

Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр
«Мала академія наук України»

Антоненко С. В.

КЛІТИННА БІОЛОГІЯ

*Методичні рекомендації
та лабораторний практикум*



Київ 2018

Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр «Мала академія наук України»

Антоненко С. В.

КЛІТИННА БІОЛОГІЯ

*Методичні рекомендації та
лабораторний практикум*

Київ 2018

УДК 576.32/36 + 576.08

Методичні рекомендації та лабораторний практикум
«Клітинна біологія» / Автор-укладач: Антоненко С. В. – Київ, 2018.
– 36 с.

Посібник містить теоретичний та практичний матеріал з курсу
«Клітинна біологія». Лабораторний практикум розрахований на
учнів хіміко-біологічної школи Малої академії наук України.

© Антоненко С. В., 2018.
© Національний центр «Мала академія наук України», 2018.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА.....	4
ПРАВИЛА ПОВЕДІНКИ ПІД ЧАС РОБОТИ У БІОЛОГІЧНОМУ КАБІНЕТІ.....	5
<i>РОЗДІЛ 1.</i> КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ЯК НАУКА.....	7
<i>РОЗДІЛ 2.</i> КЛІТИНА – СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОДИНИЦЯ ЖИВОГО.....	8
<i>РОЗДІЛ 3.</i> ПРОКАРІОТИ.....	10
<i>РОЗДІЛ 4.</i> ЕУКАРІОТИ.....	17
ЛІТЕРАТУРА.....	33

ПЕРЕДМОВА

Клітинна біологія – наука із стрімким розвитком, яка виникла на перетині таких наук як цитологія, біохімія, генетика, молекулярна біологія, біофізика. Розуміння будови і функцій клітин, їх субструктур, фізіологічних процесів, особливостей росту, розмноження і розвитку необхідні не лише біологам, а й лікарям, фармацевтам, косметологам, палеонтологам, ветеринарам, агробіологам тощо.

Основною метою цього посібника є надання методичної допомоги учням для більш ефективного засвоєння знань, закріплення теоретичного матеріалу, а також осмисленого виконання лабораторних робіт під час вивчення курсу «Клітинної біології». Основна увага надається вивченню особливостей будови та функцій прокаріотичних і еукаріотичних клітин. Під час курсу учні познайомляться з такими сучасними методами біології, як трансформація бактерій, агарозний гель-електрофорез, Western blot аналіз, МТТ-тест тощо. Отримані знання допоможуть учням у формуванні сучасного наукового світогляду, сприятимуть вихованню екологічно свідомої особистості.

Для досягнення даної мети необхідно виконати ряд завдань, які відповідають основним етапам роботи:

1. Підбір та опрацювання літератури з курсу, яка відображає особливості морфології та ультраструктури, фізіологію прокаріотичних та еукаріотичних клітин, висвітлює основні моменти росту та розмноження, культивування клітин в лабораторних умовах.

2. Вивчити правила та вимоги техніки безпеки під час роботи в біологічній лабораторії, ознайомитися з основним лабораторним посудом та правилами його стерилізації, навчитися готувати поживні середовища, дослідити фізіологічні особливості росту та розмноження прокаріот та еукаріот, навчитися методам трансформації бактерій, агарозного гель-електрофорезу, Western blot аналізу, МТТ-тесту тощо

3. Проаналізувавши отримані експериментальні дані, зробити висновки.

Правила поведінки під час роботи в біологічному кабінеті

I. Загальні положення

1.1. Під час роботи в кабінеті біології будьте обережними, дотримуючись порядку й чистоти на робочому місці, дотримуйтеся правил безпеки. Безладність, поспішність, необачність у роботі й порушення правил техніки безпеки можуть привести до нещасних випадків.

II. Вимоги безпеки перед початком роботи

- 2.1. Чітко з'ясуйте порядок і правила проведення досліду.
- 2.2. Перевіряйте наявність і надійність посуду, приладів та інших предметів, необхідних для виконання завдання.
- 2.3. Звільніть робоче місце від усіх непотрібних для роботи предметів та матеріалів.
- 2.4. Починайте виконувати завдання тільки з дозволу вчителя.
- 2.5. Виконуйте тільки ту роботу, що передбачена завданнями або доручена вчителем. Виконувати роботи не пов'язані з завданням забороняється.
- 2.6. Не відволікайтеся самі і не відволікайте інших від роботи сторонніми розмовами.

III. Вимоги безпеки під час виконання роботи

- 3.1. Для виконання завдання користуйтеся посудом і приладами виданими вчителем.
- 3.2. Нагріваючи рідини, тримайте посудину отвором від себе і не спрямовуйте на сусідів.
- 3.3. Обережно поведіться з гострими предметами (ножицями, препарувальними голками).
- 3.4. Розбавляючи концентровані кислоти водою, обережно доливайте кислоту у воду, а не навпаки.
- 3.5. Посуд, у якому проводять досліди з органічними розчинниками, перед заповненням повинен бути чистим та сухим.

IV. Вимоги безпеки після закінчення роботи

- 4.1. Розлиті випадково кислоти або розчини лугів збирайте і зливайте в місця вказані вчителем.
- 4.2. Після закінчення роботи ретельно вимийте руки з милом.

V. Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

- 6.1. Не пробуйте хімічні речовини на смак, адже будь-яка з них у тій чи іншій мірі є отруйною.
- 6.2. Не заглядайте в посудину зверху (навіть у пробірку), тому що у випадку виштовхування рідини може статись нещасний випадок.
- 6.3. Нагріваючи рідини, не залишайте їх без нагляду навіть на короткий час.

6.4. При виявленні несправності установок негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя.

6.5. При попаданні на шкіру, одяг будь-яких речовин негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя та змийте їх великою кількістю води.

З правилами ознайомле-ний /-на

П.І.П.

(дата)

(підпис)

РОЗДІЛ 1.

КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ЯК НАУКА

Клітинна біологія – це розділ біології, який досліджує будову і функції клітини як основної структурно-функціональної одиниці живих істот. Як самостійна наука виокремилася після винайдення мікроскопа (Р. Гук, М. Мальпігі, А. Левенгук).

Сучасна клітинна біологія займається широким колом проблем, серед яких – молекулярна будова ядерних структур (хроматину та хромосом) та їхня роль у життєдіяльності клітин, механізми поділу, цикли еукаріотичних клітин, клітинні органели, зокрема генераторів хімічної енергії - мітохондрії, хлоропласти, які в рослинних клітинах здійснюють фотосинтез, взаємодія ядерних і пластом. геномів, структура й функція поверхн. мембрани клітини, її цитоскелета, внутр. мембранна система, простор.-часова організація метаболізму та його регуляція. Значну увагу приділяється розкриттю механізмів тих клітинних процесів, які використовуються на практиці в медицині і біотехнологіях. Зокрема вивчають механізми утворення клітинних гібридів, трансгенозу, виявлення та клонування генів, здійснюють пошук векторів, придатних для переносу генетичної інформації, розробляють оптимальні способи культивування клітин на штучних середовищах, досліджують природу явищ, пов'язаних зі сприйняттям клітиною різних сигналів, на які вона відповідає у формі адаптації до дії стресовий чинників або зміни темпів розвитку та характеру спеціалізації. Велике значення для медицини має дослідження механізмів регуляції процесу перетворення стовбурових клітин у диференційовані, в чому проявляється зв. тотипотентність клітини, унаслідок якої із зародкової може виникати спеціалізована зріла клітина будь-якої тканини за умови наявності відповід. системи сигналів, котрі в сукупності мають назву «позиційна інформація». Саме з цим аспектом клітинної біології пов'язані можливості лікування багатьох досі невиліковних захворювань. Клітинна біологія має низку розділів: каріосистематика, радіаційна клітинна біологія, біологія ракової клітини, цитопатологія, імуноцитологія та інші.

В Україні клітинна біологія має давню історію. На поч. 20 ст. С.Навашин відкрив подвійне запліднення у покритонасінних рослин. Значний внесок у розвиток науки також зробили А.Сапегін, В.Фінн, Я. Модилевський, які виявили цитоплазматичну стерильність та опрацювали клітинні аспекти ембріології.

РОЗДІЛ 2.

КЛІТИНА ЯК ОСНОВНА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОДИНИЦЯ ЖИВОГО

Клітина – це структурно упорядкована елементарна жива система, обмежена активною оболонкою, диференційована на цитоплазму і ядро, яка лежить в основі будови, життєдіяльності, функції та розвитку рослинних та тваринних організмів.

Завдання 1. Вивчити основні позиції клітинної теорії, з'ясувати хто є авторами клітинної теорії.

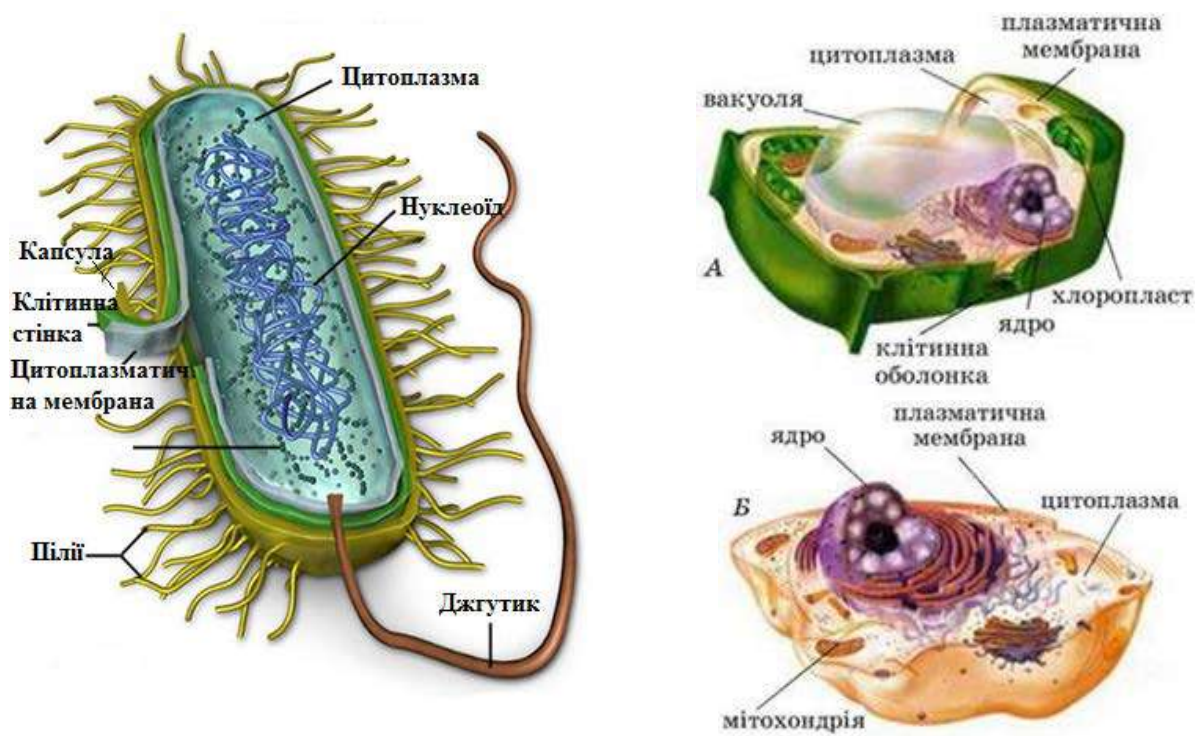
— клітина — основна структурно-функціональна і генетична одиниця живих організмів, найменша одиниця живого;

— клітини всіх одноклітинних і багатоклітинних організмів схожі за будовою, хімічним складом і найважливішими виявами процесів життєдіяльності;

— кожна нова клітина утворюється в результаті поділу початкової (материнської) клітини;

— клітини багатоклітинних організмів спеціалізовані: вони виконують різні функції і утворюють тканини.

Завдання 2. Користуючись малюнком 1. та додатковою літературою порівняти будову клітини прокаріот та еукаріот, дані внести до таблиці 1.



Мал.1. Схема будови клітин прокаріот (1) та еукаріот (2-А,В).

Табл.1. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот 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			

Висновки _____

РОЗДІЛ 3. ПРОКАРІОТИ

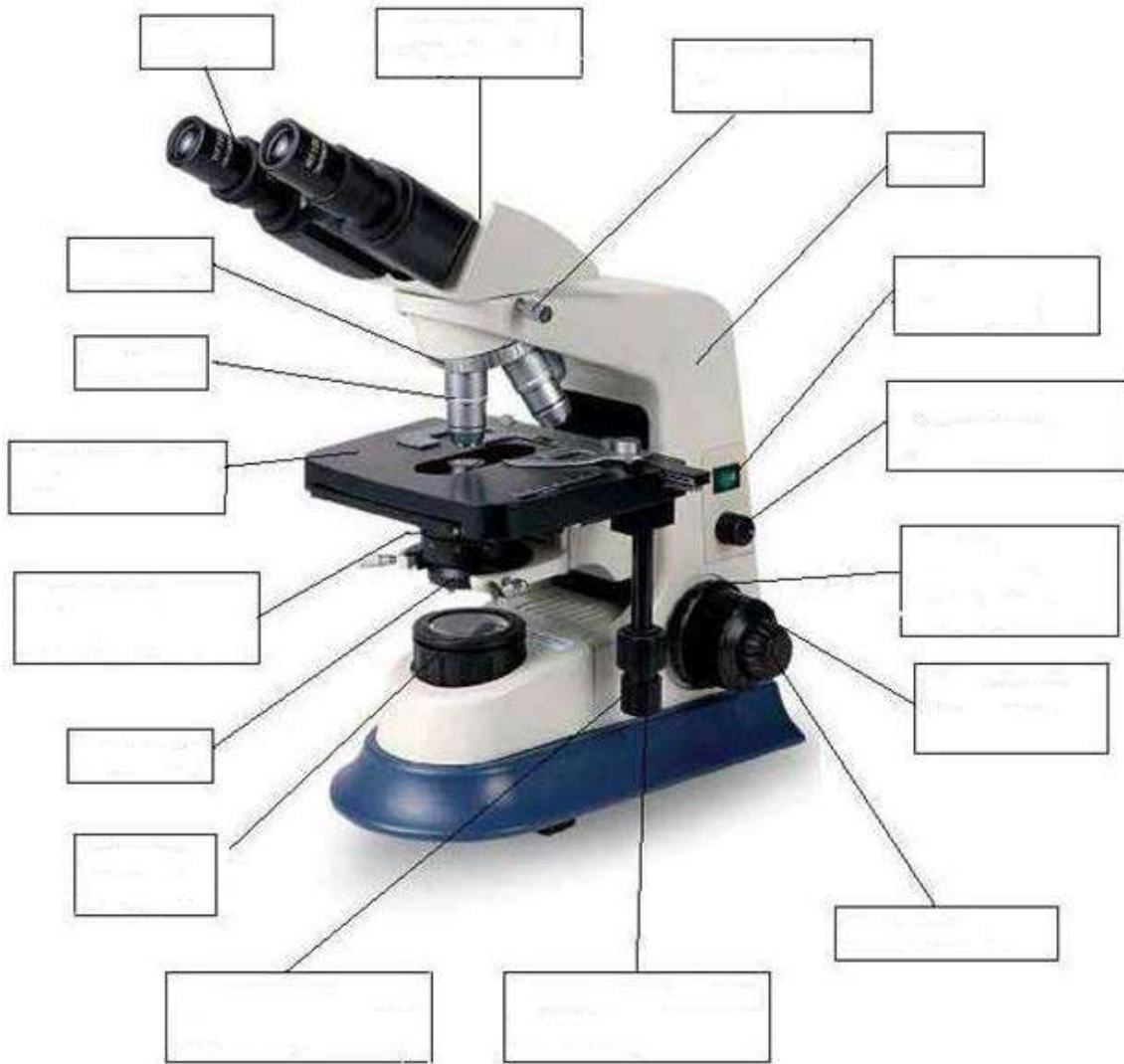
Прокаріоти (*Prokariota*) – це доядерні мікроорганізмів, які не володіють типовим клітинним ядром і хромосомним апаратом, клітина складається із оболонки, цитоплазматичної мембрани, яка може утворювати вп'ячування в цитоплазму, та власне цитоплазму з нуклеоїдом, рибосомами та включеннями. А також мають додаткові елементи будови: капсулу, плазміди, джгутики, фібрії тощо. Живлення прокаріот вельми складний процес, який відбувається за рахунок безперервного проникнення певних поживних речовин через напівпроникну оболонку і виділення з клітини продуктів обміну. Можливість проникнення речовин залежить від розміру, структурної будови молекули, її здатності до розчинення у компонентах цитоплазматичної мембрани, концентрації речовин тощо. Так як оболонка бактерій непроникна для білків та інших складних сполук, необхідних для живлення клітини, ці речовини засвоюються після розщеплення ферментами. Велике значення для нормального харчування бактерій має правильне співвідношення концентрацій солей всередині клітин і в навколишньому середовищі. Найбільш сприятливі умови харчування створюються при концентрації солей у навколишньому середовищі, рівній 0,5% розчину NaCl. При попаданні в 2-10%-ний розчин NaCl відбувається зморщування бактеріальної клітини - зневоднення, яке робить її нездатною до розмноження. На цьому заснований спосіб консервування продуктів за допомогою соління.

Форма бактерій та їх розміри мають велике таксономічне значення і є важливими критеріями при їх ідентифікації. Таким чином, прокаріоти поділяють на декілька груп: коки - клітини кулястої форми, розрізняють декілька груп коків по взаємному розташуванню окремих клітин (мікрококи, диплококи, тетракоки, стрептококи, стафілококи, сарцини), паличкоподібні (циліндричну, еліпсоподібну, овальну, веретеноподібну, у вигляді барабанної палички або тенісної ракетки), спіралеподібні (вібріони, спірили, спірохети), ниткоподібні та бактерії незвичайної форми (трикутні, циліндричні, шестикутної зірки тощо).

Розмноження бактерій – процес, що забезпечує збільшення числа особин в популяції. Бактерії характеризуються високою швидкістю розмноження. Найчастіше бактерії розмножуються нестатевим, бінарним, поділом. У кулястих бактерій може проходити по будь-якому з діаметрів клітини; у паличковидних і звивистих бактерій перегородка ділить тіло впоперек; поділ спірохет може відбуватися вздовж тіла бактерії.

Прокаріоти широко поширені в навколишньому середовищі: ґрунті, воді, на рослинах, в організмі людини і тварин.

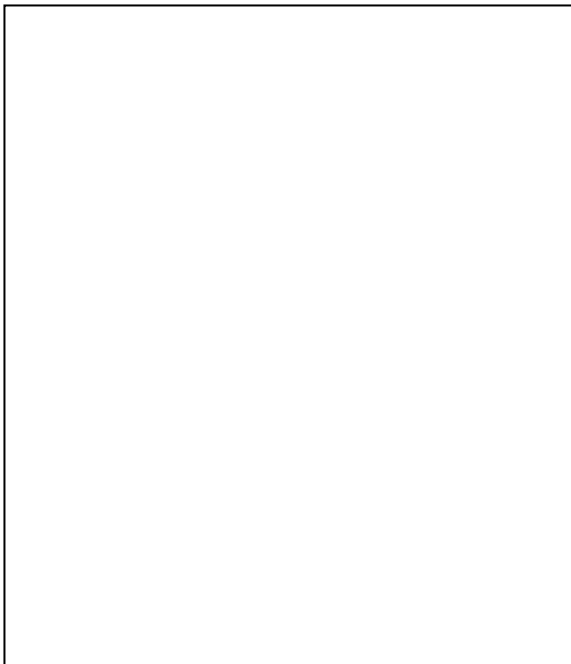
Завдання 1. Вивчити будову мікроскопа, зробити відповідні позначення на мал.2 та занотувати до зошита правила роботи з ним.

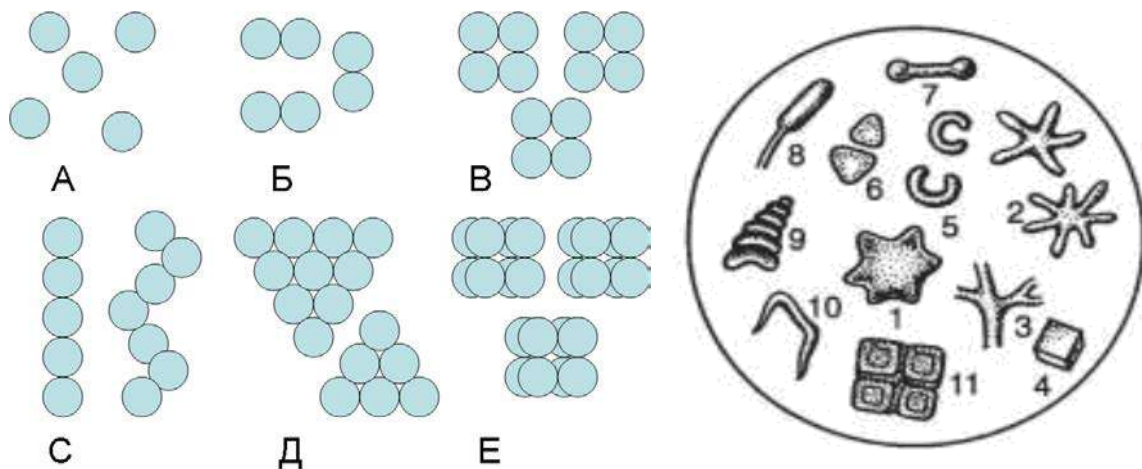


Мал 2. Будова світлового мікроскопу

Правила роботи з мікроскопом:

Завдання 2. Розглянути мікропрепарати із різними видами бактерій, побачене під мікроскопом замальовати до робочого зошита та користуючись додатковою літературою і мал. 3(1), (2) визначити морфологічні форми побачених бактерій.

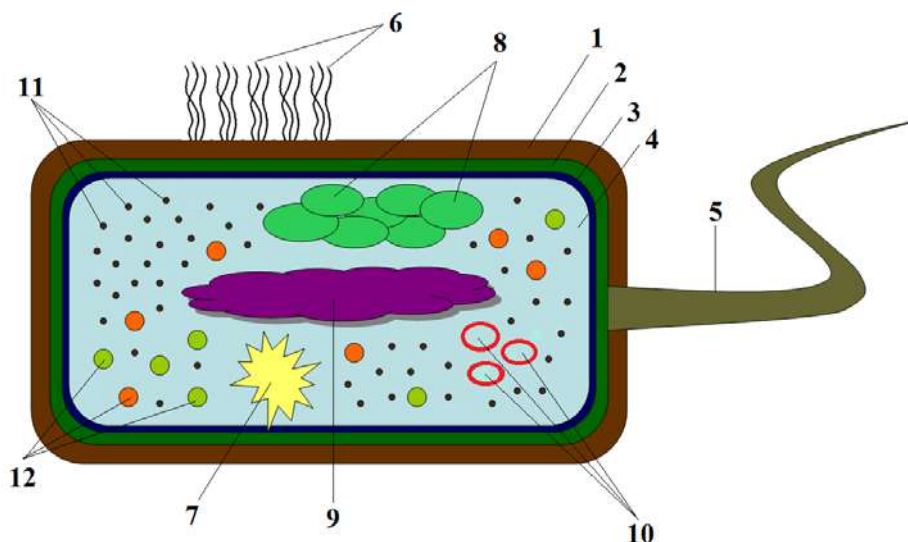




Мал. 3 (1): Схема коковидних форм бактерій: А-мікрококи, Б-диплококи, В- тетракоки, С- стрептококи, Д- стафілококи, Е- сарцини.

3 (2): Незвичайні форми бактерій: 1– бактерії типу шестикутної зірки, 2 – бактерії, які утворюють вирости (простеки), 3 – бактерії, які галузяться, 4 – пластинчасті клітини архебактерій, 5 – тороїди, 6 – трикутні, 7 – гантелеподібні бактерії, 8 – стебельцеві бактерії, 9 – трихоми не циліндричні, 10 – червоподібні бактерії, 11 – клітини, з'єднані в пластинки

Завдання 3. Вивчити внутрішню будову прокаріот (див. мал.4) та заповнити таблицю 2: «Внутрішня будова прокаріот».



Мал. 4. Схема будови прокаріот: 1 – капсула, 2 – клітинна стінка, 3 – клітинна мембрана, 4 – цитоплазма, 5 – джгутик, 6 – фібрії, 7 – мезосома, 8 – фотосинтетичні мембрани, 9 – нуклеоїд, 10 – плазмід (позахромосомні спадкові елементи), 11 – рибосоми, 12 –включення.

Табл. 2: Внутрішня будова прокаріот:

	Органела або фракція:	Основні функції:
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		

Завдання 4. Вивчити фізіологічні особливості росту та розмноження прокариот.

4.1. Зробити необхідні розрахунки та приготувати ____ мл. рідкого поживного середовища NB:

NB - _____

dH₂O - _____

4.2. У три стерильні 15 мл. пробірки (склянні чи пластикові) внести 5 мл. отриманого поживного середовища. У першу пробірку додати ____ мкл. антибіотику _____, у другу пробірку ____ мкл. лимонного соку, третю залишити без змін, вона буде використана в якості контролю. Здійснити посів бактеріальної культури у всі три пробірки. Ретельно закрити пробірки та поставити до термостату з температурою +37°C на 12-24 год. Також бажано, щоб при цьому пробірки із культурою перемішувалися на відповідному шейкері.

!! Слід пам'ятати, що працювати потрібно біля полум'я спиртівки, щоб зберегти стерильні умови та не допустити контамінації.

4.3. Аналіз бактеріальної культури після інкубації, зазначити за яких умов бактерії росли найкраще, де швидкість росту погіршилася, чи можливо зовсім не відбувалася, пояснити чому. Отримані дані внести до табл.3: «Особливості росту та розмноження прокариот». Зробити відповідні висновки.

Табл. 3: Особливості росту та розмноження прокариот:

Номер пробірки:	Особливості умов культивування:	Ріст через ____ год.	Висновки:
1			
2			
3			

Завдання 5. Познайомитися з методом трансформації бактерій.

5.1. Підготовчий етап, зробити необхідні розрахунки та приготувати поживні середовища:

Рідке поживне середовище:

NB - _____

dH₂O - _____

Агаризоване поживне середовище:

NB - _____

Агар - _____

Арабіноза - _____

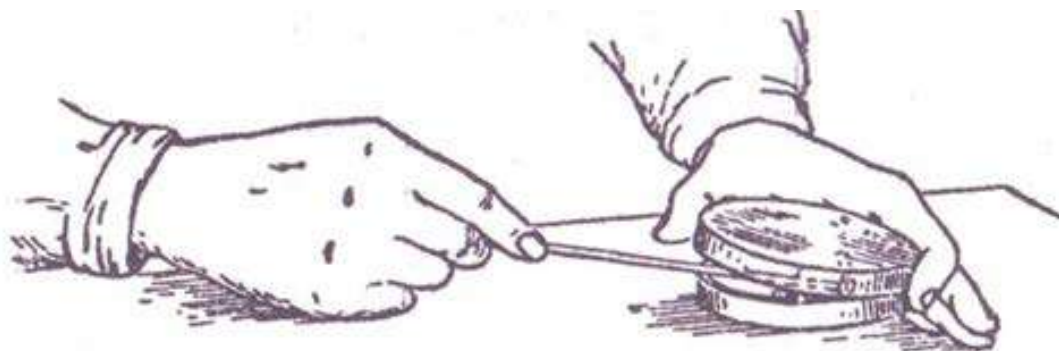
dH₂O - _____

Рідке поживне середовище охолоджують до температури +37°C та залишають для подальшого використання. В охолоджене агаризоване середовище додають ___ мкл. антибіотика (_____), ретельно перемішують та заливають ним чашку Петрі, залишають на 10-15хв. застигати. ! Слід пам'ятати, що працювати потрібно біля полум'я спиртівки, щоб зберегти стерильні умови та не допустити контамінацію.

5.2. У 50-70 мкл. компетентних клітин *E.coly* внести 2-3 мкл. _____ плазмід, перемішати та залишити в льодові на 30 хв.

5.3. Водяну баню нагрівають до температури +42°C. Після 30 хв. інкубації на льодові пробірки з клітинами переносять до водяної бані з температурою +42 °C на 90 секунд та різко повертають на лід на 2-3 хв. Після цього до клітин додають близько 200-300 мкл. рідкого поживного середовища та залишають на 40 хв. у термостаті з температурою +37°C.

5.4. Клітини висівають на агаризоване поживне середовище чашки Петрі: піднявши край чашки, необхідний об'єм рідини розвозять шпателем Дригальського по всій поверхні середовища і закривають чашку (Мал. 5).



Мал. 5. Посів бактеріальної культури на агаризоване середовище

5.5. Чашку Петрі позначають (культура, дата, дослідник) і залишають у термостаті з температурою +37 °С на 10-12 год.

5.6. Проаналізувати отримані колонії на УФ-трансліюмінаторі.

!! – при роботі з УФ-трансліюмінатором необхідно використовувати окуляри, які захищають від УФ.

5.7. Висновки _____

РОЗДІЛ 4. ЕУКАРІОТИ

Еукаріоти – організми, клітини яких мають ядро, оточене мембранною оболонкою. Вважається, що перші еукаріоти з'явилися близько 2 млрд років тому і еволюціонували завдяки симбіогенезу – взаємодії клітин еукаріотів та бактеріями. До еукаріотів належать найпростіші, гриби, рослини і тварини. Генетичний матеріал зосереджений переважно у хромосомах, що мають складну будову й утворені нитками ДНК і гістоновими білковими молекулами. Поділ клітин - мітотичний. У цитоплазмі розрізняють багато характерних органел: центріолі, мітохондрії, пластиди та ін. Серед еукаріот існують як одноклітинні, так і багатоклітинні організми, яким властивий складний принцип структурної організації. Форми клітин можуть бути різноманітними, розміри коливаються в межах 5–100 мкм. Клітини мають подібний хімічний склад і обмін речовин. Вони розділені системою мембран на компартменти. Всі клітини мають єдину систему збереження та реалізації спадкової інформації. Однак клітини організмів, що належать до тварин, рослин, грибів і найпростіших, мають низку істотних особливостей.

У клітинах рослин і грибів над мембраною розташована щільна клітинна стінка з вуглеводів, яка обмежує рухливість тіла. У рослин вона побудована з целюлози, а в більшості грибів – з хітину. Тваринна клітина має лише клітинну мембрану з тонким надмембранним шаром, побудованим з вуглеводів. Клітинної щільної стінки в тваринних клітин немає. Це сприяє зміні форми клітин та активному способу життя тваринних організмів. Ознакою відмінності рослинних клітин є наявність у цитоплазмі особливих органел – пластид. Більшість цих органел мають зелене забарвлення – це хлоропласти. Вони містять зелений пігмент – хлорофіл, з допомогою якого клітини рослин поглинають світло й утворюють органічні речовини з неорганічних. Безбарвні пластиди – лейкопласти – запасують поживні речовини, а помаранчеві та червоні пластиди – хромопласти – надають органам рослин відповідного забарвлення. Клітини грибів і клітини тварин пластид не мають, тому їм властиве гетеротрофне живлення.

У цитоплазмі рослинних клітин і клітин грибів є вакуолі, заповнені клітинним соком. Ось тільки в рослин вони великі, а в грибів – менші. У клітинах тварин вакуолі теж можуть бути, але вони дрібні і виконують інші функції, (наприклад, перетравлювання речовин чи накопичення продуктів обміну для видалення).

Клітини тварин, рослин та грибів відрізняються також включеннями. Це непостійні структури клітини, які виконують здебільшого запасуючу функцію. У клітинах рослин у вигляді включень запасуються вуглеводи й крохмаль, а в клітинах тварин і грибів – глікоген.

Завдання 1. Вивчити особливості будови та життєдіяльності дріжджів за допомогою методу “роздушена крапля” та фіксованого забарвленого препарату.

1.1. Здійснити “вітальне” (прижиттєве) вивчення хлібопекарських дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) за допомогою методу “роздушена крапля”. Саме цей метод використовується для виявлення рухливості клітин, розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо. Препарат типу “роздушена крапля” отримують за наступним алгоритмом:

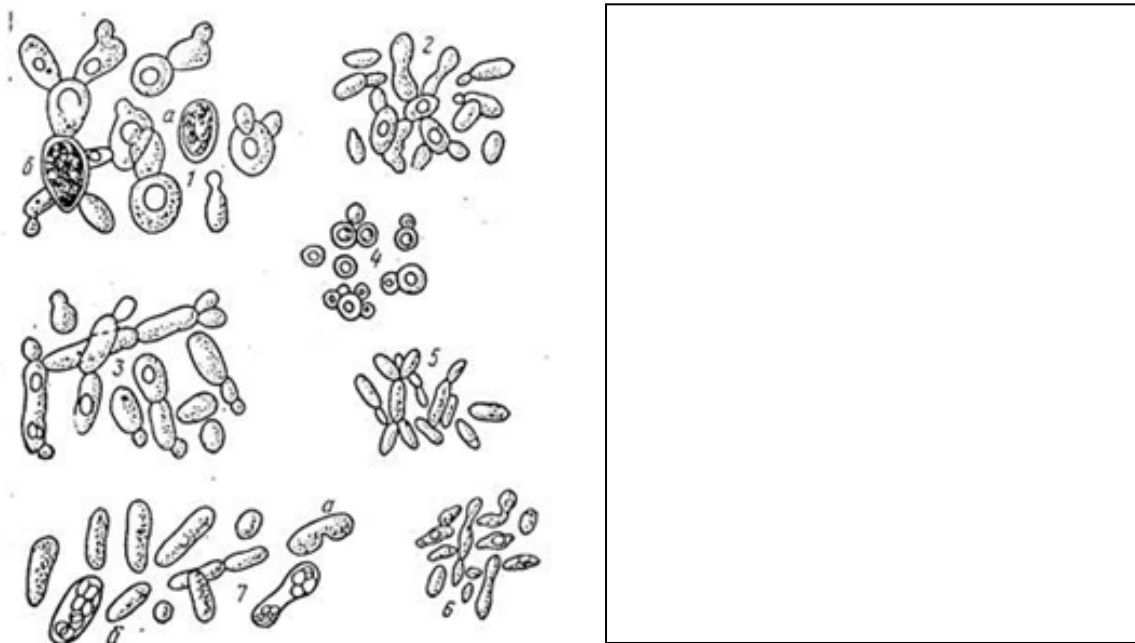
- отримати культуру дріжджів для дослідження, для цього у склянці теплої води розчиняють одну столову ложку цукру і кладуть невелику кількість дріжджів. Стакан закривають фільтрувальним папером і поміщають у тепле місце при температурі + 25 / + 30 ° С (краще в термостат). Через 1,5-2 години приготований розчин починає бродити, що говорить про те, що культура готова.

- на чисте предметне скло нанести краплю води;
- прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води;
- на краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу;

Також при виготовленні препарат доцільним є використання наступних барвників – метиленовий синій, нейтральний червоний (0,001-0,0001%). Характерною ознакою живих клітин є те, що барвники не зафарбовують внутрішній вміст клітини.

1.2. Отримані мікропрепарати дріжджів розглянути при збільшенні 40×. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

1.3. Побачені під мікроскопом дріжджі замалювати до зошита та порівняти їх морфологію із дріжджами зображеними на мал.



А

Б

Мал. 6.: А – форми клітин дріжджів: 1 – яйцеподібні (а, б – клітини в спокої); 2 – еліпсоподібні; 3 – паличкоподібні; 4 – кулясті; 5 – витягнуті; 6 – лимоноподібні; 7 – дріжджі під час поділу (а – копуляція клітин, б – клітини зі спорами).

Б – форми клітин дріжджів зафіксованих під мікроскопом:

1.4. Отримати фіксований забарвлений препарат хлібопекарських дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) за наступним алгоритмом:

- чисте знежирене предметне скло провести через верхню частину полум'я пальника, на середину скла за допомогою скляної палички чи піпетки нанести краплю води;

- стерильною петлею чи піпеткою внести в неї досліджувану культуру мікроорганізмів і розподілити рівномірно на площі 1-4 см², препарат висушити, тримаючи скло високо над полум'ям. препарат, тобто вбити мікроорганізми і забезпечити їх прилипання до поверхні скла;

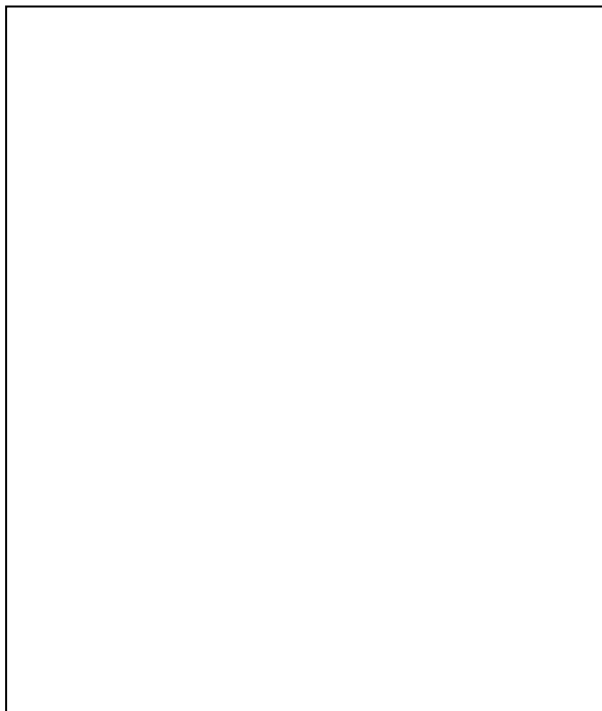
- зафіксувати препарат – скло з препаратом провести тричі через верхню частину полум'я пальника (термічна фіксація) або хімічна фіксація за допомогою метилового чи етилового спирту

Завдання 2. Виготовити і розглянути під мікроскопом препарат представника роду Мукор (*Mucor*), за наступним алгоритмом:

2.1. Для розгляду слід обережно взяти препарувальною голкою міцелій та розмістити на предметне скло;

2.2. Препарат спочатку розглядають без покривного скла при малому збільшенні мікроскопа. Видно спорангієносці і круглі темні кульки на їх кінцях – спорангії. Переважно вони вкриті тонкими кришталіками оксалату кальцію;

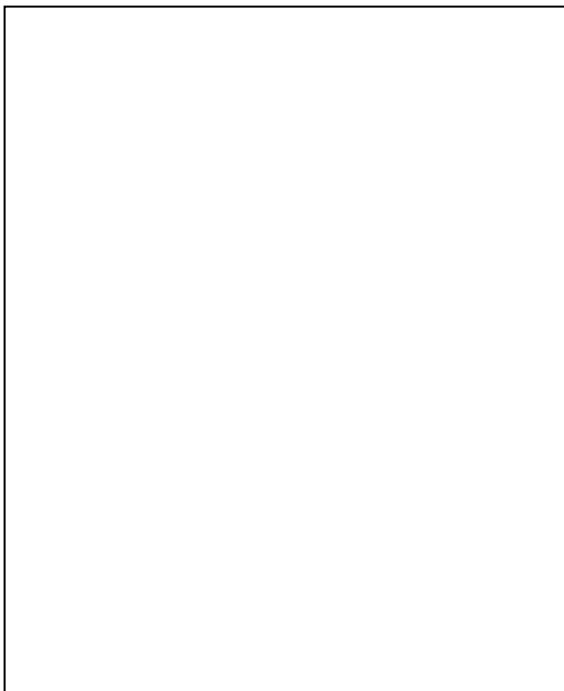
2.3. Потім на препарат наносять краплю води, накривають його покривним склом. Оболонка спорангію при цьому руйнується і спори вивільняються, препарат розглянути послідовно при малих і великих збільшеннях, замалювати їх до зошита, зробити позначки частин клітини.



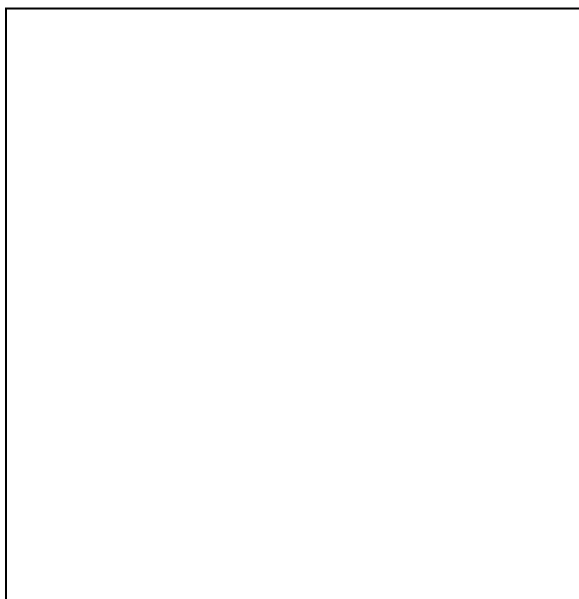
Висновки: _____

Завдання 3. Вивчити особливості рослинних клітин.

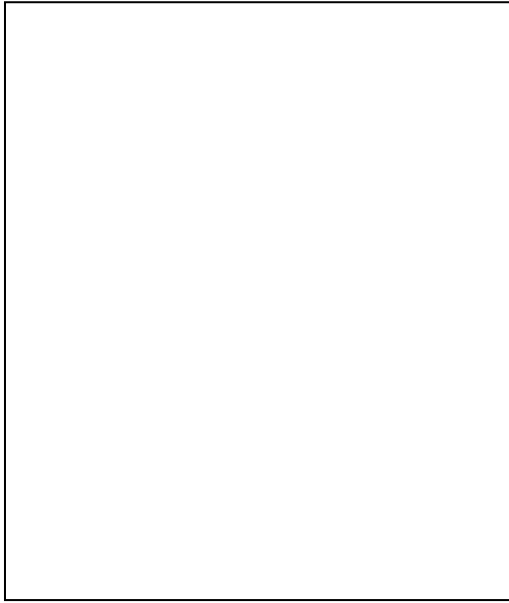
3.1. Приготувати препарат клітин листка елодеї. Для цього взяти гілочку з листками елодеї. Бажано, щоб температури води у склянці в якій була гілочка становила $+37-40^{\circ}\text{C}$. Відокремте листок від стебла, покладіть його в краплю води на предметне скло і накрійте покривним склом. Розгляньте препарат під мікроскопом. Знайдіть у клітинах оболонку, цитоплазму, ядро, пластиди. Зверніть особливу увагу на рух пластид. Змалювати схему будови клітини листка елодеї позначити частини клітини і напрямок руху цитоплазми.



3.2. Приготувати препарат шкірочки цибулі (бажано червоної), розглянути під мікроскопом і замалювати ділянку з 4-5 клітин.



3.3. Вивчити явище плазмолізу в клітинах шкірочки синьої цибулі:



Зрізи зі шкірочки цибулі помістіть у скляні бюкси з 1М розчином калій нітрату, закрийте кришкою і залиште на 30-60 хв.

Приготуйте препарати у цьому самому розчині і розгляньте їх під мікроскопом, використовуючи розчин калій роданіду, зрізи вивчайте відразу. У полі зору в багатьох клітинах буде добре видно опуклий ковпачковий плазмоліз. На обох кінцях клітини видно набряклу цитоплазму, що має вигляд ковпачків. Утворення ковпачків є результатом набрякання колоїдів цитоплазми, зумовленого проникненням іонів K^+ і NO_3^- крізь плазмалему в мезоплазму.

Якщо таку саму спробу провести з кальцій нітратом, ковпачковий плазмоліз не відбудеться тому, що Ca^{2+} виявляють протилежну дію на цитоплазму, порівняно з K^+ . Побачене під мікроскопом замалювати до зошита. Зробити відповідні висновки.

Висновки _____

3.4. Навчитися одержувати спиртові витяжки пігментів із листя рослин:

Наважку листків (1-2г) подрібнити і гомогенізувати (розтираючи біоматеріал з чистим кварцовим піском). До гомогенізату додати трохи крейди (для нейтралізації кислот клітинного соку). Та продовжувати розтирання при додаванні спирту доки вся зелена маса стане напіврідкою. Отриману масу через фільтр перенести в колбу.

Порівняти спиртові витяжки різних рослин, зробити висновки.

Висновки _____

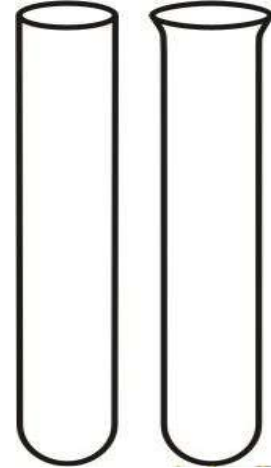
3.5. Здійснити розділення пігментів методом Крауса (розчинність пігментів у спирті та бензині):

У пробірці налити 1 мл. спиртової витяжки та додати 2-2,5 мл. і 2-3 краплі води. Пробірку щільно закрити пробкою, збовтайте 1-2 хвилини та поставте у штатив для спостереження. За 2-3 хвилини рідина в пробірці розділиться на два шари:

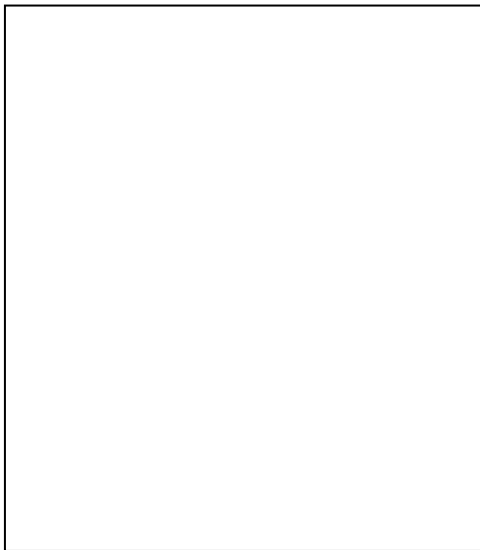
- верхній, бензиновий – зеленого кольору
- нижній, спиртовий – жовтого кольору.

У верхньому зеленому шарі буде хлорофіл і каротин, а в нижньому, жовтому – ксантофіл. Побачені зміни замалуйте до зошита. Зробіть висновки:

Висновки _____



3.6. Навчитися здійснювати розділення пігментів методом адсорбційної хроматографії.



У пробірку налити спиртової витяжки хлорофілу та опустити в неї смужку фільтрувального паперу (завширшки 1 см.) На фільтрувальному папері над поверхнею розчину з'являються зелені смуги хлорофілу, потім жовті каротину і ксантофілу. А над жовтими смугами буде безбарвна смуга від спирту. Фільтрувальний папір є адсорбентом, на якому хлорофіл адсорбує інтенсивніше, ніж інші жовті пігменти та спирт.

На фільтрувальний папір нанести краплю спиртової витяжки суміші пігментів. Внаслідок різної швидкості адсорбції пігментів крапля розпливаючись на папері, дає концентричні кола, всередині зелені, а зовні жовті. Такий розподіл пігментів можна спостерігати на фільтрі, коли фільтрують зелену розтерту масу при добуванні спиртової витяжки хлорофілу. Побачені замалувати до зошита та зробити висновки.

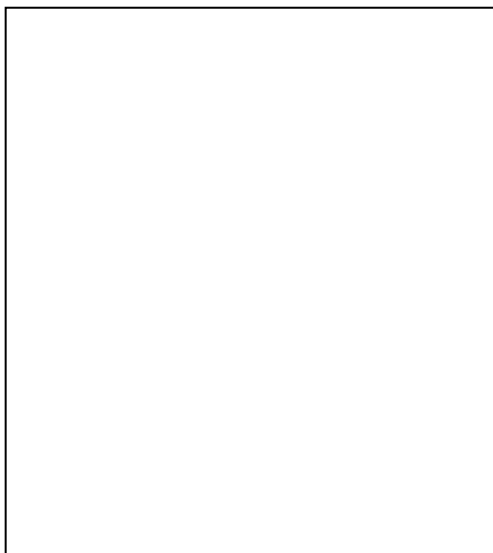
Висновки _____

3.7. Розглянути мікропрепарати клітин кореня ячменю. Знайти клітини у стадії профазі, метафазі, анафазі, телофазі, замалювати їх зошита. Визначити кількість хромосом у каріотипі ячменю.

Висновки: _____

Завдання 4. Познайомитися з методом виготовлення «штучної» клітини Траубе.

4.1. У пробірку налити $3/4$ об'єму $0,5\text{N}$ розчину CuSO_4 і піпеткою, обережно по стінках пробірки, опустити 1-2 краплі 1N розчину $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. На поверхні краплі розчину $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, при додаванні її в розчин CuSO_4 , утворюється напівпроникна плівка купрум гексаціаноферату.



4.2. Утворюється замкнений міхурець, який дістав назву «штучної» клітини. Плівка міхурця проникна для води і непроникна для солей. Оскільки концентрація розчину $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ у цій клітині більша, ніж концентрація розчину CuSO_4 , що оточує її, то вода з розчину надходитиме всередину «штучної» клітини. За цих умов, клітина збільшуватиметься в об'ємі доти, поки концентрація солі всередині і зовні міхурця не вирівняється.

4.3. Якщо розглядати «штучну» клітину на світлі, то можна помітити, що під час її збільшення струминки розчину CuSO_4 опускаються на дно пробірки. Це явище відбувається тому, що під час збільшення об'єму міхурця в результаті надходження води концентрація навколишнього розчину збільшується і важчі його шари опускаються донизу. Якщо розчин $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ взяти меншої концентрації, ніж розчин CuSO_4 , то міхурець, навпаки, буде зменшуватися і струминки підніматимуться вгору, оскільки тут відбуватиметься протилежний процес.

4.4. «Штучну» клітину ще краще виготовляти під мікроскопом. Для цього, на предметне скло покладіть маленький кристалик жовтої кров'яної солі і нанесіть на нього краплину розчину мідного купоросу. Препарат потрібно швидко розглянути під мікроскопом при малому збільшенні. В полі зору добре видно, як навколо кристалика $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ утворюється міхурець рожевого кольору, який весь час збільшується в об'ємі. Ця «штучна» клітина збільшується нерівномірно доти, поки не розчиниться кристалик і не вирівняється концентрація. В процесі «росту» утворюються різноманітні форми так званих «штучних» клітин.

Висновки _____

Завдання 5. Познайомитися з лабораторним обладнанням та посудом (див.мал.7). Занотувати правила роботи в культуральній лабораторії.



Мал.7.:Лабораторний посуд та обладнання:

- 1 - _____
- 2 - _____
- 3 - _____
- 4 - _____
- 5 - _____
- 6 - _____
- 7 - _____
- 8 - _____
- 9 - _____.

Правила роботи в культуральній лабораторії:

Завдання 6. Навчитися отримувати та аналізувати мікропрепарати з різних клітинних ліній людини:

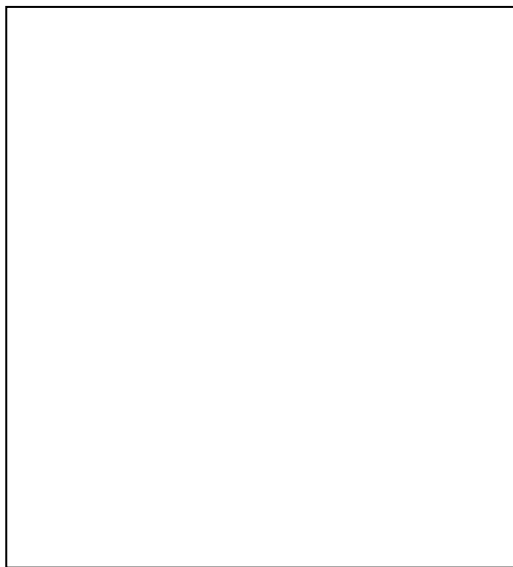
6.1. На дно 6-луночного культурального планшета поміщають стерильне покривне скло, саме до скла, а не до дна планшета повинні прикріпитися клітини під час культивації.

6.2. До лунок планшета вносять по 2 мл. DMEM + 10% FBS, та висівають клітини. Клітини культивують протягом 24 год. у CO₂-інкубаторі із температурою +37°C та 5% CO₂.

6.3. Після інкубації клітини за кімнатних умов 2 рази промивають 1X PBS (PBS попередньо нагрівають до температури +37°C) та протягом 15-20 хв. фіксують клітини _____.

6.4. Клітини 2-3 рази промивають 1X PBS та заключають у середовищі для заключення _____. Також в середовище для заключення можна внести барвник, який допоможе диференціювати будову клітини.

6.5. Аналіз мікропрепаратів під мікроскопом. Замалювати до зошита побачені під мікроскопом клітини, порівняти із будовою прокаріотичних клітин. Пояснити зв'язок між будовою і функціями клітин.



Висновки: _____

Завдання 7. Навчитися аналізувати розміри ДНК фрагментів за допомогою методу агарозного гель-електрофорезу (див. мал.8):

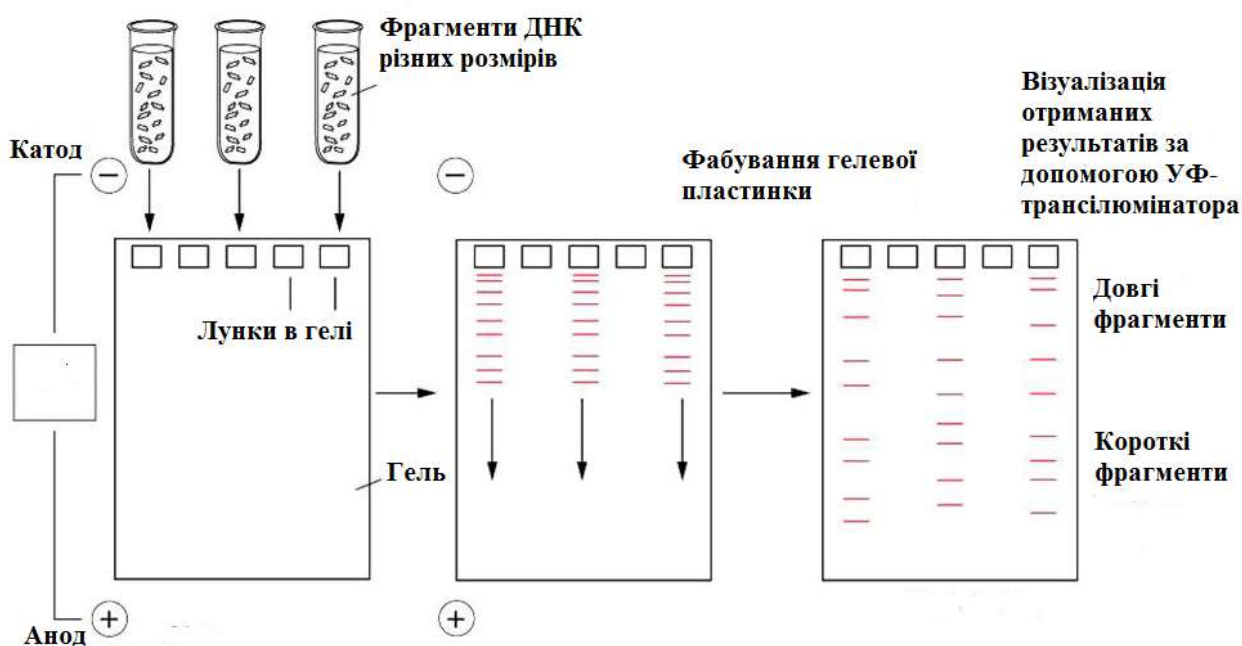
7.1. Зразок дослідної ДНК змішують із _____ фарбою для електрофорезу та вносять у лунки агарозної пластинки.

7.2. Для визначення розміру дослідних фрагментів ДНК поряд вносять маркерну ДНК.

7.3. Підключають електроди горизонтальної камери для електрофорезу до джерела живлення _____ та чекають 40-50хв..

7.4. Після закінчення електрофорезу гелеву пластинку протягом 10-15 хв. фарбують у ___ розчині бромистого етидію.

7.5. Гелеву платинку промивають та аналізують за допомогою УФ-трансліюмінатора. Отримані результати фіксують за допомогою фото системи.



Мал. 8.: Схема проведення агарозного гель-електрофорезу.

Висновки _____

Завдання 8. Познайомитися з методом Western blot аналізу:

8.1. Підготувати зразки _____ для Western blot аналізу: відібрати поживне середовище в якому зростали клітини та промити їх розчином 1X PBS, додати _____ мкл. лізуючого буферу та витримати 15-20 хв. на льодові. Отриманий лізат центрифугувати на max. обертах протягом 15 хв. за температури +4°C. Надосад відбираємо у нову пробірку для подальшого дослідження, осад викидаємо.

!! Всі операції проводити на льодові, для уникнення руйнування білків.

8.2. До отриманого лізату клітин додати _____ мкл. _____ буферу (буферу для нанесення), вортексувати та витримати 5 хв. на водяній бані за температури +100°C.

8.3. Зібрати камеру для вертикального електрофорезу у поліакриламідному гелі.

8.4. Внести по 25 мкл. зразку лізату _____ клітин у лунку акриламідного гелю. Підключають електроди форезної камери до джерела живлення.

8.5. По закінченню електрофорезу здійснити перенесення білків на мембрану: _____



Мал.9: Камера для вертикального електрофорезу білків у поліакриламідному гелі.

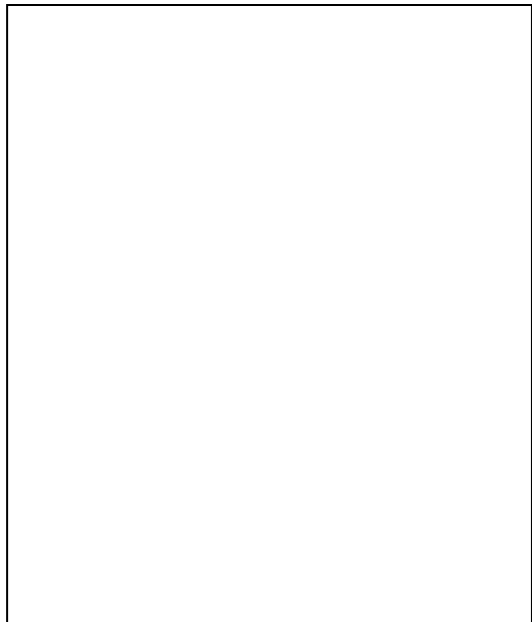
8.6. Інкубувати мембрану у ____ розчині BSA протягом 1 год.

8.7. Промити мембрану 1X розчином TBST – 3 рази по 5 хв.

8.8. Інкубувати мембрану у розчині первинних _____ антититіл протягом 1-2год., після помити мембрану 1X розчином TBST – 3 рази по 5хв.

8.9. Інкубувати мембрану у розчині вторинних _____ антититіл протягом 1-2год., після помити мембрану 1X розчином TBST – 3 рази по 5хв.

8.10. Здійснити візуалізацію отриманих результатів, та замалювати їх до зошита _____



Візуалізація отриманих результатів:

Висновки _____

Завдання 9. Вивчити життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту

9.1. Розсіяти клітини _____ до стерильного 96-лункового планшету та інкубуватив у термостаті з CO₂ за температури +37°C протягом 24 год. з досліджуваними речовинами _____

9.2. За допомогою дозатора відібрати поживне середовище із планшету та промивають клітини 1X розчином PBS.

9.3. У кожен лунку додати по 300 мкл. розчину ММТ (концентрація 0,25 мг/мл в PBS).

9.4. Інкубувати клітини в термостаті з CO₂ за температури +37°C протягом 30-120 хв.

9.5. Видалити середовище з МТТ і додати по 200 мкл. DMSO чи ізопропанол-2 у кожен лунку та інкубувати клітини на +37°C протягом 10-30хв.

9.6. Аналіз отриманих результатів за допомогою спектрофотометра (550-620 нм. довжини хвиль).



Схема дослідження:

Висновки: _____

ЛІТЕРАТУРА

1. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Перевод с англ. под ред. академика И.Б.Збарського. – М., 2004.
2. Пішак В.П., Бажора Ю.І., Брагін Ш.Б, Медична біологія. — Вінниця, 2004.
3. Жегунов Г.Ф., Жегунова Г.П. Цитологические основы жизни. — Х., 2004. 3. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. — М., 2004.
4. Борисов Л.Б., Фрейдлин И.С. Краткий справочник микробиологической терминологии. — М., 1985.
5. Анатомия бактерий / Пер. с англ.; Под ред. Г.П. Калини. — М., 1960.
6. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов. — М., 1963.
7. Климнюк С., Ситник І., Творко М., Ширококов В. Практична мікробіологія. Тернопіль, 2004.
8. Радченко О., Степура Л., Домборовська Д., Фуртат І., Л. Михальський Практикум із загальної мікробіології: Навч. посібник. – Київ, 2011.
10. Медицинская микробиология. / Под ред. В.И. Покровского.– М., 2001.
9. Векірчик В. М. Практикум з мікробіології: Навч. посібник. – К.: Либідь, 2001.
10. Камышева К С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований. – Ростов-на-Дону, 2010.
11. Голуб С. М. Голуб В. О., Мельничук Ю. В. Мыкробіологія. Методичні вказівки до лабораторних робіт. – Луцьк, 2012.
12. Віннікова О. І., Моргуль І. М. Практикум з мікробіології: методичні рекомендації / – 2-ге вид., доповнене. – Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2009.
13. Шуст І., Грубінко В., Страшнюк Н. Цитология. Навчальний посібник. Тернопіль, - 2009.
14. Сидорович М.М. Таємничий мікросвіт: спецкурс з біології. К.: Фітосоціоцентр, - 1999.
15. Загальна біологія. Лабораторні та практичні роботи. Тематичне оцінювання. Х.: - 2003.
16. Стогодюк О.В. Робочий зошит з фізіології рослин. Навчально методичний посібник. 1 частина. Черкаси, - 2013.
17. Гродзинський М.Д. Енциклопедія сучасної України http://esu.com.ua/search_articles.php?id=8509.

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ ПОДАТОК

ДЛЯ ПОДАТОК

