

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
(НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

НР
НАУКА В РЕГИОНЫ

Биохимия клетки



Иннопрактика

МФТИ

2021

Авторы и составители:

Чернов Тимур Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических и нейробиологических проблем и биоскрининга МФТИ, ассистент департамента молекулярной и биологической физики МФТИ, заведующий кафедрой биологии 57 школы г. Москвы.

Содержание

| | |
|--|-----------|
| Гистохимические реакции на углеводы | 7 |
| Реакция Громмера с медным купоросом и едким натрием . . . | 7 |
| Йодная реакция на крахмал | 8 |
| Реакция осаждения инулина спиртом | 9 |
| Реакция с хлор-цинк-йодом на клетчатку | 10 |
| Реакция с йодидом и серной кислотой | 10 |
| Реакции на одревесневевшую клетчатку | 11 |
| Реакция с флорогюцином и соляной кислотой | 11 |
| Реакция с пермарганатом калия | 12 |
| Гистохимические реакции на жиры | 13 |
| Реакция омыления | 13 |
| Гистохимические реакции на белки и отдельные аминокислоты | 14 |
| Биуретовая реакция | 15 |
| Реакция с образованием берлинской лазури | 17 |
| Ксантопротеиновая реакция | 18 |
| Нитропруссидная реакция | 20 |
| Выявление фиксированных –SH групп | 22 |
| Реакции с ДНК | 22 |
| Окраска буккального эпителия метиленовой синью | 22 |
| Выделение дезоксиноклеопротеида | 23 |
| Выделение дезоксиноклеопротеида из дрожжей | 23 |

| | |
|--|-----------|
| Выделение дезоксиинуклеопротеида из тканей печени | 24 |
| Проба на пуриновые основания | 25 |
| Реакция на углеводы (рибозу и дезоксирибозу) | 26 |
| Молибденовая проба на фосфорную кислоту | 27 |
| Каталитическая активность ферментов | 28 |
| Ферментативный гидролиз крахмала | 28 |
| Специфичность действия ферментов | 29 |
| Зависимость активности ферментов от рН среды | 31 |
| Определение наличия каталазы в живых тканях и зависимости уровня активности от температуры | 32 |
| Реакция на дегидрогеназную активность | 33 |
| Обнаружение дегидрогеназной активности в срезе растительной ткани | 34 |
| Дегидрогеназная активность молочнокислых бактерий | 35 |
| Определение витаминов | 35 |
| Витамин С | 35 |
| Реакция аскорбиновой кислоты с метиленовым синим | 36 |
| Реакция аскорбиновой кислоты с красной кровяной солью и FeCl_3 | 37 |
| Йодная проба на аскорбиновую кислоту | 38 |
| Витамин А | 39 |
| Реакция Друммонда | 39 |
| Реакция с железным купоросом | 40 |
| Витамин В1 | 41 |
| Реакция окисления тиамин в тиохром | 41 |

| | |
|--|-----------|
| Витамин В2 | 42 |
| Реакция восстановления рибофлавина | 43 |
| Витамин В5 | 44 |
| Качественная реакция с ярь-медянкой (ацетат меди II) | 44 |
| Витамин В6 | 45 |
| Феррихлоридная проба на пиридоксин | 45 |
| Витамин Р | 45 |
| Реакция с хлоридом железа (III). | 46 |
| Особенности строения клетки и биохимии прокариот | 46 |
| Жидкостное культивирование бактерий | 46 |
| Посев бактериальной культуры | 49 |
| Окраска по Граму | 50 |
| Модифицированный вариант окраски по Граму | 51 |
| Выделение клостридий с картофельной кожуры | 52 |
| Получение маслянокислого железа | 53 |
| Окраска спор по Пешкову | 54 |

Предисловие

Данное пособие предназначено для педагогов, преподающих в классах химико-биологической направленности. Пособие является сборником практических задач, демонстрирующих свойства основных классов органических соединений живых организмов, места их локализации в клетке.

При выборе задач, вносимых в текст данного пособия, автор ориентировался на спектр реактивов и оборудования, которым располагает среднестатистическая российская школа. В ситуации необходимости применения труднодоступных реактивов приводятся методы их приготовления, либо содержащие их аптечные препараты. В случае некоторых широко известных и часто встречающихся в практических турах олимпиад экспериментов приводится стандартная методика, а также ее доступный для постановки аналог.

Практические работы имеют неопределимое значение в процессе освоения дисциплин естественно-научного цикла. Биологический практикум служит не только наглядной демонстрацией к изучаемым процессам и явлениям, но также способствует формированию представлений об организации живых систем, знакомит с основными методиками и принципами лабораторных исследований.

Сборник лабораторных работ может выступать как методическое пособие для отдельного курса по биохимии и функционированию живой клетки, так и служить справочником для проведения отдельных практических работ в рамках имеющихся курсов ботаники, цитологии, гистологии и общей биологии.

Автор надеется, что изложенные в пособии методики станут существенным подспорьем для педагогов при планировании и организации проектно-исследовательских работ школьников.

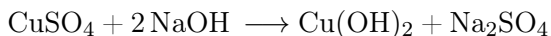
Гистохимические реакции на углеводы

Чернов Т. А. Научный сотрудник и ассистент МФТИ. Зав.каф. биологии 57 школы г. Москвы.

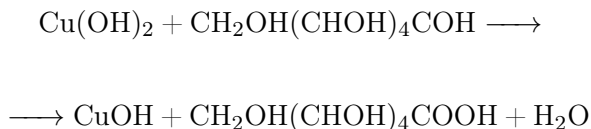
Реакция Троммера с медным купоросом и едким натрием

Данная реакция основана на восстанавливающих свойствах свободных карбонильных групп сахаров. Такие группы присутствуют у большинства моносахаридов, целого ряда дисахаридов (мальтоза, лактоза, целлобиоза и т.д.) и трисахаридов. Такие дисахариды, как сахароза, в которых обе карбонильные группы связаны, а также полисахариды такой реакции не дают.

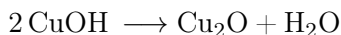
При реакции Троммера происходит восстановление в щелочной среде окиси меди в закись. Для проведения этой реакции используется медный купорос и гидроксид натрия, которые при взаимодействии образуют гидроксид меди, используемый для реакции с сахарами:



При нагревании гидрат окиси меди восстанавливается сахарами в гидрат закиси меди и цвет раствора изменяется с голубого на желтый:



При дальнейшем нагревании гидрат закиси меди теряет воду и выпадает в виде красных кристаллов:



Реакция Троммера имеет некоторую особенность — при недостатке сахара для восстановления всего гидрата окиси меди, то его избыток разлагает на окись меди и воду. Выпадающие черные кристаллы окиси меди маскируют основную реакцию.

Реактивы

- 1) 7%-й раствор медного купороса.
- 2) 50%-й раствор гидроксида натрия.
- 3) Вода (из-под крана).

Проведение реакции

- 1) Поместить срез в 7%-й раствор медного купороса на 1–5 минут. Удобнее всего данную манипуляцию проводить в часовом стекле.
- 2) Ополоснуть срез водой.
- 3) Перенести срез в кипящую каплю 50%-ного раствора гидроксида натрия и накрыть покровным стеклом.
- 4) Наблюдать появление коричнево-красных кристаллов закиси меди.

Йодная реакция на крахмал

Для проведения этой реакции могут использоваться как водные, так и спиртовые растворы йода, либо растворы в любой другой прозрачной жидкости. При применении любого из растворов смоченный крахмал окрашивается в синий, сине-фиолетовый или практически черный цвет. Оттенок зависит от параметров крахмального зерна.

В случае протекания гидролиза крахмала и возникновения продуктов его распада (декстринов) цвет реакции изменяется в следующей последовательности: сине-фиолетовый, темно-бурый, красный. При дальнейшем снижении молекулярного веса продуктов гидролиза реакция передает давать окрашивание.

Крахмальные зерна прорастающих семян дают красное или красно-фиолетовое окрашивание за счет присутствия в них декстринов.

Йодная окраска держится очень недолго, по этой причине окрашенный препарат необходимо изучать непосредственно после приготовления.

Реактивы

- 1) Раствор Люголя (йод — 3,3 г/л, калий йодистый — 6,7 г/л; либо аптечный препарат).

Проведение реакции

- 1) Приготовить срезы жилки листа капусты, зерновки кукурузы.
- 2) Поместить срез в каплю реактива на предметном стекле и накрыть покровным стеклом.
- 3) Наблюдать появление окраски. В случае обнаружения очень обильного окрашивания, вызванного избытком крахмала в препарате, следует разбавить реактив и повторить процедуру.

Реакция осаждения инулина спиртом

Инулин под действием спирта выпадает в виде сферических кристаллов. Кристаллы инулина легко растворяются в горячей воде.

Реактивы

- 1) 96%-й спирт

Проведение реакции

- 1) Поместить срез клубня георгина или топинамбура в 96%-й спирт.
- 2) Наблюдать под микроскопом выпадение осадка.
- 3) Перенести срез в воду и подогреть.
- 4) Наблюдать растворение осадка.

Реакция с хлор-цинк-йодом на клетчатку

При реакции оболочек клеток, содержащих клетчатку, с хлор-цинк-йодом наблюдается лиловое окрашивание.

Реактивы

- 1) Раствор хлор-цинк-йода.

Приготовление раствора хлор-цинк-йода по Новопокровскому.

20 г хлористого цинка растворяют в 8,5 мл воды при нагревании. 1,5 г кристаллического йода и 3 г йодида калия растворяют в 60 мл воды. Второй раствор по каплям добавляют в первый при постоянном перемешивании. Добавление прекращают при появлении исчезающего осадка. В среднем для этого достаточно 1,5 мл раствора. Полученный раствор хранят в защищенном от света месте.

Проведение реакции

- 1) Поместить срез в каплю воды
- 2) Отобрать воду фильтровальной бумагой.
- 3) Нанести на срез каплю раствора хлор-цинк-йода и накрыть покровным стеклом.
- 4) Наблюдать появление окраски.

Реакция с йодидом и серной кислотой

Серная кислота переводит клетчатку в амилоид, схожий по своим свойствам с крахмалом. В результате реакции оболочки, содержащие клетчатку, окрашиваются в синий цвет.

Реактивы

- 1) Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л; либо аптечный препарат).

- 2) 33%-ная серная кислота.

Проведение реакции

- 1) Поместить срез в каплю раствора Люголя.
- 2) Перенести срез в каплю серной кислоты и накрыть покровным стеклом.
- 3) Наблюдать появление окраски.

Реакции на одревесневевшую клетчатку

Одревесневевшая (пропитанная лигнином) клетчатка хорошо окрашивается специальными красителями. К стандартной реакции, используемой в данном случае, можно отнести реакцию с флороглюцином и соляной кислотой. Данное окрашивание очень часто встречается в заданиях практического тура биологических олимпиад различных уровней. Однако в большинстве случаев школы оказываются не укомплектованы необходимым реактивом. В данном разделе мы приведем как стандартную методику, так и более доступную реакцию, позволяющую визуализировать лигнизированные клеточные стенки.

Реакция с флороглюцином и соляной кислотой

Реактивы

- 1) 0,5-1%-ный раствор флороглюцина в 50%-ном спирте
- 2) Дымящая соляная кислота.

Проведение реакции

- 1) Поместить срез в каплю флороглюцина
- 2) Отобрать фильтровальной бумагой излишки реактива

- 3) Добавить 1-2 капли соляной кислоты и накрыть покровным стеклом.
- 4) Наблюдать появление окраски.
- 5) При необходимости более длительного хранения препарата (для воспрепятствования разрушения структур соляной кислотой) поместить срез в глицерин.

Реакция с пермарганатом калия

Все приведенные манипуляции данной реакции удобно проводить в часовом стекле. Смена растворов производится с помощью отбора предыдущего раствора фильтровальной бумаги и прикапыванием нового.

Реактивы

- 1) 1%-ный раствор пермарганата калия.
- 2) 10%-ная соляная кислота.
- 3) Насыщенный раствор аммиака.

Проведение реакции

- 1) Поместить срезы в раствор пермарганата калия на 5 минут.
- 2) Промыть срезы в воде.
- 3) Промыть срезы в 10%-ной соляной кислоте в течение 1-2 минут.
- 4) Перенести срезы на предметное стекло в каплю раствора аммиака и накрыть покровным стеклом.
- 5) Наблюдать появление окраски.

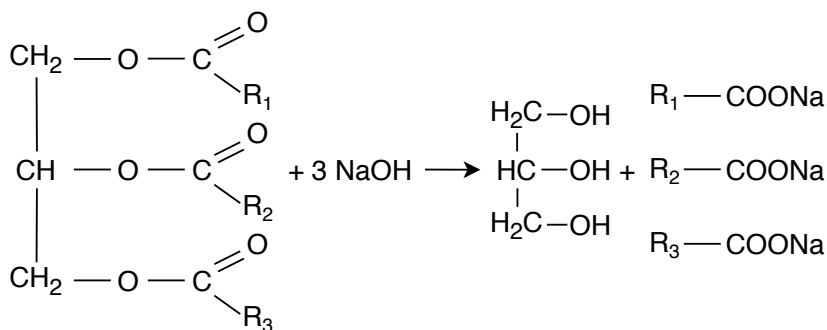
Гистохимические реакции на жиры

При работе с жирами можно использовать как срезы биологических объектов, так и выделенные и очищенные фракции. В клетках живых организмов жиры присутствуют в виде капель разного размера. Так же не стоит забывать про мембраны, состоящие из фосфолипидов. Жиры могут быть визуализированы с помощью специализированных красителей. Из красителей чаще всего используют судан III, шарлаховый красный, масляный желтый, альканин, осмиевую кислоту. . . Однако данные красители труднодоступны и кроме жиров окрашивают подобным образом еще и смолы, эфирные масла, опробковевшие и кутицизированные оболочки.

Более специфичной для жиров является реакция омыления жиров. Проведение данной реакции более доступно, однако она не так наглядна, как реакция окрашивания.

Реакция омыления

Реакция базируется на способности жиров под влиянием щелочей гидролизаться с образованием солей жирных кислот (мыла) и глицерина:



Реактивы

- 1) Концентрированный раствор гидроокиси калия (или натрия).

- 2) 20%-й раствор аммиака.

Проведение реакции

- 1) Нанести на предметное стекло каплю щелочи и добавить к ней каплю раствора аммиака.
- 2) Поместить срез объекта в реактив и накрыть покровным стеклом.
- 3) Для предотвращения высыхания препарата края покровного стекла залить парафином, обработать лаком для ногтей, либо поместить препарат во влажную камеру.
- 4) Выдержать приготовленный препарат 1-5 дней.
- 5) Наблюдать вокруг капель масла игольчатые кристаллы, являющиеся солями жирных кислот.

Гистохимические реакции на белки и отдельные аминокислоты

Спектр подобных реакций направлен либо на особенности химического строения, характерного для радикалов тех или иных аминокислот, либо на наличие непосредственно пептидной связи. Самой широко известной «белковой» реакцией является биуретовая реакция. Для протекания биуретовой реакции необходимо как минимум две пептидные связи на молекулу. Дипептиды окрашивания не дают. Олигопептиды и низкомолекулярные белки дают розовую и красную окраску, остальные белки – фиолетовую. Большинство отдельных аминокислот не дают окраску при этой реакции. Исключение составляют аспарагин и гистидин.

Своим названием биуретовая реакция обязана низкомолекулярному веществу – биурету.

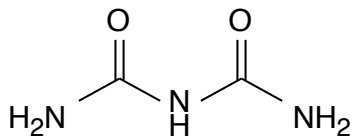


Рис. 1: Биурет

Биуретовая реакция очень проста в постановке и не требует сложных манипуляций и дорогостоящих реактивов. Однако, ее недостатком является достаточно низкая чувствительность. В случае работы с белковыми изолятами эта особенность не важна, однако в случае гистохимической окраски тканей – изменение цвета можно не заметить по причине его низкой интенсивности. Дополнительно может ослабить окраску работа на свежем материале по причине слабой проникаемости реактивов в ткани. Значительно лучших результатов можно добиться на фиксированном материале (кроме спиртовой фиксации, при которой из тканей вымываются спирторастворимые белки).

В щелочной среде атомы азота, входящие в состав пептидной связи, образуют ярко окрашенное комплексное соединение. Аналогичным образом ведут себя атомы азоты, входящие в состав биурета.

Биуретовая реакция

Реактивы

- 1) 7%-ный раствор медного купороса.
- 2) 30-50%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).

Проведение реакции

- 1) Разместить срез в часовом стекле и прилить раствор сульфата меди(II).
- 2) Инкубировать 5-30 минут в зависимости от толщины и других особенностей среза.

- 3) Отобрать раствор медного купороса фильтровальной бумагой и промыть водой до прекращения окрашивания воды в голубой цвет.
- 4) Перенести срез на предметное стекло и нанести сверху несколько капель щелочи.
- 5) Инкубировать от 10 минут до часа (до появления окрашивания).

Как можно заметить из приведенной методики применение биуретовой реакции на срезах может потребовать достаточно большого количества времени. И даже в случае верного выполнения всех шагов не привести к желаемому эффекту из-за низкой ее чувствительности. Значительно более удобным в постановке является эксперимент с биуретовой реакцией, проводимый на белковых растворах.

Реактивы

- 1) 10%-ный раствор яичного белка.
- 2) 1%-ный раствор желатина (навеска желатина добавляется в соответствующее количество воды. Смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатина. Для экономии времени значительно быстрее растворение можно произвести в микроволновой печи).
- 3) 10%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).
- 4) 1%-ный раствор сульфата меди(II).

Проведение реакции

- 1) В пробирку №1 внести 5 капель раствора яичного белка.
- 2) В пробирку №2 внести 5 капель раствора желатина.
- 3) В каждую из пробирок добавить 3 капли раствора гидроксида натрия (калия) и 1 каплю сульфата меди(II).
- 4) Перемешать встряхиванием.
- 5) Наблюдать сине-фиолетовую окраску раствора.

Реакция с образованием берлинской лазури

Данная реакция основана на осаждение белков с помощью желтой кровяной соли, с последующим взаимодействием образовавшегося осадка с трехвалентными ионами железа. Реакция проводится в кислой среде, что помогает протонировать все способные к этому процессу функциональные группы и перевести соединения в состояние катионов.

Желтая кровяная соль, выступающая в роли осадителя, диссоциирует в растворе с образованием устойчивого аниона $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Белок, переведенный в катионную форму, взаимодействуя с анионом, образует нерастворимое соединение, выпадающее в осадок.

Полученный осадок или срез тщательно промывается для удаления остатков непрореагировавшей желтой кровяной соли, так как последующая реакция направлена именно на ее обнаружение. При обработке осадка соединениями трехвалентного железа образуется ярко-голубое соединение «Берлинская лазурь» с формулой $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

По причине того, что ион $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ образовал с белком нерастворимое соединение, а все свободные ионы были удалены промывкой, то качественное обнаружение этого иона в препарате означает присутствие белка.

Реакция на присутствие белка с образованием берлинской лазури может проводиться как на свежем, так и на фиксированном материале. В отличие от биуретовой реакции она является значительно более чувствительной, по этой причине обычно рекомендуется для обнаружения малых количеств белка.

Обычно хорошо окрашивается содержимое всех клеток капустного листа. Особенно яркую окраску можно наблюдать в живых элементах проводящего пучка: флоэме, камбии, ксилемной паренхиме.

Зародыши семян кукурузы окрашиваются в ярко-синий цвет, особенно интенсивный в зоне корешка и почечки.

Реактивы

- 1) 10%-ный раствор желтой кровяной соли.

- 2) 50%-ный раствор уксусной кислоты.
- 3) 10%-ный раствор хлорида железа (III).
- 4) 60%-ный спирт.

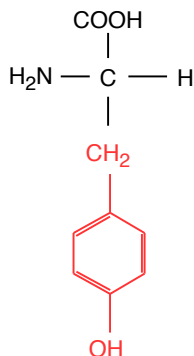
Проведение реакции

- 1) Нанести на предметное стекло каплю свежеприготовленной желтой кровяной соли.
- 2) Добавить к ней каплю воды и каплю уксусной кислоты.
- 3) Поместить срезы в полученный реактив на 1-7 часов (допускается перенести препараты во влажную камеру и продолжить следующие шаги на следующий день).
- 4) Промыть срезы 60%-ным спиртом, до тех пор, пока промывочная жидкость не перестанет давать голубое окрашивание при добавлении в нее раствора хлорида железа.
- 5) Поместить срезы на предметное стекло и нанести несколько капель раствора хлорида железа (III). Накрыть покровным стеклом.
- 6) Наблюдать появление синего окрашивания.

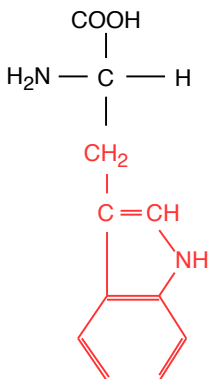
Ксантопротеиновая реакция

С помощью данной реакции обнаруживаются ароматические аминокислоты, либо содержащие их белки. Напомним, что к таким аминокислотам относят тирозин, фенилаланин и триптофан.

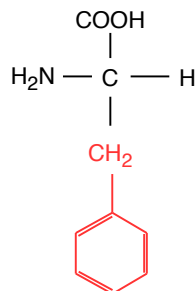
В процессе проведения реакции происходит нитрирование бензольных колец. Результат реакции дает осадок с желтой окраской. В щелочной среде нитропроизводные образуют соли, окрашенные в оранжевый цвет. Комбинация данной реакции с общими белковыми реакциями может продемонстрировать наличие (или отсутствие) ароматических аминокислот.



Тирозин



Триптофан



Фенилаланин

Реактивы

- 1) 10%-ный раствор яичного белка.
- 2) 1%-ный раствор желатина (навеска желатина добавляется в соответствующее количество воды. Смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатина. Для экономии времени значительно быстрее растворение можно произвести в микроволновой печи).
- 3) Концентрированная азотная кислота.
- 4) 10%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).

Проведение реакции

- 1) В пробирку №1 и пробирку №2 внесите по 5 капель раствора яичного белка и раствора желатина соответственно.
- 2) В каждую пробирку внесите по 3 капли концентрированной азотной кислоты.
- 3) В случае выпадения осадка пробирку нагреть на спиртовой горелке.

- 4) Добавить в каждую пробирку по 5-10 капель раствора щелочи.
- 5) Проанализировать полученные результаты.

*Желатин не имеет в своем составе ароматических аминокислот, однако, присутствующий в продаже белок может быть не до конца очищен и в некоторых случаях проявлять слабо желтую окраску. Рекомендуем использовать в опыте желатин разных производителей.

Данную реакцию можно провести и на временном препарате. Наиболее хорошую окраску дают препараты камбия и флоэмы, а также зародыша семени.

Реактивы

- 1) Концентрированная азотная кислота.
- 2) 10%-ный раствор аммиака.

Проведение реакции

- 1) Поместить срез на предметное стекло, нанести сверху несколько капель концентрированной азотной кислоты и накрыть сверху покровным стеклом.
- 2) Наблюдать появление ярко-желтой окраски в местах наибольшей концентрации ароматических аминокислот.
- 3) С помощью фильтровальной бумаги отобрать из-под покровного стекла азотную кислоту.
- 4) Ввести под стекло раствор аммиака.
- 5) Наблюдать переход желтой окраски в оранжевую.

Нитропруссидная реакция

Данная реакция служит для обнаружения соединений, содержащих $-SH$ группы. В рамках работы с белками может быть использована

для обнаружения цистеина. Нитропруссидная реакция способна выявить исключительно свободные $-SH$ группы. Для выявления связанных групп необходима предварительная денатурация белка с помощью кипячения или обработкой кислотами.

В качестве объектов рекомендуется использовать различные белковые растворы, срезы зародышей злаковых растений.

В большинстве случаев стандартная комплектация химических реактивов школы не подразумевает наличия нитропрусида. Данный реагент можно приобрести в аптеке под названием «Нанипрус» в форме порошка, запаянного в ампулы. Одна ампула содержит 30 мг препарата, чего вполне достаточно для проведения одного занятия.

По причине высокой реакционной способности вещества допускается применение исключительно свежеприготовленного раствора. Сразу же после приготовления раствора сосуд необходимо обернуть непрозрачной черной бумагой или фольгой, так как нитропруссид разлагается под действием света.

Реактивы

- 1) Свежеприготовленный 5%-ный раствор нитропрусида натрия (или калия) в темной посуде.
- 2) Насыщенный спиртовой раствор ацетата цинка.

Проведение реакции

- 1) Поместить срез в часовое стекло, нанести несколько капель раствора уксуснокислого цинка.
- 2) Инкубировать 5-7 минут.
- 3) Отобратить с помощью фильтровальной бумаги жидкость и нанести 5%-ный раствор нитропрусида.
- 4) Наблюдать появление розовой окраски.

Выявление фиксированных –SH групп

Для выявления фиксированных групп необходимо предварительно разрушить связи и провести нитропруссидную реакцию повторно.

Реактивы

- 1) Свежеприготовленный 5%-ный раствор нитропрусида натрия (или калия) в темной посуде.
- 2) Насыщенный спиртовой раствор ацетата цинка.
- 3) 15%-ный трихлоруксусная кислота.

Проведение реакции

- 1) Три раза (по 5 минут) обработать срезы раствором трехуксусной кислоты в часовом стекле.
- 2) Фильтровальной бумагой отобрать расвор кислоты и провести нитропруссидную реакцию по предыдущему протоколу.

Наличие более интенсивной розовой окраски по сравнению с результатами предыдущего опыта свидетельствует о наличии фиксированных –SH групп в белках.

Реакции с ДНК

Окраска буккального эпителия метиленовой синью

Метиленовый синий является достаточно распространенным основным красителем, вследствие чего широко применяется для окраски содержимого ядра. В работе можно использовать самостоятельно приготовленный 0,5%-ный раствор, либо в два раза развести 1%-ный аптечный водный раствор метиленового синего.

Реактивы

- 1) 0,5%-ный водный раствор метиленового синего.

Проведение реакции

- 1) Ватной палочкой несколько раз провести по внутренней поверхности щеки.
- 2) Нанесите собранный биоматериал на чистое обезжиренное предметное стекло.
- 3) Поверх мазка нанесите 1-2 капли раствора метиленового синего и накройте покровным стеклом.
- 4) Микроскопируйте препарат.

На окрашенном препарате отчетливо видны ядра буккального эпителия. Так же хорошо прокрашиваются бактерии ротовой полости. Обратите внимание учеников на соотношение размеров прокариотических и эукариотических клеток.

Выделение дезоксиноклеопротеида

Методики выделения основаны на способности дезоксиноклеопротеида растворяться в солевых растворах большой ионной силы, либо в растворах с низкими или высокими значениями pH. При снижении ионной силы раствора, либо возврату к средним значениям pH дезоксиноклеопротеид выпадает в осадок.

Выделение дезоксиноклеопротеида из дрожжей

Для минимизации разрушающего воздействия на ДНК в данной задаче используются охлажденные материалы и реактивы. Ступка с пестиком предварительно охлаждаются в морозилке, а растворы в холодильнике.

Реактивы и материалы

- 1) Сухие пекарские дрожжи.
- 2) Промытый и прокаленный речной песок.
- 3) 0,4%-ный раствор NaOH.
- 4) 5%-ный раствор уксусной кислоты.

Проведение реакции

- 1) 5 г дрожжей высыпают в предварительно охлажденную в морозилке ступку.
- 2) К дрожжам добавляют немного песка и, доливая небольшими порциями охлажденный раствор щелочи (по 5-10 мл), растирают пестиком до гомогенного состояния. Всего расходуется около 50 мл раствора щелочи
- 3) Гомогенат фильтруют через несколько слоев марли. Для ускорения процесса можно использовать водоструйный насос.
- 4) К фильтрату по каплям добавляют раствор уксусной кислоты до полного прекращения осаждения нуклеопротеида (обычно расходуется 10-15 мл раствора).
- 5) Осадок отделяется фильтрованием, высушивается или замораживается для использования в дальнейших опытах.

Выделение дезокси-нуклеопротеида из тканей печени

Реактивы и материалы.

- 1) 2-3 г печени (животного или птицы).
- 2) Буферный раствор (5%-ный раствор хлорида натрия, содержащий 0,04%-ный нитрат натрия).

- 3) 0,4%-ный раствор гидроксида натрия.

Проведение реакции

- 1) 2-3 г печени кладут в предварительно охлажденную в морозилке ступку.
- 2) Добавляют немного песка и, доливая небольшими порциями охлажденный раствор щелочи (по 5-10 мл), растирают пестиком до гомогенного состояния. Всего расходуется около 35-40 мл раствора щелочи
- 3) Гомогенат фильтруют через несколько слоев марли. Для ускорения процесса можно использовать водоструйный насос.
- 4) Полученный объем фильтрата измеряют и мерным цилиндром отмеряют шестикратный (по отношению к фильтрату) объем дистиллированной воды.
- 5) Медленно приливают дистиллированную воду к фильтрату. Наблюдают выпадение дезоксинуклеопротеида в виде нитей.
- 6) Выпавший дезоксинуклеопротеид отделяют наматыванием на деревянную палочку, высушивают или замораживают для использования в дальнейших опытах.

Проба на пуриновые основания

Метод основан на реакции пуриновых оснований с аммиачным раствором нитрата серебра образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований, окрашенный в светло-коричневый цвет.

Реактивы

- 1) 0,4%-ный раствор гидроксида натрия.
- 2) 1%-ный раствор нитрата серебра.

Проведение реакции

- 1) К выделенному дезоксиноклеопротеиду приливают раствор щелочи до полного растворения.
- 2) В пробирку вносят 1 - 2 мл раствора дезоксиноклеопротеида.
- 3) Приливают 10 капель раствора нитрата серебра.
- 4) Через несколько минут наблюдают выпадение осадка серебряных производных пуриновых оснований.

Реакция на углеводы (рибозу и дезоксирибозу)

Данная реакция основана на способности рибозы и дезоксирибозы восстанавливать ионы металлов (медь, висмут, железо) в щелочной среде и является частичным повторением работ с сахарами.

Реактивы

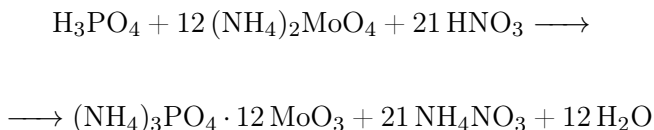
- 1) 7%-ный раствор медного купороса.
- 2) 30-50%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).

Проведение реакции

- 1) К выделенному дезоксиноклеопротеиду приливают раствор щелочи до полного растворения.
- 2) В пробирку вносят 5 капель раствора дезоксиноклеопротеида.
- 3) Добавляют 2-3 капли раствора медного купороса.
- 4) При нагревании до кипения наблюдают выпадение желтого осадка гидрата меди (I) CuOH или красный осадок оксида меди (I) Cu_2O .

Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Фосфорную кислоту обнаруживают по реакции с молибдатом аммония, в результате которой образуется молибдатофосфат аммония:



Для приготовления молибденового реактива 7,5г молибдата аммония $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ растворяют в 100мл 32%-ный раствора азотной кислоты.

Реактивы

- 1) 0,4%-ный раствор гидроксида натрия.
- 2) Молибденовый реактив.

Проведение реакции

- 1) К выделенному дезоксиноклеопротеиду приливают раствор щелочи до полного растворения.
- 2) В пробирку вносят 0,5 мл раствора дезоксиноклеопротеида.
- 3) Добавляют 10 капель молибденового реактива и нагревают до кипения на пламени спиртовки.
- 4) Наблюдают окрашивание жидкости в лимонно-желтый цвет.
- 5) Охлаждают пробирку под струей водопроводной воды и наблюдают выпадение лимонно-жёлтого осадка фосфорно-молибденовокислого аммония.

Каталитическая активность ферментов

В данном разделе подобраны задачи, демонстрирующие каталитическую активность белковых ферментов, показаны примеры их специфичности и зависимость уровня активности от условий среды.

Ферментативный гидролиз крахмала

В качестве ферментативного раствора, гидролизующего крахмал до мономеров, выступает слюна, содержащая амилазу.

Реактивы

- 1) 1%-ный раствор крахмала (клейстер).
- 2) Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л; либо аптечный препарат).
- 3) 7%-ный раствор медного купороса.
- 4) 30-50%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).

Проведение реакции

- 1) Прополощите рот водой, наберите в пробирку 2-4 мл слюны. Доведите объем раствора до 10 мл дистиллированной водой.
- 2) В четыре пронумерованные пробирки внесите по 10 капель раствора крахмала.
- 3) В две пробирки внесите по 4 капли раствора слюны, в другие две по 4 капли дистиллированной воды (контроль).
- 4) Содержимое пробирок перемешайте и поместите на 15 минут в термостат или водяную баню при температуре 37 °С. (В случае отсутствия необходимых приборов реакцию можно термостатировать, плотно зажав пробирки в ладонях. Но в таком случае время инкубирования необходимо увеличить до 20-25 минут).

- 5) В пробирки №1 и №3 внесите по капле раствора Люголя и перемешайте.
- 6) В пробирки №2 и №4 внесите по 2 капли раствора медного купороса и по 5-7 капель щелочи. Осторожно прогрейте пробирки на пламени горелки до кипения.
- 7) Результаты реакций занесите в таблицу и проанализируйте.

| Номер пробирки | Субстрат | Фермент | Йод-крахмальная реакция | Реакция Троммера |
|----------------|----------|----------|-------------------------|------------------|
| №1 | Крахмал | Амилаза | | — |
| №2 | Крахмал | Амилаза | — | |
| №3 | Крахмал | Контроль | | — |
| №4 | Крахмал | Контроль | — | |

Специфичность действия ферментов

В качестве исследуемых субстратов в данной задаче фигурируют крахмал и сахароза. А в качестве ферментов – амилаза слюны и сахараза дрожжевых клеток. И тот и другой субстрат являются углеводами, однако каждый фермент взаимодействует со строго определенным веществом (либо с группой очень схожих веществ), что обеспечивается соответствием пространственных конфигураций субстрата и активного центра фермента.

Реактивы

- 1) Раствор сахаразы. (10г сухих дрожжей растереть в ступке с речным песком и залить 40 мл воды. Оставить на 2 час. Отфильтровать и поставить в холодильник. Рабочий раствор хранить не более суток)
- 2) 1%-ный раствор крахмала (клейстер).
- 3) Раствор Люголя (Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л; либо аптечный препарат).

- 4) 7%-ный раствор медного купороса.
- 5) 30-50%-ный раствор гидроксида натрия (или калия).
- 6) 2%-ный раствор сахарозы (сахара).

Проведение реакции

- 1) Прополощите рот водой, наберите в пробирку 2-4 мл слюны. Доведите объем раствора до 10 мл дистиллированной водой (можно воспользоваться раствором слюны от предыдущей работы, если она проводилась в тот же день).
- 2) В пробирки №1 и №2 внесите по 10 капель раствора крахмала.
- 3) В пробирки №3 и №4 внесите по 10 капель раствора сахарозы.
- 4) В пробирки №1 и №3 добавьте по 4 капли раствора слюны.
- 5) В пробирки №2 и №4 добавьте по 4 капли раствора сахарозы.
- 6) Перемешайте содержимое пробирок и поставьте на 15 минут в термостат или водяную баню при температуре 37 °С (В случае отсутствия необходимых приборов реакцию можно термостатировать, плотно зажав пробирки в ладонях. Но в таком случае время инкубирования необходимо увеличить до 20-25 минут).
- 7) Каждую пробирку разделите на две и проведите йод-крахмальную реакцию и реакцию Троммера аналогично предыдущей задаче.
- 8) Результаты занесите в таблицу, проанализируйте почему в каждом случае был получен тот или иной результат.

| Номер пробирки | Субстрат | Фермент | Йод-крахмальная реакция | Реакция Троммера |
|----------------|----------|----------|-------------------------|------------------|
| №1 | Крахмал | Амилаза | | |
| №2 | Крахмал | Сахараза | | |
| №3 | Сахароза | Амилаза | | |
| №4 | Сахароза | Сахараза | | |

Зависимость активности ферментов от рН среды

Реактивы

- 1) 1%-ный раствор крахмала (клейстер).
- 2) Раствор Люголя (Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л); либо аптечный препарат).
- 3) 0,2%-ная соляная кислота.
- 4) Индикаторные полоски.

Проведение реакции

- 1) Прополощите рот водой, наберите в пробирку 2-4 мл слюны. Доведите объем раствора до 10 мл дистиллированной водой (можно воспользоваться раствором слюны от предыдущей работы, если она проводилась в тот же день).
- 2) Внесите в 8 пробирок по 1 мл дистиллированной воды.
- 3) В пробирку №1 внесите 1 мл соляной кислоты и перемешайте. Отберите из пробирки №1 1 мл смеси и внесите в пробирку №2. Аналогично проведите данную процедуру со всеми пробирками. Из пробирки №8 после перемешивания отберите 1 мл и вылейте.
- 4) В каждую пробирку добавьте по 2 мл крахмального раствора и по 1 мл раствора слюны.
- 5) Содержимое пробирок перемешать и 15 минут термостатировать при 37 °С.
- 6) В каждую пробирку добавьте по 1 мл раствора Люголя и перемешайте.
- 7) Полученные результаты запишите, сделайте выводы о причинах различий в наблюдаемой окраске.
- 8) При наличии индикаторной бумаги определите рН среды в каждой пробирке и сделайте выводы.

Определение наличия каталазы в живых тканях и зависимости уровня активности от температуры

Реактивы

- 1) Лед.
- 2) 3%-ный раствор перекиси водорода.
- 3) Клубни, листья растений или предварительно замоченные семена бобовых растений.

Проведение реакции

- 1) Разотрите в ступке подготовленные для опыта части растений.
- 2) Перенесите в пробирку немного полученной смеси, добавьте каплю перекиси водорода и наблюдайте активное выделение пузырьков воздуха. Результаты наблюдения занесите в таблицу
- 3) Поместите растительный гомогенат в 4 пробирки.
- 4) Подогрейте на водяной бане пробирки до 40°C, 60°C, 80°C и 100°C. При достижении каждого из значений – добавьте в одну пробирку по капле перекиси водорода. Результаты наблюдения занесите в таблицу.
- 5) Поместите растительный гомогенат в две пробирки.
- 6) Используя холодную воду и лед охладите образцы до 10°C и 0°C. При достижении каждого из значений, добавьте в одну пробирку по капле перекиси водорода. Результаты наблюдения занесите в таблицу.
- 7) Проанализируйте и объясните полученные результаты.

| Температура, °С | Активность каталазы (+ или -) |
|-----------------|-------------------------------|
| 0 | |
| 10 | |
| 20 | |
| 40 | |
| 60 | |
| 80 | |
| 100 | |

Реакция на дегидрогеназную активность

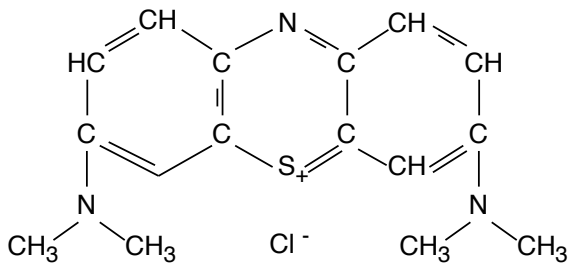


Рис. 2: Метиленовая синь

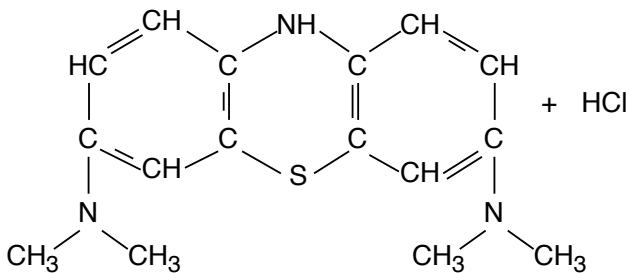


Рис. 3: Лейкоформа метиленовой сини

Наиболее старым и доступным методом определения наличия аэробных дегидрогеназ является метод с обесцвечиванием метиленовой сини. Данный метод является способом определения неспецифических дегидрогеназ и основан на введении в среду слабого раствора метиленовой сини. Химия метода заключается в способности метиленовой

сини выступать в качестве акцептора водорода, перехватывая его у дегидрогеназы. В результате этого процесса окисленная форма метиленовой сини переходит в восстановленную и бесцветную лейкоформу.

Получаемая в реакции окраска не стабильна, так как лейкоформа метиленовой сини легко окисляется кислородом воздуха, что приводит к восстановлению окраски раствора. При проведении реакции это стоит учитывать, ограничивая доступ воздуха к исследуемому препарату.

В реакциях с метиленовой синью обычно не добавляют субстрат дегидрогеназы. В роли субстрата выступают внутренние вещества объекта, у которых в процессе течения естественных биохимических реакций дегидрогеназа отнимает водород, перенося его на метиленовую синь.

Обнаружение дегидрогеназной активности в срезе растительной ткани

Для реакции используются максимально свежие объекты с высокой метаболической активностью. Подойдут прорастающие семена и части молодых побегов.

Реактивы

- 1) 0,05%-ный раствор метиленового синего. Раствор можно приготовить самостоятельно или развести в 20 раз 1%-ный аптечный препарат.

Проведение реакции

- 1) Разместить свежий срез на предметном стекле свежий растительный срез.
- 2) Нанести поверх среза несколько капель раствора метиленового синего и накрыть покровным стеклом.
- 3) Для затруднения доступа воздуха края покровного стекла окантовать парафином или лаком для ногтей.
- 4) Наблюдать обесцвечивание объекта, происходящее с разной интенсивностью в различных его частях.

Дегидрогеназная активность молочнокислых бактерий

У ряда бактерий способность к обесцвечиванию метиленовой сини является диагностическим признаком таксона. К таким организмам относятся и лактобактерии. Для проведения реакции используется свежий домашний йогурт.

Реактивы

- 1) 0,05%-ный раствор метиленового синего. Раствор можно приготовить самостоятельно или развести в 20 раз 1%-ный аптечный препарат.

Проведение реакции

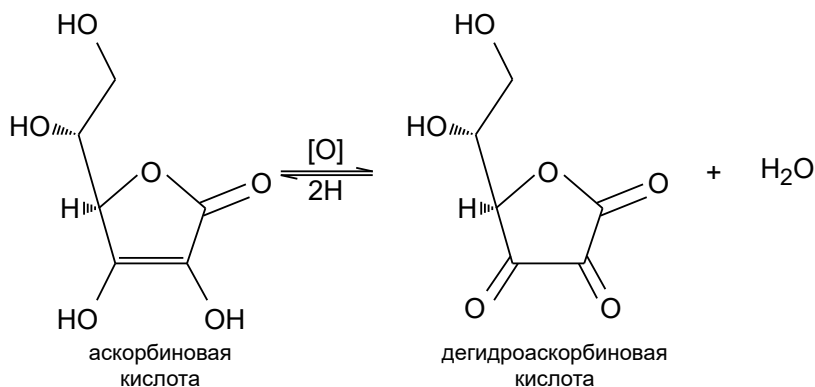
- 1) Внести в пробирку выдержанный до комнатной температуры йогурт до высоты 3–5 см.
- 2) Внести в пробирку 1-2 капли раствора метиленового синего и перемешать стеклянной палочкой. В случае моментального исчезновения окраски, повторить внесение реактива.
- 3) Наблюдать обесцвечивание смеси, происходящее снизу-вверх в пробирке.
- 4) Проанализировать причины.
- 5) По окончании реакции на поверхности йогурта в пробирке остается слой синего цвета, несмотря на то, что вся остальная смесь обесцветилась. Данная ситуация воспроизводится в случае перемешивания смеси. Объясните причины подобного поведения смеси.

Определение витаминов

Витамин С

Или аскорбиновая кислота, является в организме активным участником окислительно-восстановительных процессов. Химически аскор-

биновая кислота является окисленным производным шестиатомного спирта сорбита, содержащим диенольную группу ($-C=C-$), обуславливающую способность витамина С легко подвергаться окислению с одновременным восстановлением других соединений. На данной особенности аскорбиновой кислоты основаны методы ее определения.



Чаще всего используют способность витамина С обесцвечивать раствор метиленовой сини, переводя его в лейкоформу при нагревании, либо восстановление красной кровяной соли до желтой, которую в дальнейшем переводят в берлинскую лазурь с помощью хлорного железа. Реже приводится метод, основанный на восстановлении йода. Данная реакция может быть использована не только для качественного определения аскорбиновой кислоты, но и для количественного определения витамина при использовании метода титрования. В целях расширения методологической базы мы приводим все три методики. Они не требуют дефицитных реактивов и достаточно просты в постановке.

Реакция аскорбиновой кислоты с метиленовым синим

Реактивы

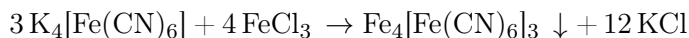
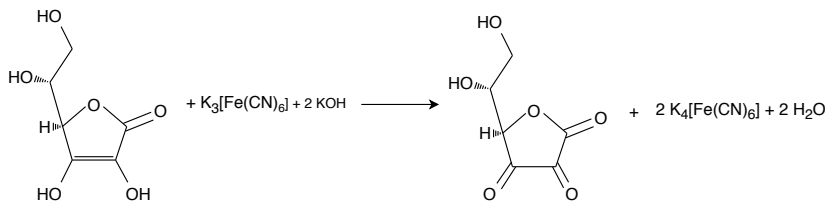
- 1) 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты.
- 2) 0,01%-ный раствор метиленового синего. Раствор можно приготовить самостоятельно или развести в 100 раз 1%-ный аптечный препарат.

3) 5%-ный раствор гидрокарбоната натрия.

Проведение реакции

- 1) В пробирку внести 1 мл раствора аскорбиновой кислоты.
- 2) Добавить в пробирку 1-2 капли раствора метиленового синего и 2-3 капли раствора соды.
- 3) Пробирку слегка нагревают на спиртовке (не кипятят!).
- 4) Наблюдается обесцвечивание окраски раствора.

Реакция аскорбиновой кислоты с красной кровяной солью и FeCl₃



Реактивы

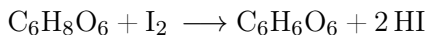
- 1) 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты.
- 2) 5%-ный раствор красной кровяной соли (свежеприготовленный на холоду);
- 3) 1%-ный раствор хлорида железа (III).
- 4) 10%-ный раствор гидроксида калия.
- 5) 10%-ный раствор соляной кислоты.

Проведение реакции

- 1) Внести в одну пробирку 5 капель раствора аскорбиновой кислоты, а в другую 5 капель дистиллированной воды.
- 2) Добавить в обе пробирки по 1 капле раствора щелочи и по 1 капле раствора красной кровяной соли.
- 3) Перемешать содержимое каждой пробирки и добавить по 3 капли соляной кислоты и по 1 капле раствора хлорного железа.
- 4) Наблюдать изменение окраски в растворе.
- 5) Проанализировать причины изменения цветов на синий и зеленый.

Йодная проба на аскорбиновую кислоту

Раствор йода в йодиде калия (Раствор Люголя) при добавлении к нему раствора аскорбиновой кислоты обесцвечивается за счёт восстановления аскорбиновой кислотой молекулярного йода и образования йодоводородной кислоты:



Реактивы

- 1) 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты, либо сок картофеля или капусты (растения натирают на терке из нержавеющей стали; растертую массу отжимают через несколько слоев марли);
- 2) Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л; либо аптечный препарат).

Проведение реакции

- 1) В две пробирки внести по 10 капель дистиллированной воды и по 1-2 капли раствора Люголя.
- 2) В одну пробирку добавить 10 капель раствора аскорбиновой кислоты, в другую – столько же дистиллированной воды.
- 3) Наблюдать обесцвечивание раствора в одной из пробирок.

Витамин А

Хорошо растворим в жирах и других липофильных растворителях: бензине, хлороформе, ацетоне и др. Витамин А, он же ретинол, участвует в окислительно-восстановительных процессах, входит в состав зрительного пигмента – родопсина, находящегося в палочках сетчатки и принимающего участие в процессах зрительного восприятия.

Реакция Друммонда

Реактивы

- 1) Рыбий жир, либо аптечный препарат ретинола.
- 2) Хлороформ.
- 3) Концентрированная серная кислота.

Проведение реакции

- 1) В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира.
- 2) Добавляют 5 капель хлороформа и 1 каплю концентрированной серной кислоты.
- 3) Наблюдают изменения цвета раствора на фиолетово-красный, постепенно переходящий в бурый.

Реакция с железным купоросом

Реактивы

- 1) Рыбий жир, либо аптечный препарат ретинола.
- 2) Хлороформ.
- 3) Насыщенный раствор сульфата железа (II) в концентрированной уксусной кислоте.
- 4) Концентрированная серная кислота.

Проведение реакции

- 1) В пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира.
- 2) Приливают 5 капель хлороформа и 5-10 капель раствора железного купороса.
- 3) Добавляют 1-2 капли концентрированной серной кислоты.
- 4) Наблюдают голубое окрашивание, постепенно переходящее в красное-розовое.

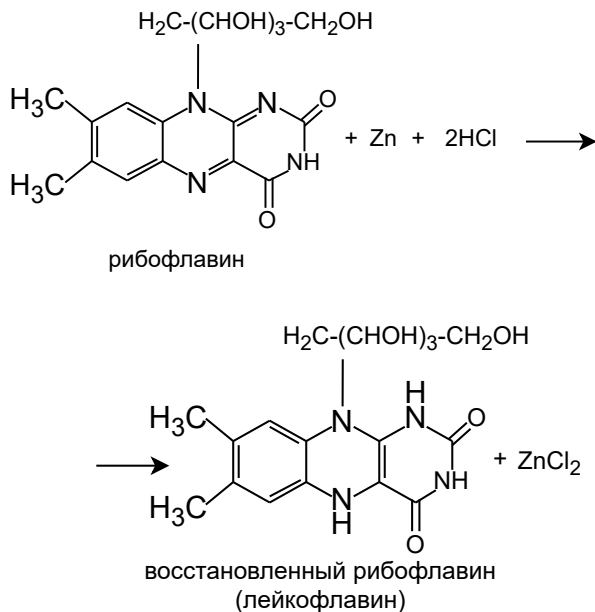
*Если раствор приобретает зеленый цвет – это говорит о наличии в исследуемой жидкости каротиноидов. Например, β -Каротин.

Витамин В1

(Тиамин, антиневритный витамин) является соединением, содержащим тиазоловое и пиримидиновое кольца. Наличие атомов серы и азота в его структуре обуславливает его название - тиамин. Витамин В1 играет важную роль в процессах превращения углеводов, так как входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы в виде фосфорного эфира — тиаминпирофосфата.

Реакция окисления тиамина в тиохром

Тиамин под действием железосинеродистого калия окисляется в тиохром — пигмент жёлтого цвета, согласно уравнению:



Реакция восстановления рибофлавина

Реактивы

- 1) Аптечный раствор рибофлавина.
- 2) Концентрированная соляная кислота.
- 3) Цинк металлический.

Проведение реакции

- 1) В пробирку вносят 10 капель раствора рибофлавина.
- 2) Добавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек цинка.
- 3) Наблюдают изменение окраски от желтой к розовой с последующим обесцвечиванием раствора.

- 4) Встряхивают реакционную смесь.
- 5) Наблюдают пожелтение раствора с последующим порозовением и обесцвечиванием.

*При встряхивании лейкофлавин окисляется кислородом воздуха до рибофлавина.

Витамин В5

(РР, никотиновая кислота, никотинамид, антипеллагрический витамин). Почти весь имеющийся в организме витамин В5 присутствует в виде никотинамида, включенного в состав коферментов – NAD и NADP, активно участвующих в процессах окисления и синтеза органических веществ.

Качественная реакция с ярь-медянкой (ацетат меди II)

Витамин В5 при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Реактивы

- 1) Аптечный раствор витамина В5.
- 2) 5%-ный раствор ацетата меди (II).

Проведение реакции

- 1) Внести в пробирку 7 капель раствора витамина В5.
- 2) Добавить 10 капель раствора ацетата меди.
- 3) Выдержать 2-3 минуты на водяной бане.
- 4) Наблюдать выпадение синего осадка медной соли никотиновой кислоты.

Витамин В6

(Пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, антидерматитный витамин) на самом деле объединяет под своим названием целую группу веществ. Однако все они являются производными пиридина, отличающимися друг от друга характером радикала в 4-м положении. Все эти соединения способны метаболизироваться в фосфопиридоксаль, являющийся коферментом белков, катализирующих реакции белкового обмена.

Все витамин группы В6 способны при реакции с хлорным железом образовывать соединение, по своим свойствам схожее с фенолята железа, окрашивающее раствор в красный цвет.

Феррихлоридная проба на пиридоксин

Реактивы

- 1) Аптечный раствор пиридоксина.
- 2) 1%-ный раствор хлорида железа (III).

Проведение реакции

- 1) Внести в пробирку 5 капель пиридоксина.
- 2) Добавить 5 капель раствора хлорида железа.
- 3) Перемешать, наблюдать окрашивание смеси в красный цвет.

Витамин Р

(Биофлавоноиды, капилляроукрепляющий витамин) участвует в стабилизации межклеточного матрикса соединительной ткани, способствует снижению капилляров, является эффективным антиоксидантом.

Витамин Р с хлоридом железа (III) образует комплексное соединение изумрудно-зеленого цвета.

Реакция с хлоридом железа (III).

Реактивы

- 1) Аптечный раствор витамина Р.
- 2) 1%-ный раствор хлорида железа (III).

Проведение реакции

- 1) Внести в пробирку 5 капель раствора витамина Р.
- 2) Добавить 3 капли раствора хлорида железа.
- 3) Перемешать, наблюдать окрашивание смеси в зеленый цвет.

Особенности строения клетки и биохимии прокариот

Начиная рассказ о строении бактериальной клетки, невозможно обойти тему грамположительных и грамотрицательных бактерий. Окраска бактерий по Граму является методикой, давно вошедшей в золотой стандарт практических работ по микробиологии. Однако выполнение окрашивания требует наличия генциана фиолетового и раствора фуксина (по Пфейферу). Раствор фуксина можно заменить фукоксином (жидкость Кастелани), доступным в аптечной продаже. Замены генциану фиолетовому нам найти не удалось. Генциан фиолетовый заменим раствором бриллиантового зеленого. В этом случае грамположительные бактерии будут окрашены в зеленый, а не в синий цвет. Для знакомства учеников с оригинальной методикой, мы приводим в тексте как стандартный протокол, так и его модифицированный вариант.

Жидкостное культивирование бактерий

Лабораторное культивирование бактерий требует наличия специализированных бактериальных сред. Одной из самых распространенных

на данный момент сред для гетеротрофных бактерий является среда LB (Lysogeny broth). Данная среда легка в приготовлении и способна поддерживать жизнедеятельность широкого спектра бактерий. Для приготовления 1 литра среды LB в 800 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона (трипсинизированный казеин), 5 г дрожжевого экстракта и 10 г NaCl. Полученный раствор доводят до 1 литра и титруют раствором гидроксида натрия до pH 7,5. В случае отсутствия необходимых ингредиентов для задач культивирования микроорганизмов в рамках школьного практикума можно воспользоваться бульонными кубиками. В данном случае методика приготовления среды выглядит следующим образом:

- 1) Растворить бульонный кубик в объеме воды в соответствии с инструкцией (в большинстве случаев один кубик на 0,5 л воды).
- 2) Добавить в раствор сахар из расчета 1г/л.
- 3) Довести раствор до кипения.
- 4) Остудить и выдержать в холодильнике для отстаивания жира.
- 5) Профильтровать через несколько слоев марли для удаления жировых капель и нерастворимых включений.
- 6) Автоклавировать. При отсутствии автоклава можно воспользоваться скороваркой. Среду разлить по емкостям, накрыть фольгой и обжать по краям (плотное укупорование емкости приведет к взрыву сосуда). В емкость рекомендуется наливать не более 1/3 объема жидкости в целях предотвращения выплескивания среды. На дно скороварки налить воду до уровня в 3-5 см. Расположить в скороварке автоклавируемые емкости. Поставить прибор на электроплитку и дождаться выхода пара из спускового клапана скороварки. С этого момента автоклавировать 20 минут.

Данная процедура может выполняться как педагогом в рамках подготовки к занятию, так и включена в занятия практикума.

Для культивирования в школьной лаборатории могут быть использованы следующие группы микроорганизмов:

Грамположительные – *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis*.

Грамотрицательные – *Escherichia coli*, *Azotobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, либо представители отдела *Cyanobacteria*.

Лиофилизированную культуру бактерий рода *L* можно приобрести в аптеке. Сенная палочка входит в состав фитопротекторных препаратов, таких как Фитоспорин. Бактерии рода могут быть выделены из почвы и клубеньков бобовых растений на безазотных микробиологических средах. Цианобактерии легко доступны в окружающей среде, однако требуют особой среды культивирования. Наиболее простой и распространенной средой для культивирования цианобактерий является среда BG11 (Blue-Green11).

Для предотвращения загрязнения культуры эукариотическими водорослями из состава среды можно исключить нитрат натрия. В безазотной среде смогут развиваться исключительно азотфиксирующие виды цианобактерий.

Среда BG11 (Blue-Green11)

| Вещество | Концентрация, г/л |
|---|-------------------|
| NaNO_3 | 1,5 |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,04 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,036 |
| Лимонная кислота | 0,006 |
| $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ | 0,006 |
| $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ | 0,001 |
| Na_2CO_3 | 0,02 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,075 |
| Раствор микроэлементов (1 мл/л) | |
| H_3BO_3 | 0,286 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,181 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,0222 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,039 |
| $\text{CuSO}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,0079 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,0494 |

В случае отсутствия полного набора микроэлементов среду можно приготовить на водопроводной воде вместо дистиллята.

Посев бактериальной культуры

В автоклавированную и охлажденную до комнатной температуры среду вносят инокулят бактериальной культуры и укупоривают ватно-марлевой пробкой, либо накрывают несколькими слоями бумаги и перевязывают бечевкой (удобно использовать канцелярские резинки).

Данные манипуляции стандартно проводятся в стерильных условиях внутри ламинарного шкафа, однако для проведения последующих опытов соблюдение идеальной стерильности не так важно – внесенный микроорганизм в любом случае будет доминировать в культуре.

Окраска по Граму

Для лучшей демонстрации эффекта окраски мы рекомендуем использовать три объекта: культуру грамположительных бактерий, культуру грамотрицательных бактерий, смесь грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Реактивы

- 1) Раствор генциана фиолетового (фенол – 10 г/л, кристаллический фиолетовый – 10 г/л в 10% этиловом спирте).
- 2) Раствор Люголя (йод – 3,3 г /л, калий йодистый – 6,7 г/л).
- 3) Раствор фуксина Пфейфера (фенол – 5 г/л, основной фуксин – 1 г/л в 1%-ный этиловом спирте).
- 4) 96%-ный спирт.

Проведение реакции

- 1) На чистое обезжиренное предметное стекло нанести 1-2 капли бактериальной культуры.
- 2) Фиксировать бактерии жаром. Предметное стекло несколько раз пронести в верхней части пламени спиртовки, не доводя до кипения жидкости. Повторять процедуру до полного высыхания предметного стекла.
- 3) На фиксированный мазок нанести 3–5 капель раствора генциан фиолетового. Выдержать 1–2 минуты.
- 4) Слить краситель и, не промывая препарат, нанести на мазок 3-5 капель раствор Люголя и выдержать 1–2 минуты.
- 5) Слить раствор Люголя и погрузить предметное стекло в 96%-ный этиловый спирт, периодически покачивая стекло, пока от мазка не перестанут отходить растворы красителя (в среднем процедура занимает около 1 минуты).

- 6) Ополоснуть мазок водой.
- 7) Нанести на мазок 3–5 капель раствора фуксина, выдержать 1 минуту.
- 8) Слить фуксин со стекла, промыть мазок в проточной водопроводной воде. Высушить мазок фильтровальной бумагой, либо в пламени спиртовки.
- 9) Микроскопировать.

*Окрашенный спирт, оставшийся после промывки мазков, в дальнейшем можно использовать для заправки спиртовок.

Модифицированный вариант окраски по Граму

В результате данной процедуры грамположительные бактерии окрашиваются в различные оттенки зеленого, а грамотрицательные — в розовый цвет.

Реактивы

- 1) 0,5%-ный спиртовой раствор бриллиантового зеленого (аптечный 1%-ный раствор необходимо развести в два раза 96%-ным спиртом).
- 2) Раствор Люголя.
- 3) Фукорцин (жидкость Кастелани) или раствор фуксина Пфейфера.

Проведение реакции

- 1) На чистое обезжиренное предметное стекло нанести 1-2 капли бактериальной культуры.
- 2) Добавить к образцу 1-2 капли раствора бриллиантового зеленого и тщательно перемешать.

- 3) Оставить мазок до полного высыхания.
- 4) Приготовленный препарат фиксировать жаром, пронеся предметное стекло несколько раз через верхнюю часть пламя спиртовки.
- 5) Не промывая, нанести на мазок 3-5 капель раствора Люголя. Покачивая предметное стекло, добиться того, чтобы спиртовой раствор несколько раз переместился над мазком. Выдержать 1-2 минуты.
- 6) Слить реактив и промыть мазок под струей водопроводной воды.
- 7) Нанести на мазок 3-5 капель фуксина и выдержать 0,5-1 минуту.
- 8) Промыть препарат под струей водопроводной воды и высушить фильтровальной бумагой либо в пламени спиртовки.
- 9) Микроскопировать.

Выделение клостридий с картофельной кожуры

Клостридии являются грамположительными спорообразующими анаэробными бактериями, характерной чертой которых является маслянокислое брожение. В процессе выделения микроорганизмов применяется кипячение образцов, что преследует сразу две цели: удалить из жидкой среды все газы, включая кислород, а также убить все неспорообразующие организмы.

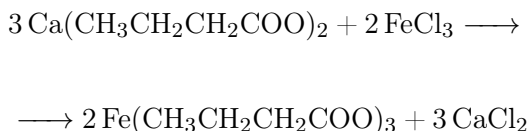
- 1) В пробирку насыпать 1г карбоната кальция (подходит толченый мел).
- 2) Поместить несколько кусочков кожуры, срезанной с немойтой картофелины.
- 3) До верха заполнить пробирки бактериальной средой.
- 4) Поместить пробирки на водяную баню и нагреть до кипения.

- 5) Плотнo укупорить еще горячие пробирки резиновыми (или силиконовыми) пробками. Пробирки поставить в химические стаканы.

Через 1-2 недели в ряде пробирок будет наблюдаться брожение и выделение газа. Увеличение давления в пробирке может вызвать подтекание среды. Отличительным признаком наличия в культуре клостридий является характерный запах масляной кислоты. Однако, если ее концентрация недостаточна – прибегают к качественной реакции масляной кислоты с хлоридом железа (III).

Получение маслянокислого железа

Реакция протекает в соответствии со следующим уравнением:



Реактивы

- 1) 5%-ный раствор хлорида железа (III).

Проведение реакции

- 1) Внести в пробирку 3–5 мл культуральной жидкости.
- 2) Добавить 1–2 мл раствора хлорида железа.
- 3) Наблюдать изменение окраски раствора.

Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буро-красный цвет, а в проходящем свете — кроваво-красный.

Окраска спор по Пешкову

Для демонстрации бактериальных спор необходима старая культура *Clostridium* sp. Или *Bacillus subtilis*. При снижении концентрации доступных питательных веществ в среде бактерии переходят к активному спорообразованию.

Реактивы

- 1) 1%-ный раствор метиленового синего.
- 2) 0,5%-ный раствор фуксина (можно заменить фукорцином).
- 3) Формалин или жидкость Карнуа. (6 частей абсолютизированного этилового спирта, 3 части хлороформа, 1 часть ледяной уксусной кислоты).

Проведение реакции

- 1) На чистое обезжиренное предметное стекло наносится 1-2 капли старой бактериальной культуры спорообразующих бактерий.
- 2) Мазок фиксируется жаром. Предметное стекло проносится над высшей частью пламени горелки до высыхания жидкости.
- 3) На мазок наносится несколько капель формалина или жидкости Карнуа. Инкубируется 15 минут.
- 4) Мазок промывается и высушивается.
- 5) На мазок наносится раствор метиленового синего и нагревается в пламени спиртовки до появления паров (15-20 секунд).
- 6) Препарат охлаждают и промывают.
- 7) Наносят раствор фуксина на 30-60 секунд.
- 8) Промывают, просушивают и микроскопируют с масляной иммерсией.

В результате окрашивания эндоспоры становятся синего цвета, а цитоплазма приобретает красный цвет. Зёрна хроматина окрашиваются в фиолетовый