск для життя?
5. Що таке онкотичний тиск розчинів?

Робота 4. Вплив різних чинників на ступінь пошкодження клітинних мембран

Мета заняття: дослідити проникність протопласта клітин при дії різних факторів.

Матеріал та обладнання: мікроскоп; предметне й накривне скло; свердла; штативи з п'ятьма пробірками; піпетки; чашка Петрі; леза; дощечка; мірна пробірка; гумові пробки; 30 %-на оцтова кислота; 50 %-й спирт; 1М KNO₃; кип'ячена вода; коренеплоди червоного буряку.

До основних функцій, які виконують мембрани належать: *бар'єрна, транспортна, осмотична, електрична, структурна, енергетична, біосинтетична, секреторна, рецепторно-регуляторна*. Кожна органела теж має власні функції, що здійснюються в унікальному внутрішньому середовищі. Створюється це середовище завдяки вибіркової проникності та іншим специфічним властивостям мембрани, що оточують органелу та відокремлюють її від решти компартментів протопласта. Таким чином, у живій клітині завдяки наявності цитоплазматичних мембран зберігається внутрішньоклітинний *гомеостаз*. У разі їх пошкодження ця властивість втрачається і речовини, що містяться в клітинному соку, дифундують у середовище. Ступінь пошкодження корелює з кількістю виділених назовні речовин. Отже, інтенсивність виходу сполук із клітини є критерієм пошкодження мембран.

Завдяки білкам біомембранам характерні каталітичні властивості (цю функцію виконують переферичні білки, що частково занурені в ліпідний матрикс) і напівпроникність.

Функцію напівпроникності виконують інтегральні білки, за рахунок яких утворюється пори. Завдяки мембранам клітина зберігає свої властивості і постійність внутрішнього середовища.

Пошкодження клітини відбувається, в першу чергу, за рахунок руйнування білкових структур. Через те, що напівпроникність мембран забезпечують білки, при пошкодженні вони руйнуються і мембрана втрачає цю найважливішу функцію. Розпочинається вільний вихід речовини з клітини. Чим більше пошкодження, тим активніше виходять речовини. Ця ознака може бути використана, як індикатор або показник ступеня пошкодження клітини.

ХІД РОБОТИ

1. Із коренеплоду червоного буряку свердлом діаметром 7÷8 мм вирізати п'ять циліндричних брусків завдовжки 3 см, старанно промити їх у водогінній воді та внести по одному в п'ять пробірок, які містять по 5 мл різних розчинів відповідно до схеми досліду (табл. 1).

2. За 30 хв. після початку досліду вміст всіх пробірок ретельно перемішати, бруски буряку вийняти.

3. Виміряти оптичну густину розчинів у пробірках за допомогою ФЕК при зеленому світлофільтрі ($\lambda=540\div550$ нм.). Результати записати у таблицю 1.

4. Зробити висновки щодо рівня ушкодження рослинних тканин за дії досліджуваних факторів.

Примітка. Варіант 2 виконують наступним чином. Витримати 2 хв. у киплячій воді один із брусків буряка, потім його вийняти, охолодити й опустити в пробірку з 5 мл водогінної води кімнатної температури.

Таблиця 1. Вплив різних факторів на проникність мембран рослинної клітини

Номер пробірки	Варіант досліджу	Оптична густина розчинів, ум. од.
1	Контроль (дистильована вода)	
2	Кип'ячена дистильована вода	
3	Дистильована вода + 5 краплин хлороформу	
4	30% розчин оцтової кислоти	
5	40% розчин спирту	

Питання для самоконтролю

1. Які функції виконують біологічні мембрани?
2. Що таке гомеостаз?
3. Які фактори, крім температури, впливають на проникність клітинних мембран?
4. Чому інтенсивність виходу сполук із клітини може бути критерієм їх ушкодження?
5. Чому інтенсивність виходу сполук із клітини може бути критерієм їх ушкодження?
6. Які фактори довкілля впливають на проникність клітинних мембран у природних умовах?
7. Чи пропускає жива протоплазма речовини клітинного соку?
8. Чим пояснюється неоднакова швидкість забарвлення рідини у різних варіантах досліджу?
9. Чим зумовлена напівпроникність живої цитоплазми?
10. Які білки входять до складу біомембран?
11. Що таке асиметрія біомембран?
12. Які є види транспорту речовин через мембрану?
13. Як працює калій-натрієва «помпа»?
14. Що таке ендо- і екзоцитоз? Які механізми цих процесів?
15. Шатл-система переносів у мембранах.

Робота 5. Визначення в'язкості цитоплазми рослин методом центрифугування

Мета заняття: визначити в'язкість цитоплазми в листках водних рослин за дії різних температур методом центрифугування.

Матеріали та обладнання: водні рослини – елодея, наяда, валіснерія; етиловий спирт з кількома краплинами концентрованої оцтової кислоти; ефір; склянки з водою; мікроскоп; предметні стекла та накривні скельця; леза; пінцети; препарувальні голки; піпетки; пробірки; центрифуга; центрифужні пробірки.

Однією з важливих фізико-хімічних властивостей цитоплазми є в'язкість. На відміну від в'язкості звичайних рідин в'язкість цитоплазми зумовлена внутрішньою організацією всіх її складових частин, її ультраструктурою. Опір, який чинять рухові частинок лабільні елементи структури рідини, називають *структурною в'язкістю*. В'язкість цитоплазми легко змінюється під впливом зовнішніх факторів: температури, вологості, мінерального живлення тощо. За нею можна робити висновок про ступінь стійкості колоїдів цитоплазми. Йони кальцію й алюмінію підвищують в'язкість цитоплазми, а йони калію, навпаки, збільшуючи дисперсність колоїдів цитоплазми, зменшують її в'язкість.

В'язкість цитоплазми має велике значення для виживання рослин в умовах високих температур і дефіциту вологи у довкіллі. Особливого значення вона набуває для гідрофітів під час тимчасового пересихання водою.

В'язкість цитоплазми залежить від зовнішніх і внутрішніх факторів, віку, фази онтогенезу, характеру екоотопу тощо. Її визначають різними способами. Одним із них є метод *центрифугування*. В основу цього методу покладено рівняння Стокса. За цим рівнянням швидкість падіння кульки (за сталого радіуса) обернено пропорційна в'язкості рідини. Мірою структурної в'язкості цитоплазми може бути та мінімальна величина відцентрового прискорення в одиницях g , за якою центрифугування протягом 10÷20 хв. зумовлює зміщення хлоропластів у 50 % клітин.

Відцентрове прискорення визначають за відношенням відцентрової сили до сили тяжіння:

$$C_{\text{фн}} = \frac{(2\pi N)^2 r}{g}$$

де N – кількість обертів центрифуги за секунду;

r – радіус центрифуги;

g – прискорення сили тяжіння (981 см/с²).

Для порівняння дослідів визначають відносну в'язкість цитоплазми. Мірою її може бути кількість обертів центрифуги, яка потрібна для однакового

зміщення хлоропластів.

ХІД РОБОТИ

1. Декілька листочків елодеї, наяди і валіснерії покласти на 30 хв. у склянки з водою і помістити: перші – в холодильник за температури 2°C, другі – в термостат за температури 30°C, а треті залишити за кімнатної температури.

2. У центрифужні пробірки налити воду, покласти по 4 – 5 листочків і центрифугувати протягом 10 хв. за різних швидкостей: 1000, 2000 і 3000 об./хв.

3. Після центрифугування листочки швидко перенести у фіксуючу рідину (як фіксатор можна використовувати етиловий спирт з кількома краплями концентрованої оцтової кислоти), промити водою і розглянути під мікроскопом.

4. У листочках, де в результаті центрифугування в полі зору мікроскопа відбувається зміщення хлоропластів у 50 % клітин, обчислити структурну в'язкість цитоплазми.

5. Листочки знову помістити на 10 хв. у пробірки з водним розчином ефіру, і ще раз центрифугувати протягом 15 хв.

Примітка. Під дією ефіру цитоплазма відмирає, при цьому її в'язкість різко знижується, що виявляється у дуже швидкому переміщенні хлоропластів.

6. З отриманих результатів обчислити середні показники та записати їх у таблицю 1.

Таблиця 1. Визначення структурної в'язкості цитоплазми в листках водних рослин за дії різних температур

Варіант досліду	Час плазмолізу, хв	Зміщення хлоропластів після 10-хвилинного центрифугування, %			Структурна в'язкість
		1000 об./хв.	2000 об./хв.	3000 об./хв.	

7. Зробити висновки про вплив температури на структурну в'язкість цитоплазми різних видів водних рослин.

Питання для самоконтролю

- 1.Що таке структурна в'язкість?
- 2.Як пояснити неоднакову в'язкість протоплазми у молодих і старих клітинах листків рослин?
- 3.Як змінюється в'язкість цитоплазми в онтогенезі рослин?
- 4.Які фактори довкілля впливають на в'язкість цитоплазми клітин?

Робота 6. Виділення нуклеопротейнів та нуклеїнових кислот із біологічного матеріалу

Мета заняття: навчитися виділяти рибонуклеопротейни та дезоксирибонуклеопротейни з рослинних та тваринних матеріалів.

Матеріали і обладнання: тканина (селезінка, молоки риб); сухі дріжджі; 5%-й розчин хлориду натрію, який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію; 0,2%-й, 0,4%-й і 0,02 моль/л розчини NaOH; 5%-й розчин оцтової кислоти; фільтри; фарфорова ступка з товкачиком; скляні палички; центрифужні та звичайні пробірки; лійки; центрифуга.

Дослід 1. Виділення рибо- та дезоксирибонуклеопротейнів з тваринних тканин та дріжджів

Дезоксирибо- та рибонуклеопротейни можна виділити з тваринних тканин, використовуючи луги. Якщо розчиняти дезоксирибонуклеопротейни (ДНП) в лугах, їх можна осадити шляхом нейтралізації, а якщо розчиняти в розчинах солей, осадження можна здійснити після розведення розчину.

Рибонуклеопротейни, що є також розчинними в лужних розчинах, осаджуються при додаванні неорганічних кислот (оцтової кислоти) в ізоелектричній точці.

ХІД РОБОТИ

Одержання дезоксирибонуклеопротейнів

1. 0,5 г селезінки або іншої тканини (зобна залоза, селезінка, молоки риб, сухі дріжджі) подрібнюють у фарфоровій ступці з 100 мг скляного порошку та з 15 мл 5%-го розчину NaCl (який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію) протягом 15 хв.

2. Суміш переносять у центрифужні пробірки й центрифугують 15 хв за 1000 g. У пробірку наливають 90 мл води й повільно доливають центрифугат, перемішуючи вміст скляною паличкою. Дезоксирибонуклеопротейни, які є нерозчинними у воді, випадають у осад у вигляді ниток. Нитки збирають на паличку або, якщо утвориться осад, фільтрують, переносять у чисту пробірку та розчиняють у 0,2%-му розчині NaOH.

Одержання рибонуклеопротейнів

1. Наважку сухих дріжджів (10 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці протягом 15 хв із 50 мл 0,4%-го розчину NaOH, який додають невеликими порціями.

2. Суміш центрифугують 10 хв при 2000 g, до центрифугату доливають, помішуючи, 15—20 мл 5%-го розчину оцтової кислоти. Для відокремлення осадупроби центрифугують, після цього отриманий осад розчиняють у 15—20 мл розчину NaOH (0,02 моль/л). Одержані розчини рибо- та дезоксирибонуклеопротейнів використовують у якісних реакціях на виявлення їх складових компонентів (азотистих основ, вуглеводів, фосфорної кислоти та білків).

Дослід 2. Виділення дезоксирибонуклеопротейнів за методом Мирського та Поллістера

Даний метод дозволяє отримати ДНК з тканин тварин за допомогою екстракції нуклеопротейнів розчинами хлориду натрію. Після цього нуклеопротейни можна осадити й отримати з них очищені нуклеїнові кислоти. Екстракцію ДНП і РНП проводять розчинами NaCl різної концентрації: 1,0 М і 0,14 М, відповідно.

Матеріали та обладнання: тканина; 0,14 М розчин хлориду натрію; 2М розчин хлориду натрію; 1М розчин NaCl; суміш хлороформ — етиловий спирт (4:1); 65%-й і 95%-вий етанол; ефір; 10%-ва ТХО; колби; ступка; ножиці; електромішалка; годинник; піпетки; мірний циліндр; ваги; льодяна баня; термостат; центрифужні пробірки; центрифуга (8000 – 10000 об./хв).

ХІД РОБОТИ

1. Тканину (наприклад, печінку) подрібнюють, ретельно промивають трьома об'ємами 0,14 М розчину хлориду натрію, перемішуючи на електромішалці протягом 1 хв, потім центрифугують при 8000 об/хв. Цю операцію повторюють, доки екстракт не перестане осаджуватись ТХО.

2. Осад розмішують у 2,5 об'ємі 0,14 М розчину хлориду натрію відносно вихідної ваги тканини, додають рівний об'єм 2 М розчину хлориду натрію і перемішують протягом 2—3 хв на електромішалці. В'язкий розчин перемішують на холоді протягом кількох годин і центрифугують при 10000 об/ хв.

3. Отриманий прозорий в'язкий розчин доливають до 6 об'ємів холодної води, в результаті чого концентрація NaCl зменшується до 0,14 М. Нитковидний осад дезоксирибонуклеопротейну намотують на скляну паличку. Одержаний

препарат ДНП очищують, повторно розчиняючи в 1 М розчині NaCl і потім осаджуючи з 0,14 М розчином хлориду натрію. Такий розчин препарату в 1 М розчині хлориду натрію добре зберігається на холоді.

Для того, щоб отримати препарат ДНП у сухому вигляді, осад промивають послідовно 65%-вим етиловим спиртом, гарячим 95%-вим етиловим спиртом і ефіром, а потім висушують препарат при 106°C.

4. Для розщеплення дезоксирибонуклеопротеїну на білок і нуклеїнову кислоту проводять 7-8-кратне розмішуванням його в 1,0 М розчині хлориду натрію з сумішшю хлороформ — етиловий спирт (4 : 1), щоразу протягом 5 год. При цьому нуклеїнова кислота залишається у розчині, а білковий компонент збирається у вигляді осаду на межі фаз вода_хлороформ. Після сьомого розмішування нуклеїнова кислота практично звільнюється від білка. З цього безбілкового розчину її осаджують 5-ма об'ємами спирту, промивають 65% і 95%-вим спиртом, потім ефіром і висушують у вакуумі. За допомогою цього методу можна отримати препарати високополімерної натрієвої солі ДНК. Метод є досить простим і тому широко застосовується з препаративною й аналітичною метою.

Дослід 3. Виділення РНК з дріжджів за Шантrenom

Матеріали і обладнання: пекарські дріжджі; 10%-вий розчин NaOH; оцтова кислота; 94%-й етиловий спирт; концентрована соляна кислота; ефір; 2%-вий розчин NaOH; холодний ацетон; колби; льодяна баня; полотно для фільтрування; годинник; піпетки; мірний циліндр; центрифужні пробірки; центрифуга; ексикатор.

РНК можна отримати з різних об'єктів: дріжджів, вірусу тютюнової мозаїки, печінки, підшлункової залози. При виділенні РНК із дріжджів за методом Шантrena проводять лужний гідроліз дріжджів при 0°C. РНК осаджується спиртом у кислому середовищі, а для очищення препарату здійснюють переосадження.

ХІД РОБОТИ

1. Наважку пекарських дріжджів суспендують у 4-х об'ємах води і охолоджують до 0°C. Потім додають ще 2 об'єми попередньо охолодженого до 0°C 10%-вого розчину NaOH до кінцевої концентрації лугу 3,3%.

2. Розчин залишають на 1,5 год при 0°C, доводять рН до 6,5 оцтовою кислотою і фільтрують крізь полотно. Отриману прозору рідину, до якої додають етиловий спирт до концентрації 4%, фільтрують. При цьому утворюється прозорий фільтрат жовтого кольору із зеленуватою флуоресценцією.

3. До фільтрату додають концентровану соляну кислоту до кислої реакції за конго, а потім повільно при перемішуванні додають 4/5 об'єму 94%-го етилового спирту.

4. Розчин відстоюють 30 хв, при цьому утворюється білий осад. Більшу частину рідини зливають, а осад відокремлюють центрифугуванням, промивають двічі спиртом, ефіром і висушують в ексікаторі над сірчаною кислотою.

Таким чином отримують рибонуклеїнову кислоту у вигляді білого порошку. Вихід становить 1,2% від ваги взятих для роботи дріжджів. Даний метод дозволяє одержати нерозчинний препарат РНК. При виникненні необхідності таку РНК можна перевести в натрієву сіль, яка добре розчинна у воді. Для цього беруть певну наважку РНК, суспендують її у 50 об'ємах води і рН розчину доводять 2%-вим розчином NaOH до 6,0. Якщо розчин каламутний, його фільтрують, охолоджуючи до 0°C, і додають 3 об'єми холодного ацетону. При цьому в осад випадає рибонуклеїнат натрію, його центрифугують, промивають ацетоном і висушують в ексікаторі. У такий спосіб препарати РНК, що є в продажу, переводять в натрієву сіль.

Робота 7. Спектрофотометричне визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот за методом Спіріна

Мета заняття: здійснити кількісну екстракцію нуклеїнових кислот із рослинного матеріалу та її кислотний гідроліз на окремі фрагменти.

Матеріали та обладнання: рослинна тканина (0,1–0,2 г), охолоджений р-н HClO_4 (0,2 Н і 0,5 Н), льод, скляні піпетки, ваги, пробірки конічні, лабораторна центрифуга (3000 г), водяна баня, годинник, спектрофотометр, кювети.

Кількісне визначення НК проводять з використанням методів, які базуються на вимірюванні світлопоглинання чи високоспецифічних реакціях, характерних для окремих компонентів нуклеїнових кислот. Максимальне поглинання світла

для нуклеїнових кислот спостерігається при 260 нм, що обумовлено азотистими основами в їх складі. Всі вони володіють однаковим максимумом абсорбції, окрім цитозину, найбільше світлопоглинання якого знаходиться при 270 нм. Проте природна дезоксирибонуклеїнова кислота має світлопоглинання суттєво нижче (приблизно на 40-50 %), порівняно зі складовими її нуклеотидів. Це пов'язано з «гіпохромним ефектом» обумовленим наявністю подвійної спіралі в природній ДНК, таким самим ефектом володіє й РНК, яка має петлі.

Зважаючи на вказані особливості, Спіріним А.С. був розроблений метод, що базується на реєстрації світлопоглинання гідролізатів НК за двох довжин хвиль (270 і 290 нм), оскільки саме в таких умовах нівелюється їх відмінність у складі нуклеотидів.

ХІД РОБОТИ

1. Гомогенізувати рослинну тканину і відважити (0,1–0,2 г). Помістити наважку в конічну пробірку та внести 5–10 мл 0,2 Н р-ну HClO_4 . Перемішати гомогенат з розчином і відокремити осад методом центрифугування (3000 г впродовж 10 хв).

2. Надосад відібрати, а до осаду додати 5–10 мл 0,5 Н р-ну хлорної кислоти, закрити пробірку пробкою з повітряним холодильником та нагрівати у киплячій водяній бані впродовж 30 хв (відбувається кількісна екстракція НК із рослинного матеріалу та її кислотний гідроліз на окремі фрагменти).

3. Гідролізат охолодити і відцентрифугувати, надосад відділити в окрему колбу, а з осадом провести повторну екстракцію 0,5 Н HClO_4 . Гідролізати об'єднати та виміряти з допомогою спектрофотометра світлопоглинання при довжинах хвиль (270 та 290 нм) проти контролю, яким є 0,5 Н розчин HClO_4 .

4. При потребі гідролізат розвести таким же розчином. Вміст фосфору НК з розрахунку на 1 мл гідролізату обчислити по формулі:

$$C_{\text{фн}} = \frac{E_{270} - E_{290}}{0,19}$$

де $C_{\text{фн}}$ – кількість мкг фосфору в НК,

0,19 – показник екстинкції, який обчислюється різницею $E_{270} - E_{290}$, який властивий гідролізату НК, що містить нуклеїновий фосфор в кількості 1 мкг в 1 мл розчину.

При розрахунках враховувати загальний об'єм гідролізату і його розведення. Щоб перерахувати нуклеїновий фосфор (мкг) на кількість НК використати середній перерахунковий коефіцієнт - 10,3.

Питання для самоконтролю

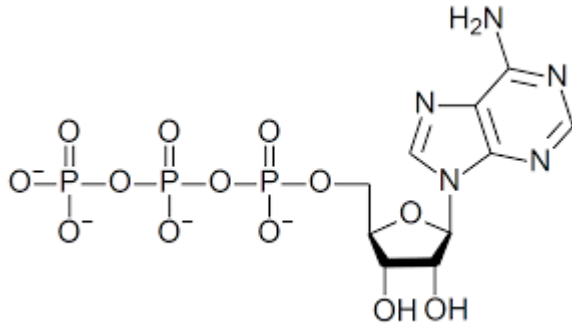
1. Що таке нуклеїнові кислоти?
2. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
3. Чим відрізняється нуклеотид від нуклеозиду?
4. Функції нуклеїнових кислот.
5. Характерні особливості структурного складу та будови ДНК.
6. Характерні особливості структурного складу та будови РНК.
7. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
8. Рівні структурної організації ДНК та зв'язки, які приймають участь у стабілізації.
9. Правило комплементарності азотистих основ у складі ДНК (правило Чаргаффа).
10. Де міститься генетична інформація у клітині?

Робота 8. Кількісне визначення АТФ у тканинах

Мета заняття: визначити кількість АТФ у м'язовій тканині.

Матеріали та обладнання: 2,5 % розчин молібденовокислого амонію у 5 н розчині сульфатної кислоти; стандартний розчин фосфору (1 мл розчину містить 0,025 мг фосфору); 5 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 2 н розчин гідроксиду натрію; 0,15 % спиртовий розчин фенолфталеїну; 0,2 % розчин аскорбінової кислоти (20 мг на 10 мл води); 2 н розчин хлоридної кислоти (HCl), фотоелектроколориметр (ФЕК), водяна лазня, терези настільні, воронки, колби, піпетки, пробірки, фільтрувальний папір, кристалізатор, ножиці, штатив, скляні палички.

Усім клітинам для виконання їхньої роботи необхідна енергія і для всіх клітин будь-якого організму джерелом цієї енергії є АТФ. Тому АТФ називають «універсальним носієм енергії» або «енергетичною валютою» клітин.



АТФ постачає енергію для виконання таких видів роботи: механічної – м'язове скорочення, передача нервових імпульсів, осмотичної – активний транспорт речовин, хімічної – біосинтез, передачі генетичної інформації. АТФ легко доставляє енергію в будь-яку частину клітини, що потребує її для біохімічних процесів. АТФ швидко вивільнює енергію, для чого потрібно протікання лише однієї реакції – гідролізу. АТФ синтезується під час клітинного дихання за рахунок хімічної енергії, що вивільняється при окисненні таких органічних речовин, як глюкоза, і під час фотосинтезу – за рахунок сонячної енергії. Синтез АТФ з АДФ і неорганічного фосфату називають реакцією окисного фосфорилування (клітинне дихання), якщо ж для фосфорилування використовується світлова енергія, то процес називають фотофосфорилуванням (фотосинтез). Швидкість відтворення АТФ з АДФ і неорганічного фосфату (швидкість процесу дихання) легко регулюється відповідно до потреб клітини. Для синтезу АТФ з АДФ і неорганічного фосфату потрібно 306 кДж енергії на 1 моль АТФ.

ХІД РОБОТИ

1. 2 г охолодженої та подрібненої свіжої тканини вносять у колбу з 20 мл ТХО. Перемішують та залишають на 30 хв, після чого фільтрують у суху колбу.

2. У дві пробірки на 10 мл з міткою додають по 1 мл безбілкового фільтрату. Одну пробірку залишають у штативі, у другу додають 1 мл 2 н хлоридної кислоти і залишають у киплячій водяній лазні на 7 хв. для гідролізу. Потім пробірку виймають, охолоджують, додають 1–2 краплі 0,1 % розчину фенолфталеїну та нейтралізують 2 н розчином гідроксиду натрію до слабко-рожевого забарвлення. В обидві пробірки додають по 1–2 мл 2,5 % розчину молібденовокислого амонію та 1 мл 0,2 % розчину аскорбінової кислоти, та доводять до мітки 10 мл дистильованою водою.

3. Одночасно готують стандартний розчин. Для цього у чисту пробірку на 10 мл додають 1 мл стандартного розчину фосфату, який містить 0,025 мг фосфору, після чого додають ті ж реактиви, що й у дослідну пробірку (молібденовий амоній, аскорбінова кислота) і доводять до 10 мл.

4. У всіх пробірках з'являється синє забарвлення. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості фосфору. За різницею між вмістом фосфору до і після гідролізу розраховують вміст фосфору, який входив до складу АТФ. Отримані дані виражають у мг на 1000 г м'язів.

5. Розрахунок:

$$C_x = \frac{D_x \times C_{ст} \times 20 \times 100}{D_{ст} \times 2 \times 1}$$

$$D_x = D_y - D;$$

де C_x – дослідна концентрація АТФ;

D_x – дослідна оптична густина;

D_y – оптична густина після гідролізу;

D – оптична густина до гідролізу;

$D_{ст}$ – оптична густина стандарту.

Питання для самоконтролю

1. На яких властивостях базується принцип методу визначення АТФ?
2. Як приготувати 5 % розчин ТХО та 2 н розчин гідроксиду натрію?
3. Напишіть реакцію гідролізу АТФ.
4. Дайте визначення біологічної ролі АТФ.

Робота 9. Визначення швидкості руху хлоропластів (за Смірноюю, Сіренко)

Мета заняття: оцінити вплив різних концентрацій модельного токсиканта на швидкість руху хлоропластів у клітинах водних рослин.

Матеріали та обладнання: водні рослини (валіснерія, елодея та наяда); біхромат калію; мікромметр; секундомір; світловий мікроскоп; предметні стекла й накривні скельця; склянки місткістю 100 мл; піпетки місткістю 10 мл; мірні колби місткістю 100 мл.

Одним із показників, що характеризує забезпеченість клітини енергією (АТФ), є наявність руху цитоплазми. За сприятливих умов цитоплазма рослинних клітин постійно рухається. На зовнішні та внутрішні впливи клітина відповідає змінами цього руху, його швидкості. Зміни рухливості цитоплазми пов'язують зі зміною проникності поверхневої мембрани до йонів, або інших токсичних сполук, які можуть бути активаторами або інгібіторами АТФ-ази і впливати на рівень АТФ у клітині. Вважається, що зміни внутрішньоклітинної концентрації АТФ, зумовлені дією ушкоджуючих агентів, впливають на організацію актиноподібних феламентів цитоплазми, що своєю чергою спричинює зміни в'язкості цитоплазми та швидкості її руху.

Для спостереження за рухом цитоплазми краще використовувати водні рослини (валіснерію, елодею, наяду), які на препараті залишаються у своєму природному середовищі. Найпоказовішим показником є ротаційний рух протоплазми, який здійснюється уздовж клітинних стінок. Рухаючись, цитоплазма захоплює з собою великі органели – хлоропласти, а іноді й ядро, завдяки яким полегшується спостереження за змінами швидкості цього руху. Характерною особливістю *ротаційного руху* є те, що цитоплазма рухається в одному напрямку, ніби обертається навколо центра клітини. Швидкість цього руху, як у нормі, так і під впливом токсичних речовин легко визначити за допомогою секундоміра та окуляр мікрометра. Лінійна швидкість руху під час ротації в нормі незначна: у валіснерії за температури 18÷23 °С вона становить 10÷20 мкм/с, елодеї – 10÷15 мкм/с, наяди – 15÷20 мкм/с.

Рух у непошкоджених клітинах розпочинається не відразу після препарування, а розпочавшись, на препараті триває днями, зберігаючи початкову швидкість до відмирання клітини.

Для спостереження за рухом цитоплазми в клітинах гідрофітів не потрібно виготовляти зрізи, оскільки тканини цих рослин складаються лише з кількох шарів клітин, кожний з яких можна мікроскопіювати.

Метод можна застосовувати неодноразово на тих самих клітинах, а це важливо у ході вивчення змін пошкодженої клітини в часі, тоді як багаторазове використання деяких інших методів неможливе, або може призвести до небажаного викривлення результатів (наприклад, багаторазовий плазмоліз).

Визначення наявності та швидкості руху цитоплазми не потребує довготривалості експерименту, його можна використати для вивчення первинної чутливості клітин.

Метод має кількісний вираз за п'ятибальною шкалою визначення ступеня токсичності водного середовища (від нетоксичного до летального), який дає змогу градувати токсичність водного середовища в межах п'яти груп стосовно біологічної складової водойми.

ХІД РОБОТИ

1. Дослідні рослини (валіснерія, елодея, наяда) експонувати у розчинах модельного токсиканту ($K_2Cr_2O_7$) різної концентрації (0,01; 0,1; 1,0 мг/л) на світлі протягом 1 год.

2. Після закінчення експозиції з листків рослин виготовити тимчасові препарати і під світловим мікроскопом провести спостереження.

Примітка. У рослин елодеї та наяди використовують верхівкові пагони, у валіснерії – частину рослини біля основи, де розташовані молоді клітини, що зберігають рух цитоплазми.

3. Швидкість руху визначити за допомогою окулярмікрометра, фіксуючи час проходження хлоропластом однієї, або кількох поділок за допомогою секундоміра.

4. Швидкість руху хлоропластів обчислити за формулою:

$$V = S / t,$$

де V – швидкість руху хлоропластів, ум. од./с,

S – відстань, яку проходить хлоропласт, ум. од.,

t – час, за який хлоропласт проходить певну відстань, с.

5. Зробити висновки про токсичну дію різних концентрацій модельного токсиканта.

Прояв токсичної дії визначають п'ятьма групами: перша – немає токсичності (80÷120 %), друга – слабка токсичність (59÷80, 120÷150 %), третя – середня токсичність (20÷50, 150÷180 %), четверта – висока токсичність (10÷20, 180÷250 %), п'ята – летальна токсичність (0÷10, більше 250 %).

6. Дані записати у таблицю 1.

Таблиця 1. Вплив біхромату калію на швидкість руху хлоропластів у клітинах водних рослин

Об'єкт дослідження	Концентрація $K_2Cr_2O_7$, мг/л	Час руху хлоропластів, с	Швидкість руху цитоплазми, ум.од./с	Швидкість руху цитоплазми, % до контролю	Відхилення від контролю, %	Ступінь токсичності	Група токсичності

7. Зробити висновки щодо ступеня токсичності різних концентрацій біхромату калію для водних рослин.

Питання для самоконтролю

1. Про що свідчить наявність руху цитоплазми у клітинах?
2. В яких об'єктах найкраще спостерігати ротаційний рух цитоплазми?
3. Від чого залежить швидкість руху цитоплазми?
4. Назвіть переваги водних рослин під час дослідження ротаційного руху цитоплазми

Робота 10. Визначення міцності зв'язку хлорофілу з білок-ліпідним комплексом

Мета заняття: дослідити лабільність зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдним комплексом пластид і вплив на нього умов навколишнього середовища.

Матеріали та обладнання: листки рослин; сульфат натрію безводний; вуглекислий магній; бензин; етиловий спирт; порцелянові ступки з товкачками; мірні пробірки; фільтри Шотта №3; ваги; вакуумні насоси; ФЕК.

Хлорофіл та інші пігменти хлоропластів зв'язані з ліпопротеїдним комплексом мембран. Відомо, що неполярні розчинники (бензин, петролейний ефір і гексан) не видаляють хлорофіл із білок-ліпідних комплексів, але навіть незначні домішки полярних розчинників до неполярних, наприклад спирту до петролейного ефіру, призводять до часткового видалення хлорофілу. Повного видалення хлорофілу з комплексів можна досягнути лише за дво-кратної концентрації спирту в петролейному ефірі.

Після денатурації природного ХБЛК (хлорофіл білково-ліпідного комплексу) (високою температурою, ультразвуком, ультрафіолетовим опроміненням) хлорофіл частково екстрагується й неполярними розчинниками. Це відбувається внаслідок порушення зв'язку хлорофілу з білками та розчиненні пігменту в ліпідній частині комплексу, який екстрагується неполярними розчинниками. Таким чином, за кількістю хлорофілу, що екстрагується неполярними розчинниками, можна визначити міцність зв'язку хлорофілу з ХБЛК. Незначні домішки неполярного розчинника, наприклад спирту, до полярного збільшують кількість екстрагованого хлорофілу. Зі збільшенням концентрації спирту в петролейному ефірі кількість екстрагованого хлорофілу збільшується. Характер кривих екстрагування хлорофілу сумішшю полярних і неполярних розчинників вказує, що в мембранах можливе існування різних форм ХБЛК. З одних форм (слабкозв'язаних) хлорофіл вилучають меншими концентраціями спирту у петролейному ефірі, з інших – більш міцно зв'язаних хлорофіл екстрагують

більш високими концентраціями спирту. За ступенем екстрагування хлорофілу 0,4 %-им розчином спирту в петролейному ефірі або бензині роблять висновок про кількість слабкозв'язаних комплексів, а за ступенем екстрагування 0,8 %-им розчином - про кількість міцно зв'язаних комплексів. Для зневоднення тканин використовують сульфат натрію.

ХІД РОБОТИ

1. Із середньої проби досліджуваного матеріалу для аналізу взяти чотири наважки по 0,2 г, помістити в ступки, додати по 0,4 г безводного сульфату натрію та 0,05 г вуглекислого магнію. Проби розтерти до повного висушування.

2. До першої наважки додати 10 мл бензину (температура кипіння $40\div 100^{\circ}\text{C}$), що містить 0,2 % етилового спирту; другої – 10 мл бензину, що містить 0,4 % етилового спирту; третьої – 10 мл бензину, що містить 0,8 % етилового спирту; четвертої – 10 мл бензину, що містить 1,2 % етилового спирту. Знову розтерти.

3. Вміст ступок перенести на скляні фільтри Шотта, розчини відфільтрувати, а залишки промити відповідними розчинами (порціями по 3 мл), щоразу відсмоктуючи промивну рідину, доки не одержимо 10 мл фільтрату.

4. Виміряти оптичну густина одержаних розчинів за $640\div 660$ нм на ФЕК (товщина кювети 10 мм).

5. Обчислити кількість вивільненого хлорофілу за формулою:

$$M = C \cdot A$$

де M – кількість хлорофілу, екстрагованого з даної наважки, мкг;

C – концентрація хлорофілу в досліджуваному розчині, мкг/мл (за калібрувальним графіком);

A – об'єм досліджуваного розчину хлорофілу, мл.

6. Для одержання нерозчиненого хлорофілу, що залишився на фільтрі, додати 10 мл 90 %-го етилового спирту.

Примітка. Спирт додавати невеликими порціями до повного екстрагування пігменту.

7. Об'єм екстракту довести спиртом до 10 мл і виміряти оптичну густина розчину за $640\div 660$ нм на ФЕК.

8. Обчислити кількість неекстрагованого хлорофілу (мкг).

9. Обчислити міцність ХБЛК у ході екстрагування різними сумішами розчинників за формулою:

$$V = \frac{X \cdot 100}{M + X},$$

де V – міцність зв'язку ХБЛК відносно сумішей розчинників (% неекстрагованого хлорофілу);

M – кількість хлорофілу, екстрагованого сумішшю полярного та неполярного розчинників, мкг;

X – кількість хлорофілу, що залишився після екстрагування сумішшю розчинників, мкг.

10. Зробити висновки щодо залежності досліджуваного показника у різних варіантах досліджу.

Питання для самоконтролю

1. Що розуміють під міцністю зв'язку хлорофіл–білок–ліпідного комплексу?
2. Як саме вимірюють міцність зв'язку ХБЛК?
3. Назвіть полярні та неполярні розчинники.
4. Коли міцність ХБЛК вища: за більшого чи меншого вилучення хлорофілу?

Робота 11. Будова хромосом. Мітотичний поділ клітини. Порівняння мітозу, мейозу

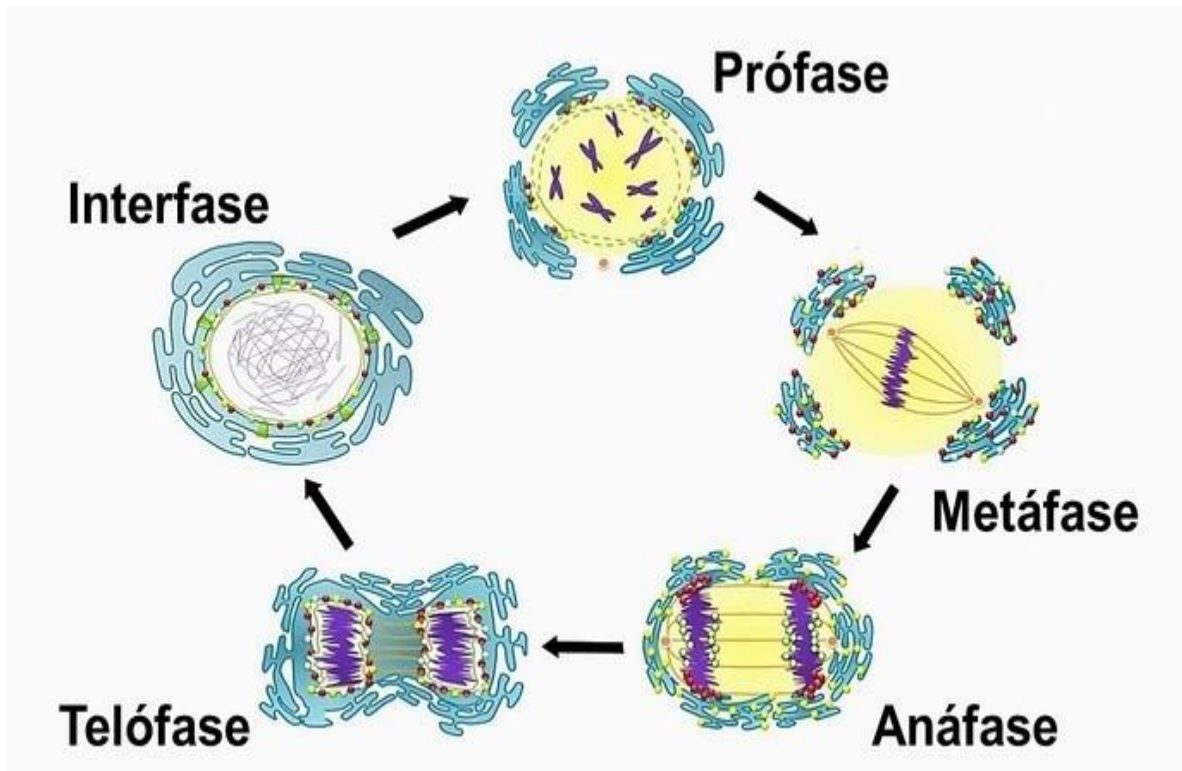
Мета заняття: вивчити особливості будови хромосом, дати характеристику фазах мітозу та мейозу та відзначити відмінності між мітозом та мейозом.

Матеріали та обладнання: цитогенетичні препарати мітозу, мейозу; схеми будови хромосом.

Мітоз - це процес поділу клітини, коли клітина бере початок з двох клітин, однакових з материнською клітиною, тобто з однаковою кількістю хромосом. Термін мітоз походить від грецького слова *Myths*, що означає плести нитки.

Функція мітозу полягає у забезпеченні росту та заміщення клітин. Важливість цього розмноження клітин полягає у підтримці розмноження одноклітинних істот, для здійснення процесів загоєння та відновлення тканин. Цей тип поділу клітин відбувається в диплоїдних клітинах і в деяких клітинах тварин і рослин.

Фази мітозу:



Профаза є першою стадією мітозу. Під час профазы конденсуються хромосоми та формується веретено поділу. У деяких організмів, зокрема тварин та рослин, руйнується ядерна оболонка (відкритий мітоз). Якщо вона не руйнується (закритий мітоз, як у більшості грибів), веретено поділу формується всередині неї.

Метафаза (від давньогрец. *μετά* (поруч) та *φάσις* (стадія)) — одна зі стадій мітотичного поділу клітини. Протягом метафазы ядерна мембрана руйнується і утворюється веретено поділу, а хромосоми прикріплюються до його центру, утворюючи метафазну пластинку. Важливо відзначити, що вони залишаються в такому положенні протягом досить тривалого часу. У зв'язку з цим метафаза є найзручнішою для підрахунку кількості хромосом у клітині.

Анафаза (від грецьк. *ἀνά*, «вверх» and *φάσις*, «стадія»). Під час анафазы хроматиди роз'єднуються й розходяться до протилежних полюсів клітини. Цей рух відбувається синхронно й забезпечується взаємодією двох процесів: скорочення ниток веретена поділу клітини, що зв'язують хромосоми з її полюсами, та подовження центральних ниток веретена, що зв'язують обидва

полюси. Завдяки такому механізму хромосоми чітко розходяться до полюсів клітини.

Фаза деспіралізації однохроматидних хромосом. Її називають ще "профазою навпаки", оскільки відбуваються процеси, що є протилежними до процесів профазы: деспіралізація однохроматидних хромосом, розташування центріолей біля ядра, формування ядерця (ядерець), утворення ядерної оболонки та руйнування веретена поділу.

Мейоз – це спосіб поділу еукаріотичних клітин, унаслідок якого з однієї материнської утворюються 4 дочірні клітини з удвічі меншим набором хромосом.

Цей тип поділу включає 2 послідовних поділи, кожний з яких складається з 4 фаз: *профазы, метафазы, анафазы і телофазы*. Набір хромосом перед поділом у материнських клітинах диплоїдний, а в дочірніх клітинах – гаплоїдний. Стан спадкової інформації після поділу видозмінений завдяки процесам кон'югації і кросинговеру. Мейоз вперше описав німецький біолог О. Гертріг у 1876 році на прикладі яєць морських їжаків. Проте важливість мейозу в спадковості була описана лише в 1890 році німецьким біологом А. Вайсманом.

Етапи і фази мейозу:

I етап – редуційний поділ, або Мейоз I:

Профаза I – фаза спіралізації (конденсації) *двохроматидних хромосом*. Вона є найтривалішою за часом у мейозі, під час неї відбувається ряд процесів. В ній виділяють:

Лептотена (стадія тонких ниток) — початок конденсації хромосом, в цілому нагадує ранню профазу мітозу, відрізняючись більш тонкими хромосомами і великими ядрами.

Зиготена (стадія ниток, що зливаються) — зближення та початок кон'югації гомологічних хромосом; наприкінці її всі гомологи поєднуються в біваленти.

Пахітена, чи пахінема — (найдовша) — в деяких місцях гомологічні хромосоми щільно з'єднуються, утворюючи хіазми. В них проходить кросинговер — обмін ділянками між гомологічними хромосомами.

Диплотена, чи диплонема — проходить часткова деконденсація хромосом, при цьому частина геному може бути активна: проходять процеси транскрипції (синтез РНК), трансляції (синтез білка); гомологічні хромосоми залишаються з'єднаними між собою. У деяких тварин в ооцитах хромосоми на цій стадії набувають характерної форми хромосом типу лампових щіток.

Діакінез — ДНК знову максимально конденсується, синтетичні процеси припиняються, розчиняється ядерна оболонка; центріолі розходяться до полюсів; гомологічні хромосоми залишаються з'єднаними між собою.

Профаза - *це спіралізація* двохроматидних хромосом. Хромосоми вкорочуються й ущільнюються та набувають вигляду паличкоподібних структур. Після цього гомологічні хромосоми зближуються і кон'югують (тісно прилягають одна до одної по всій довжині, обвиваються, перехрещуються). Так утворюються комплекси з 4 хроматид, сполучених між собою в певних місцях, так звані *тетради*, або *біваленти*.

Кон'югація (зближення і злиття ділянок гомологічних хромосом) і **кросинговер** (обмін певними ділянками між гомологічними хромосомами). У результаті кросинговеру утворюються нові комбінації спадкового матеріалу. Таким чином, кросинговер є одним із джерел спадкової мінливості. Через певний час гомологічні хромосоми починають відходити одна від одної. При цьому стає помітним, що кожна з них складається з двох хроматид.

Розходження центріолей до полюсів.

Зникнення ядерця.

Розпад ядерної оболонки на фрагменти.

Формування веретена поділу.

Метафаза I – фаза розташування тетрад на екваторі:

- короткі нитки прикріплюються до центромер лише з одного боку і хромосоми розташовуються двома лініями;
- на екваторі клітини розташовуються тетради.

Анафаза I – фаза розходження двохроматидних гомологічних хромосом.

- кожна тетрада розділюється на двохроматидні хромосоми;
- нитки веретена поділу скорочуються і розтягують двохроматидні хромосоми до полюсів. Наприкінці анафази біля кожного з полюсів клітини опиняється гаплоїдний (половинний) набір хромосом.

Розходження хромосом кожної пари є подією випадковою, що є ще одним джерелом спадкової мінливості.

Телофаза I – фаза деспіралізації двохроматидних хромосом:

- утворення двох клітин з гаплоїдним набором двохроматидних хромосом;
- у клітинах тварин та деяких рослин хромосоми деспіралізуються і поділяється цитоплазма материнської клітини, але в клітинах більшості видів рослин цитоплазма не ділиться.

Результатом Мейозу I є утворення з однієї материнської клітини двох

дочірніх клітин з гаплоїдним набором двохроматидних хромосом.

II етап – мітотичний, або Мейоз II

Профаза II – фаза спіралізації двохроматидних хромосом.

Метафаза II – фаза розташування двохроматидних хромосом на екваторі.

■ короткі нитки прикріплюються до центромер;

■ на екваторі клітини в один ряд розташовуються двохроматидні хромосоми.

Анафаза II – фаза розходження однохроматидних хромосом до полюсів клітин:

■ кожна хромосома розділюється на хроматиди;

■ нитки веретена поділу скорочуються і розтягують хроматиди до полюсів.

Телофаза II – фаза деспіралізації однохроматидних хромосом:

■ утворення двох клітин з гаплоїдним набором однохроматидних хромосом.

Отже, загальним результатом мейозу є утворення з однієї материнської клітини 4 дочірніх клітин з гаплоїдним набором однохроматидних хромосом.

Біологічне значення мейозу:

- забезпечує видозміну спадкового матеріалу;
- підтримує сталість каріотипу при статевому розмноженні;
- лежить в основі статевого розмноження.

Завдання 1. Позначте цифрами на рисунку 1 особливості морфології хромосом та вкажіть їх типи

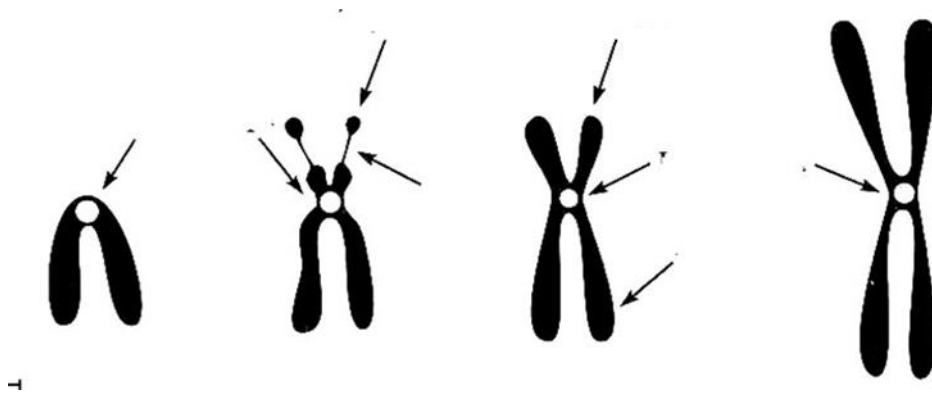


Рис. 2 Типи хромосом

- 1 – центромера
- 2 – теломера
- 3 – тіло хромосоми
- 4 – супутник
- 5 – вторинна перетинка
- 6 – акроцентрична хромосома

- 7 – метацентрична хромосома
- 8 – субметацентрична хромосома
- 9 – коротке плече (p)
- 10 – довге плече (q)

Завдання 2. Розгляньте на фіксованих препаратах та схемах клітини в період інтерфази, профази, анафази та телофази мітозу і зобразіть ці етапи в таблиці.

Характеристика фаз мітозу

Фаза	Малюнок	Короткий опис
Інтерфаза		
Мітоз		
Профаза		
Метафаза		
Анафаза		
Телофаза		

Характеристика фаз мейозу

Фаза	Малюнок	Короткий опис
Профаза 1		
Лептотена		
Зиготена		
Пахітена		
Диплотена		
Діакінез		
Метафаза 1		
Анафаза 1		
Телофаза 1		
Мейоз 2		
Метафаза 2		
Анафаза 2		
Телофаза 2		

Завдання 3. Позначте в таблиці існуючі відмінності між процесами мітозу та мейозу.

Відмінності мітозу від мейозу

Зміст	Мітоз	Мейоз	
		Редукційний поділ	Еквацийний поділ
Профаза			
Метафаза			
Анафаза			
Телофаза			
Кількість дочірніх клітин			
Дочірні клітини генетично ідентичні			
Місце поділу			
Біологічне значення			

Питання для самоконтролю

1. Що собою являє мітоз?
2. Які фази мітозу виділяють?
3. Що таке мейоз?
4. Які клітини утворюються після мейозу?
5. Який результат першого поділу мейозу?
6. Який результат другого поділу мейозу?
7. Яку біологічну роль відіграє кросинговер?
8. Чим подібні й відмінні мітоз та мейоз?
9. Як змінюється спадквоа інформація в мейозі?
10. У чому полягає біологічна роль мейозу?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Левандовський Л. В., Дрюк В.Г., Семенова О.І. та ін. Біологічна хімія. – К.:НУХТ. 2012. 363 с.
2. Губський Ю.І., Біологічна хімія: Підручник. – Київ-Тернопіль. – Укрмедкнига, 2000. 492 с.
3. Марченко О. А. Біологія клітини (методичні рекомендації) / О. А. Марченко, П. М. Царенко, О. А. Петльований. – К. : Видавничий центр НАУ, 2007. – 18 с
4. Жорнер Л.Г., Дехтяренко Н.В., Ліновицька В.М. Біологія клітини. Лаб. Практикум. Київ: Вид-во «Політехніка», 2020. – 52 с
5. Столяр О.Б. Молекулярна біологія / О.Б. Столяр. – Київ: КНТ.2021. – 224 с.
6. Боєчко Ф.Ф. Основи молекулярної біології. / Ф.Ф. Боєчко, Л.О. Боєчко, І.В. Шмиголь. – Черкаси : Вид. відділ ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2010. – 460 с.
7. Столяр О. Б. Молекулярна біологія: навч. посібник. 2-ге вид., доповнене та перероблене. Київ: Вид-во "КНТ", 2017. 224 с.
8. Столяр О. Б. Біологічна хімія. 2-е видання. Київ: Вид-во «КНТ», 2016. 369 с.
5. Столяр О. Б. Біологічна хімія: навч. посібн. 3-тє вид., перероблене і доповнене. Тернопіль: Вид-во ТНПУ, 2019. 374 с
9. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: Видавничо-поліграфічний центр Київський університет, 2008. 384 с.
10. Гребінник Д. М. Альтернативні форми елімінації клітин. Фізика живого. – Т. 21, № 1-2, 2014. – С. 4 – 14.
11. Брик Т.М. Енциклопедія мембран: у 2 т. – К.: Вид. дім «Києво-Могилянська академія», 2005. – Т.1. – 658 с.
12. Остапченко Л.І., Михайлик І.В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури і функцій: навч. посіб. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. – 215 с.
13. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
14. Molecular biology of the cell. 6th ed. / В. Alberts, А. Johnson, J. Lewis et al. — N.-Y.: Garland Science, 2014. — 1464 p.
15. Molecular Cell Biology. 8th ed. / Н. Lodish, А. Berk, Kaiser С.А. et al. — N.-Y.: W.H. Freeman & Co. Ltd, 2016. — 1280 p.
16. M. Fragkos, P Beard Mitotic catastrophe occurs the absence of apoptosis in p53-null with a defective G1 checkpoint // Plos. ONE. — 2011. — Vol. 6, Issue 8. — P. 1–12