



Laboratorium w walizce czyli jak ciekawiej przeprowadzić lekcje z zakresu molekularne podstawy życia¹

Joanna Łubocka

Z bogatego zbioru wybrano te doświadczenia, które mogą posłużyć jako ilustracja przy realizacji edukacji prozdrowotnej. Prezentując poniższy zbiór doświadczeń zachowano strukturę zaproponowaną przez Autorkę. Aby zapewnić przejrzystość układu treści, zostały one podzielone na działy poświęcone ilustracji właściwości głównych cząsteczek biologicznych obecnych w materiale nauczania.

I. AMINOKWASY I BIAŁKA

ĆWICZENIE IV²

DENATURACJA BIAŁEK

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości związane z nabywaniem przez białka właściwości biologicznych oraz ze sposobami ich niszczenia.

☞ **Przygotuj:**

- odczynniki powodujące denaturację białek takie jak:
 - o stężony kwas,
 - o stężona zasada,
 - o alkohol o wysokim stężeniu (najlepiej 70 lub 96%),
 - o chloroform,
 - o sól dowolnego metalu ciężkiego (np. 15% siarczan miedziowy lub/i 15% wolframian sodowy lub/i 10% octan ołowiu lub/i 5% żelazcjanek potasowy – **uważaj to jest trucizna**),
- palnik gazowy,
- łąpy do trzymania probówek,
- zestaw suchych probówek, tak aby każdy uczeń mógł wykonać doświadczenie na wszystkich czynnikach denaturujących białko jaja kurzego oraz białka wątroby,
- pipety do pobierania białka,
- pipety lub kroplomierze do dodawania czynników denaturujących.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat właściwości biologicznych białek oraz procesu denaturacji i czynników denaturujących.

☞ **Poleć**, aby przypomnieli zasady udzielania pierwszej pomocy w przypadku oparzeń.

¹ Fragmenty książki „Podpowiednik, czyli jak ciekawiej przeprowadzać lekcje z zakresu molekularne podstawy życia” przeznaczonej dla nauczycieli biologii i chemii uczących w szkołach ponadgimnazjalnych. „Podpowiednik” jest efektem serii trwających już dwa lata spotkań z uczniami i nauczycielami II Liceum Ogólnokształcącego w Walbrzychu, odbywających się pod hasłem „Laboratorium w walizce”.

² Numeracja ćwiczeń odpowiada kolejności ich pojawienia się w „Podpowiedniku...”.

☞ **Poleć**, podobnie jak w ćwiczeniu II, przygotowanie w domu kilkunastu mililitrów 1% (v/v) roztworu białka jaja kurzego (albuminy), pamiętając o uwagach wspomnianych powyżej.

☞ **Poleć**, aby uczniowie postarali się o niewielką ilość wątroby kurzej lub wieprzowej.

☺ WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Przygotuj dwie serie probówek, umieść je w statywie i opisz zgodnie z tym, jaki materiał biologiczny będziesz w nich umieszczał oraz jakiego czynnika denaturującego będziesz dodawał, pamiętaj o przygotowaniu również dwóch probówek do denaturacji cieplnej białka.
2. W pierwszej serii probówek umieść po 2 ml roztworu albuminy białka jaja kurzego, w drugiej – niewielkie ilości rozdrobnionej wątroby.
3. Do każdej serii probówek dodawaj kroplami różnych czynników denaturujących i obserwuj efekt, pamiętaj, że pracujesz ze stężonymi odczynnikami **UWAŻAJ! żeby się nie pochlapać** – stężony kwas i zasada w przypadku kontaktu ze skórą grożą poparzeniem **UWAŻAJ! żeby nie wdychać oparów, są one równie żrące jak odczynniki w postaci płynu** – do ich pobierania **UŻYWAJ WYŁĄCZNIE pipet zapatrzonych w naciągarkę, UWAŻAJ! by nie wdychać par chloroformu**, gdyż może on spowodować u Ciebie zawroty głowy.
4. Do probówki zawierającej fragmenty wątroby, a przeznaczonej do denaturacji cieplnej dodaj odrobinę wody, wstrząśnij, umieść w łapie dotrzymania probówek i ogrzewaj nad płomieniem palnika gazowego
5. Ogrzej również probówkę z albuminą, aby zaobserwować jej denaturację cieplną.

✍ PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

1. Białko w materiale biologicznym zostało poddane procesowi
2. Jest to proces polegający na struktury-rzędowej odpowiadającej za właściwości białka.
3. Narysuj i nazwij wiązania chemiczne odpowiadające za utrzymanie omawianej struktury białkowej
4. Wiązania te wytwarzają się pomiędzy aminokwasami zawierającymi atomy czyli pomiędzy Oprócz do takich aminokwasów zaliczamy również

5. Białko nabywa właściwości biologicznych podczas,
proces ten zachodzi w
6. Białko można poddać procesowi przy pomocy następują-
cych czynników chemicznych:
.....
.....
.....
.....
.....
.....
lub fizycznych:
.....
.....
7. Opisz efekt poddawania białka działaniu alkoholu - pamiętaj, że pracowałeś
m.in. na białkach tkanek wątroby
8. Wyciągnij wnioski na temat, co dzieje się z Twoją wątrobą, gdy nadużywasz
alkoholu
9. Oparzenie jest to białek zawartych w
10. Jak postąpisz, gdy ulegniesz oparzeniu rozgrzanym przedmiotem
-
-
-
lub stężonym kwasem
-
-
-

⌘ Ćwiczenie, ze względu na swoją prostotę, może być wykonane przez każdego ucznia indywidualnie lub jeżeli chcesz zmniejszyć zużycie odczynników poleć wykonanie go w parach. Na wykonanie eksperymentu potrzebujesz ok. 30 min, a zatem możesz wykonać go na pojedynczej lekcji łącznie z wypełnieniem karty pracy przez uczniów.

\$ W uproszczonej wersji ćwiczenia możesz bazować wyłącznie na podstawowych odczynnikach ze szkolnej pracowni chemicznej, w takim przypadku praktycznie nie ponosisz kosztów wykonania doświadczenia. Jeżeli zdecydujesz się na wariant rozszerzony (z chloroformem i bogatszym zestawem soli metali ciężkich) pamiętaj, że zakupione odczynniki starczą Ci na lata. Pośrednim rozwiązaniem może być np. coroczne rozszerzanie liczby wprowadzanych do doświadczenia odczynników, a wówczas koszty również rozłożą się na lata.

ĆWICZENIE VI OZNACZANIE AKTYWNOŚCI AMYLAZY ŚLINOWEJ

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące polisacharydów, budowy i rodzajów wiązań chemicznych jakie w nich występują, aktywności enzymatycznej oraz czynników, które mają na nią wpływ.

☞ **Przygotuj:**

- 1M HCl,
- roztwór jodu w jodku potasu (0.001M J₂ w KJ) lub płyn Lugola,
- 1% NaCl,
- dowolny bufor o pH 6.6 – może być cytrynianowy, uzyskany przez zmieszanie 5.45 ml 0.1M kwasu cytrynowego (m.cz. 210.14) i 14.55 ml 0.2M Na₂HPO₄ (m.cz. 178.05 dla soli dwuwodnej). Jeżeli nie jesteś w stanie przygotować takiego buforu, bo to np. zmusza Cię do zakupu odczynników, których nie posiadasz, sporządź dowolny zakwaszony roztwór sprawdzając jego pH przy pomocy papierka wskaźnikowego,
- 1% roztwór skrobi (nie musisz wcale używać do tego celu skrobi chemicznie czystej, wystarczy sporządzony na ciepło roztwór mąki ziemniaczanej).

Amylaza ślinowa hydrolizuje wiązania α -1,4-glikozydowe położone wewnątrz cząsteczki skrobi, dając dekstryny zbudowane z 6-7 cząsteczek glukozy (taki produkt jest również wynikiem hydrolizy termicznej, a widoczny, a raczej smakowy jej efekt to np. chrupiąca skórka świeżo upieczonego chleba). Obok dekstryn po odpowiedni długim działaniu amylazy w próbie pojawia się również maltoza.

Aktywność amylazy łatwo określić mierząc ubytek substratu (skrobi) w czasie hydrolizy enzymatycznej. Obserwowanym efektem tej reakcji jest zanik granatowego zabarwienia skrobi pojawiającego się pod wpływem jej wiązania się z jodem zawartym w płynie Lugola. Czas potrzebny do całkowitego zaniku barwy to tzw. punkt achromowy osiągany tym szybciej im aktywniejszy enzym. Pojawiająca się przejściowo barwa czerwono-brązowa pochodzi od dekstryn.

Wysoka aktywność amylazy ślinowej może być przyczyną większej podatności na próchnicę zębów, gdyż w bardzo krótkim czasie polisacharydy zawarte w pokarmie zostają rozłożone do oligosacharydów stanowiących doskonałą pożywkę dla flory bakteryjnej jamy ustnej. Zatem im masz aktywniejszą amylazę ślinową tym częściej musisz myć zęby.

Możesz zaproponować uczniom obliczenie aktywności badanego enzymu. W tym przypadku za jednostkę aktywności przyjmuje się taką ilość enzymu, która w czasie 10 min., w temp. 37°C, w pH = 6.6 i w obecności jonów chlorowych jako aktywatora, hydrolizuje 50 mg skrobi.

Przykład obliczenia

Do badania użyto 1 ml 10x rozcieńczonej śliny. Punkt achromowy osiągnięto po 15 min. Oblicz aktywność badanego enzymu.

10min. (z definicji jednostki): 15min. (osiągnięcie p. achromowego) = 0.66

0.66 x 10 (rozcieżnienie śliny) = 6.6 jednostek/ ml (tyle śliny użyto do badań);

- łaźnię wodną na 37°C np. garnek z wodą ogrzewany płomieniem palnika gazowego, zaopatrzony w termometr wraz ze statywem na kilka probówek (jeżeli nie dysponujesz statywem, który mieściłby się w garnku, to możesz przygotować grubą gąbkę z otworami na probówki), jeżeli i to jest nie do wykonania, to temperatura jaką daje łaźnia wodna może być w ostateczności zastąpiona temperaturą pochodzącą z trzymającej probówkę ręki ucznia;
- zestaw suchych probówek;
- pipety o pojemności 1, 2 i 5 ml;
- zakraplacz lub pipetkę z gumką (pipeta pasteurowska);
- porcelanowe płytki z zagłębieniami, takie jak do wykonania próby krzyżowej przy badaniu grupy krwi lub jeżeli ich nie posiadasz – zestaw małych probówek lub innych szklanych naczynek o niewielkiej pojemności. Na jedną ćwiczącą grupę potrzebujesz przynajmniej jednej porcelanowej płytki lub kilkunastu małych probówek;
- stopery lub jeżeli nimi nie dysponujesz poleć uczniom przyniesienie zegarków z sekundnikiem.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy i występowania cukrów.

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie co oznacza pojęcie aktywności enzymatycznej i od czego aktywność enzymu zależy.

☞ **Popros** o przyniesienie niewielkich ilości takich produktów spożywczych, w których uczniowie podejrzewają obecność skrobi (pieczywo, ziemniaki itp.).

😊 WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Przygotuj i opisz serię probówek zgodnie z tym jakie próby będą się w nich znajdowały
2. W pierwszej umieść próbkę własnej śliny w ilości około 1 ml, a następnie rozcieńcz ją 10x wodą, probówkę wstrząśnij, tak aby obie cieczki dokładnie się wymieszały – od tej chwili zawartość probówki traktuj jako roztwór enzymu.
3. Do drugiej probówki odmierz 2 ml buforu o pH = 6.6, 1 ml roztworu NaCl oraz 1 ml uprzednio przygotowanego roztworu enzymu - jest to twoja próba badana.
4. W następnych, po dokładnym rozdrobnieniu, umieść niewielkie ilości przyniesionych produktów spożywczych, tak aby ten sam produkt znalazł się w dwóch probówkach, opisując je np. 3a i 3b itd.
5. Do pojedynczej probówki z każdej pary dodaj 1-2 ml nierozcieńczonej śliny, do drugiej odmierz taką samą ilość wody.
6. Wszystkie probówki wstaw do łaźni wodnej o temp. 37°C i ogrzewaj kilka minut.
7. W czasie, gdy probówki są ogrzewane przygotuj płytkę porcelanową - w każdym zagłębieniu umieść przy pomocy zakraplacza 1 kroplę HCl oraz 3 krople płynu Lugola.
8. Teraz wyjmij z łaźni wodnej probówkę nr 2 zawierającą Twoją badaną próbę i dodaj do niej 5 ml roztworu skrobi, wstrząśnij zawartość i wstaw z powrotem do łaźni wodnej lub przez cały czas trzymaj w ręce, by nie ostygła.

9. Pobierz kilka kropli roztworu z probówki zawierającej badaną próbę i umieść w pierwszym zagłębieniu płytki porcelanowej,
10. Zanotuj czas jako "0" i obserwuj barwę,
11. Po upływie minuty ponownie pobierz próbkę i umieść w drugim zagłębieniu płytki,
12. Również teraz zanotuj czas – jako "1" i obserwuj barwę,
13. Powtarzaj powyższe czynności co minutę tyle razy, aż w kolejnym zagłębieniu płytki porcelanowej nie zauważysz zmiany barwy – osiągnąłeś tzw. punkt achromowy, zapamiętaj czas jaki upłynął od "0" aż do tej chwili.
14. Teraz zajmij się, pozostającymi ciągle w łaźni wodnej, probówkami zawierającymi próbki produktów spożywczych.
15. Do każdej z nich dodaj płynu Lugola i zaobserwuj różnice pomiędzy probówkami w parach zawierających ten sam produkt spożywczy.

PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

.....

1. Skrobia jest to zbudowany z cząsteczek połączonych ze sobą wiązaniem typu

2. Narysuj to wiązanie

3. Wiązanie tego typu jest podatne na działanie enzymu zwanego występującą m.in. w

4. Inny typ wiązania łączącego pojedyncze elementy cukrowe możemy spotkać np. w, jest on opisywany jako wiązanie

5. Wiązanie, o którym mowa w punkcie 4. jest / nie jest podatne na działanie badanego enzymu.

6. Szybkość hydrolizy enzymatycznej jest zależna od, na którą mają wpływ następujące czynniki:

.....

7. Oblicz aktywność badanego przez Ciebie enzymu, korzystając z definicji jednostki aktywności: jest to taka ilość enzymu, która w czasie 10 min., w temp. 37°C, w pH = 6.6 i w obecności jonów chlorkowych jako aktywatora, hydroлізуje 50 mg skrobi oraz wzoru:

(10 min.: czas osiągnięcia punktu achromowego) x rozcieńczenie śliny.

8. Opisz jaki wpływ na stan Twojego uzębienia ma bardzo wysoka / bardzo niska aktywność badanego w doświadczeniu enzymu:

.....

9. Wytlumacz różnice, występujące w końcowym efekcie doświadczenia, w parach próbek a i b, w których umieściłeś ten sam produkt spożywczy raz uzupełniając go wodą, a raz śliną:

.....

10. Jakie znasz inne oprócz enzymatycznej metody hydrolizy wysokocząsteczkowych związków chemicznych:

.....

⌚ Ćwiczenie, ze względu na niewielki stopień skomplikowania, może być wykonane w 2 osobowych grupach jedynym czynnikiem powodującym zwiększenie liczebności zespołu może być niedostateczna ilość porcelanowych płytek lub naczynek do oznaczania punktu achromowego. Na wykonanie eksperymentu potrzebujesz ok. 90 min.

\$ W pełnej wersji doświadczenia poniesiesz koszty zakupu kwasu cytrynowego, fosforanu sodowego oraz porcelanowych płytek. Zauważ jednak, że zakupione przez Ciebie odczynniki wystarczą na lata, a wydatek związany z zakupem płytek porcelanowych jest wydatkiem jednorazowym. W uproszczonej wersji ćwiczenia (bez przygotowania buforu i z użyciem innych niż porcelanowe płytki naczyń do badania punktu achromowego) ponosisz wyłącznie koszt zakupu płynu Lugola.

II. CUKRY

ĆWICZENIE VIII

ENZYMATYCZNE OZNACZANIE GLUKOZY W MATERIALE BIOLOGICZNYM

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

- ☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące właściwości chemicznych glukozy.
- ☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące zmian chorobowych zachodzących w organizmie związanych z nieprawidłowym poziomem glukozy we krwi.

☞ Przygotuj:

- osocze krwi ludzkiej (jeżeli możesz skorzystać z miejscowego laboratorium, może uda Ci się zdobyć również osocze patologiczne, pochodzące od osoby chorej na cukrzycę) lub zwierzęcej – postaraj się o kilkanaście ml świeżej krwi, natychmiast zmieszaj ją z roztworem o następującym składzie: 2.2% cytrynianu sodu, 2.24% glukozy i 0.8% kwasu cytrynowego, aby zapobiec krzepnięciu i pozostaw w lodówce do następnego dnia, aby erytrocyty opadły na dno naczynia, w którym przechowujesz krew, pozwalając zebrać osocze; pamiętaj by postępować tak, aby nie doszło do hemolizy krwinek, gdyż uwolniona hemoglobina maskowałaby barwny odczyn powstający w czasie reakcji enzymatycznej; w ten sposób przygotowane i przechowywane krwinki są trwałe przez 2-3 dni;
- zestaw do laboratoryjnego, enzymatycznego oznaczania glukozy dowolnej firmy. Zestawy w zależności od firmy, które je produkują nieco różnią się od siebie, jednakże zasada metody, jak również sposób postępowania pozostają w zasadzie niezmiennie. Jakkolwiek każdy zestaw zawiera instrukcję jego użycia, pozwól, że w tym miejscu przedstawię wybrane z niego, najistotniejsze informacje. Glukoza w wyniku reakcji z enzymami zawartymi w odczynniku (oksydaza glukozy i peroksydaza) tworzy czerwoną pochodną, która w standardowych warunkach jest oznaczana spektrofotometrycznie dając informacje o ilości glukozy w próbce. Jednakże na potrzeby pracowni szkolnej można użyć tej metody do jakościowego oznaczenia tego cukru w materiale biologicznym, innymi słowy do stwierdzenia czy glukoza znajduje się w badanej próbce czy też nie. Jest to metoda alternatywna do opisanej w ćwiczeniu VII, na tyle jednak atrakcyjna i jednocześnie prosta, że warta pokazania. Oprócz odczynnika enzymatycznego w zestawie znajdziesz również standardowy roztwór glukozy dający po reakcji **konkretny** odcień barwnej pochodnej, do którego możesz porównać oznaczane w czasie ćwiczenia próby. Zatem znając ilość glukozy dodawanej w standardzie (ta informacja zawsze znajduje się w instrukcji do konkretnego zestawu) możesz **szacunkowo** ocenić nawet ilość glukozy w Twoich próbach, a nie tylko stwierdzić, czy ten cukier w nich występuje, czy też nie. Pamiętaj, że w ten sposób oznacza się wyłącznie poziom wolnej glukozy;
- zakraplacze – instrukcja załączona do zestawu będzie wymagała od Ciebie odmierzenia pewnych objętości w mikrolitrach, w takim wypadku pamiętaj, że jedna kropla to ok. 10 μ l lub pipetki pasteurowskie;
- pipety o objętości 1 ml;
- zestaw suchych probówek;
- łąźnię wodną na 37⁰C – jeżeli masz kłopot z jej przygotowaniem, to na potrzeby tego doświadczenia można ją pominąć i prowadzić je temperaturze pokojowej (eksperyment trwa wówczas kilka minut dłużej, ze względu na konieczność wydłużenia czasu trwania reakcji enzymatycznej).

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

- ☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy i występowania cukrów (ze szczególnym uwzględnieniem glukozy).

- ☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie co oznacza pojęcie aktywności enzymatycznej i od czego aktywność enzymu zależy.
- ☞ **Poleć**, aby uczniowie odnaleźli informacje na temat zmian chorobowych zachodzących w organizmie związanych z nieprawidłowym poziomem glukozy we krwi.
- ☞ **Poproś** o przyniesienie niewielkich ilości takich produktów spożywczych, w których uczniowie podejrzewają obecność glukozy w wolnej postaci (miód, soki owocowe – głównie winogronowy, owoce itp.) oraz takich, gdzie jest ona związana w innych cząsteczkach (mąka ziemniaczana, chleb itp.).

☺ WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Przygotuj i opisz kolejnymi numerami serię probówek.
2. Do pierwszej dodaj 1-2 krople standardowego roztworu glukozy.
3. Do drugiej tyle samo osocza krwi.
4. Punkty 2 i 3 wykonaj tylko wówczas, jeżeli nie zostanie przeprowadzone wspólne oznaczanie glukozy w standardzie i osoczu krwi.
5. Do kolejnych dodawaj kilka kropli produktów spożywczych (jeżeli są to produkty w postaci stałej np. miód, zalej go niewielką ilością wody, odstaw na chwilę, a do badań użyj płynu z nad osadu; jeżeli są to owoce – wyciśnij z nich sok).
6. Do wszystkich probówek dodaj po 1ml odczynnika enzymatycznego.
7. Próby włóż do łaźni wodnej o temp. 37°C na 5 min., jeżeli łaźnia nie jest przygotowana – pozostaw próby w temperaturze pokojowej na 10 - 15 minut.
8. Po upływie tego czasu porównaj barwę we wszystkich probówkach – za punkt odniesienia niech służy Ci odcień, który pojawił się w pierwszej probówce (zawierającej standard glukozy).

✍ PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

1. O obecności glukozy w badanej próbce świadczy pojawienie się barwy w probówce.
2. Jest ona wynikiem reakcji, w której biorą udział: oraz
3. Badane osocze krwi zawiera ok. glukozy.
4. Pod względem zawartości glukozy zostały przebadane następujące produkty:
 -
 -
 -
 -
5. Wolna glukoza wystąpiła w wymienionych poniżej, w ilości większej / mniejszej niż w osoczu krwi:
 - więcej / mniej glukozy,
 - więcej / mniej glukozy,
 - więcej / mniej glukozy,
 - więcej / mniej glukozy.

6. Poziom glukozy w osoczu krwi jest / nie jest stały i może zależeć / nie zależy od:
-
 -
 -
 -
7. Wymień choroby związane z nieprawidłowym poziomem glukozy w osoczu krwi i podaj ich podstawowe objawy:
-
-
-
8. Czy możemy im zapobiegać, a jeżeli tak to w jaki sposób
-
-

§ Proponuję wykonać powyższe ćwiczenie tak, aby oznaczenie standardu glukozy oraz jej poziomu w osoczu krwi było przeprowadzone wspólnie dla wszystkich (duża oszczędność odczynnika enzymatycznego) natomiast niech każdy zespół ma możliwość przebadania 3 lub 4 różnych produktów spożywczych, zarówno tych zawierających wolną glukozę, jak i tych, gdzie glukoza występuje w postaci chemicznie związanej (sacharoza, skrobia) na wykonanie eksperymentu potrzebujesz ok. 35 minut.

§ Również to ćwiczenie dopuszcza możliwość jego wykonania w kilku wariantach, w zależności od tego jakim materiałem biologicznym będziesz dysponować. W każdym wypadku musisz jednak posiadać zestaw do enzymatycznego oznaczania glukozy i jest to właściwie jedyny wydatek jaki ponosisz. Producenci oferują zestawy o różnej zawartości odczynnika enzymatycznego i standardu glukozy. Zakup nawet najmniejszego z nich pozwoli Ci na wielokrotne powtórzenie eksperymentu (zwróć uwagę, że do pojedynczego oznaczenia zużywasz zaledwie 1 ml odczynnika i 1-2 krople standardu glukozy).

III. LIPIDY

Pamiętaj!, że powodzenie wykonania wszystkich doświadczeń z tego rozdziału zależy od wykonywania ich przy użyciu **absolutnie suchego** szkła.

Ćwiczenia IX oraz X, XI lub/i XII najlepiej jest wykonywać łącznie, choć nie znaczy to, że muszą być one wykonane jednego dnia. Odstęp między ich przeprowadzeniem może wynosić nawet kilka tygodni, pod warunkiem prawidłowego przechowania roztworów lipidowych, które zostanie opisane poniżej.

ĆWICZENIE IX

IZOLACJA LIPIDÓW Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Ponieważ to ćwiczenie jest niejako wstępem przygotowującym materiał biologiczny do dalszych badań, nie zostało zaopatrzone w oddzielną kartę pracy.

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące budowy i występowania lipidów oraz rozpuszczalników organicznych.

☞ **Przygotuj:**

- osocze krwi zgodnie z procedurą opisaną w ćwiczeniu VIII;

- metanol (pamiętaj, że metanol jest trucizną i wymaga przechowywania "pod kluczem");
- chloroform;
- kolbki stożkowe (erlenmajerki) na 50 ml;
- zlewki na 50 ml;
- pipety o objętości 2, 5, 10 ml;
- pipetki pasteurowskie lub zakraplacze;
- lejki z sączkami z bibuły;
- zestaw suchych probówek;
- szczelne naczynia np. zakręcane probówki do przechowywania lipidów.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy i występowania lipidów.

☞ **Poproś** o przyniesienie jajek oraz niewielkich ilości takich produktów spożywczych, w których uczniowie podejrzewają obecność lipidów (różnego rodzaju margaryny i oleje roślinne, masło, smalec, tran itp.).

☺ WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Dokładnie oddziel żółtko od białka jaja.
2. Do kolbek stożkowych odmierz po ok. 1g żółtka (całe żółtko waży ok. 4 g) i białka (koniecznie użyj do tego celu czystych pipet o szerokim wypływie).
3. Do obu próbek dodaj po 4 ml alkoholu i bardzo dokładnie wymieszaj.
4. Następnie dodaj po 8 ml chloroformu i wstrząsaj przez ok. 15 min. – uważaj, żeby nie wychłapać próbek.
5. Jeżeli dysponujesz osoczem krwi to odmierz 1 ml do probówki, a następnie dodaj po 5 ml metanolu i chloroformu, całość zamieszaj i pozostaw do rozdzielania się dwóch faz.
6. Podczas, gdy próbki zawierające materiał z jaja są wytrząsane, a próbka osocza została odstawiona do rozdzielania się faz, przygotuj i opisz kolejnymi numerami serię suchych probówek.
7. W każdej z nich umieść niewielką ilość różnych produktów spożywczych zawierających lipidy.
8. Do każdej dodaj 4-5 ml metanolu, tak aby próbka badanego materiału znalazła się poniżej jego poziomu.
9. Probki wstrząśnij energicznie (ale tak, by ich nie wychłapać) i pozostaw na kilka minut.
10. Teraz powróć do próbki zawierającej osocze – jeżeli już pojawiła się wyraźna granica rozdzielająca dwa płyny, to przy pomocy zakraplacza lub pipetki pasteurowskiej zbierz dolną fazę.
11. Teraz przesącz wszystkie próby (te z jaja i osocza również) przez lejki z bibułowymi sączkami (każda próbka musi być zaopatrzona w swój własny sączonek) do czystych probówek.
12. **Klarowny** przesącz zachowaj do dalszych badań w szczelnie zamkniętych naczyniach.

§ Ćwiczenie może być wykonywane przez dwuosobowe zespoły – każdy z nich powinien wykonać izolację lipidów z jaja oraz ich ekstrakcję z 2-3 dowolnych produktów spożywczych i/lub osocza. Nie przejmuj się, jeżeli dojdzie do wyparowania rozpuszczalnika z naczynia, w którym przechowujesz ekstrakty lipidowe. W takim wypadku po prosu dolej 1-2 ml rozpuszczalnika do naczynia i ponownie dobrze je zakręć, przechowuj ekstrakty w lodówce – zapobiegiesz w ten sposób utlenianiu lipidów i nadmiernemu parowaniu rozpuszczalników. Na wykonanie ćwiczenia potrzebujesz do 35 min.

§ Również to ćwiczenie dopuszcza możliwość jego wykonania w kilku wariantach, w zależności od tego jakim materiałem biologicznym będziesz dysponować. Musisz dokonać zakupu chloroformu (który będzie używany również w następnych ćwiczeniach) i metanolu. Ponieważ zużywasz niewielkie ilości tych rozpuszczalników, na pewno wystarczą na długo.

ĆWICZENIE XII ENZYMATYCZNE OZNACZANIE CHOLESTEROLU W MATERIALE BIOLOGICZNYM

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące właściwości chemicznych i biologicznych oraz występowania steroli roślinnych i zwierzęcych.

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości dotyczące zmian chorobowych zachodzących w organizmie związanych z nieprawidłowym poziomem cholesterolu we krwi.

☞ **Przygotuj:**

- osocze krwi ludzkiej (patrz uwagi do ćwiczenia VIII)
- roztwory lipidów uzyskane w ćwiczeniu IX
- zestaw do laboratoryjnego, enzymatycznego oznaczania cholesterolu dowolnej firmy (w tym miejscu przeanalizuj uwagi z analogicznego punktu ćwiczenia VIII). Estry cholesterolu w obecności esterazy cholesterolowej, zawartej w odczynniku enzymatycznym, ulegają hydrolizie do cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Sam cholesterol poddany działaniu oksydazy cholesterolowej i peroksydazy, które również zawarte są w odczynniku enzymatycznym, daje czerwoną pochodną;
- zakraplacze – instrukcja załączona do zestawu będzie wymagała od Ciebie odmierzenia pewnych objętości w mikrolitrach, w takim wypadku pamiętaj, że jedna kropla to ok. 10 μ l lub pipetki pasteurowskie;
- pipety o objętości 1 ml;
- zestaw suchych probówek;
- łaźnię wodną na 37°C – jeżeli masz kłopot z jej przygotowaniem, to na potrzeby tego doświadczenia można ją pominąć i prowadzić je temperaturze pokojowej (eksperyment trwa wówczas kilka minut dłużej, ze względu na konieczność wydłużenia czasu trwania reakcji enzymatycznej);
- niewielkie ilości chloroformu do przepłukiwania zakraplaczy;
- suszarkę do włosów.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy i występowania lipidów (ze szczególnym uwzględnieniem steroli roślinnych i zwierzęcych).

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie co oznacza pojęcie aktywności enzymatycznej i od czego zależy aktywność enzymu.

☞ **Poleć**, aby uczniowie odnaleźli informacje na temat zmian chorobowych zachodzących w organizmie związanych z nieprawidłowym poziomem cholesterolu we krwi.

😊 WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Przygotuj i opisz kolejnymi numerami serię probówek.
2. Do pierwszej dodaj 1-2 krople standardowego roztworu cholesterolu.
3. Do drugiej tyle samo osocza krwi.
4. Punkty 2 i 3 wykonaj tylko wówczas, jeżeli nie zostanie przeprowadzone wspólne oznaczanie cholesterolu w standardzie i osoczu krwi.
5. Do następnych odmierz taką samą ilość roztworów lipidów uzyskanych w ćwiczeniu IX. **Pamiętaj!**, aby po każdym użyciu zakraplacz dokładnie wypłukać chloroformem.
6. Jeżeli widzisz na dnie probówki kroplę płynu to ogrzewaj ją przez chwilę w strumieniu ciepłego powietrza suszarki do włosów, tak aby płyn mógł odparować.
7. Do wszystkich probówek dodaj po 1ml odczynnika enzymatycznego.
8. Próby włóż do łaźni wodnej o temp. 37°C na 5 min., jeżeli łaźnia nie jest przygotowana - pozostaw próby w temperaturze pokojowej na 10 - 15 min.
9. Po upływie tego czasu porównaj barwę we wszystkich probówkach - za punkt odniesienia niech służy Ci odcień, który pojawił się w pierwszej probówce (zawierającej standard cholesterolu).

📝 PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

.....

1. Cholesterol jest to, o jego obecności w badanej próbce świadczy pojawienie się barwy w probówce.
2. Jest ona wynikiem reakcji, w której biorą udział: oraz
3. W osoczu cholesterol występuje w postaci związanej z jako formy i
4. Badane osocze krwi zawiera ok. cholesterolu całkowitego.
5. Pod względem zawartości cholesterolu zostały przebadane następujące produkty:
 -
 -
 -
 -

6. Cholesterol oznaczono w wymienionych poniżej, w ilości większej / mniejszej niż w osoczu krwi:

- więcej / mniej cholesterolu
- więcej / mniej cholesterolu
- więcej / mniej cholesterolu
- więcej / mniej cholesterolu

7. Uzasadnij nielogiczność zdania często pojawiającego się np. w reklamach: "Margaryna bez cholesterolu"

.....

.....

.....

.....

8. Poziom cholesterolu w osoczu krwi jest / nie jest stały i może zależeć / nie zależy od:

-
-
-
-

9. Wymień choroby związane z nieprawidłowym poziomem cholesterolu w osoczu krwi i podaj ich podstawowe objawy:

.....

.....

.....

10. Czy możemy im zapobiegać, a jeżeli tak to w jaki sposób

.....

.....

.....

☒ Proponuję wykonać powyższe ćwiczenie tak, aby oznaczenie standardu cholesterolu oraz jego poziomu w osoczu krwi było przeprowadzone wspólnie dla wszystkich (duża oszczędność odczynnika enzymatycznego) natomiast niech każdy zespół ma możliwość przebadania 3 lub 4 różnych produktów spożywczych, zawierających zarówno sterole roślinne (oleje, margaryny), jak i zwierzęce (smalec, masło). Na wykonanie eksperymentu potrzebujesz ok. 35 minut.

§ Również to ćwiczenie dopuszcza możliwość jego wykonania w kilku wariantach, w zależności od tego jakim materiałem biologicznym będziesz dysponować. W każdym wypadku musisz jednak posiadać zestaw do enzymatycznego oznaczania cholesterolu i jest to właściwie jedyny wydatek jaki ponosisz (chloroform używany jest w tym ćwiczeniu w bardzo niewielkich ilościach). Producenci oferują zestawy o różnej zawartości odczynnika enzymatycznego i standardu cholesterolu. Zakup nawet najmniejszego z nich pozwoli Ci na wielokrotne powtórzenie eksperymentu (zwróć uwagę, że do pojedynczego oznaczenia zużywasz zaledwie 1 ml odczynnika i 1-2 krople standardu cholesterolu).

IV. INNE

**ĆWICZENIE XIV
LIZA KOMÓREK**

Ćwiczenia oznaczone literami A i B dotyczą przebiegu tego samego zjawiska – lizy, ale w zupełnie różnych komórkach – zwierzęcych i roślinnych. Mogą zatem zostać potraktowane wariantowo, albo służyć ilustracji lekcji poświęconych odpowiednio tkankom zwierzęcym lub roślinnym, mogą też przyczynić się do uargumentowania tezy o jedności i wspólnym pochodzeniu świata roślinnego i zwierzęcego.

A) HEMOLIZA ERYTOCYTÓW (specyficzna liza krwinek czerwonych)**📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ**

☞ **Przypomnij** sobie wiadomości na temat krwi – osocza oraz jej składników morfotycznych ze szczególnym uwzględnieniem erytrocytów.

☞ Przygotuj:

- krew pełną ludzką lub zwierzęcą zgodnie z uwagami do ćwiczenia VIII – w tym ćwiczeniu szczególnie ważne jest takie przygotowanie krwinek, by nie doszło do ich hemolizy przed rozpoczęciem ćwiczenia – pamiętaj, że roztwór izotoniczny dla krwinek stanowi 0.9% NaCl czyli sól fizjologiczna; pobraną krew od razu podziel na tyle porcji ile czynników hemolitycznych dla ilu grup ćwiczących przewidujesz, tak by przed ćwiczeniami każda grupa otrzymała próbki z krwią do własnej dyspozycji (np. 4 grupy ćwiczeniowe i 4 czynniki hemolityczne zatem 16 porcji krwi + jedna wspólna dla wszystkich grup próbki, stanowiąca kontrolę dla porównania efektów działania czynników hemolitycznych zawierająca krwinki zawieszona w 0.9% NaCl), oczywiście przechowuj ją w lodówce;
- wariantowo – rozsmaruj krew na szkiełku podstawowym do obejrzenia krwinek pod mikroskopem – nanieś kroplę zawiesiny erytrocytów na szkiełko podstawowe, drugie takie samo szkiełko przytknij brzegiem do poprzedniego za kroplą płynu, pociągnij wzdłuż, tak aby uzyskać cieniutką warstwę krwi, przykryj szkiełkiem nakrywkowym, oglądaj w powiększeniu 40x okular (krwinki są dobrze widoczne właściwie tylko w mikroskopie z wbudowanym źródłem światła);
- zestaw czynników hemolizujących: woda, detergent (tu nastąpi rzeczywista hemoliza czyli wyciek hemoglobiny związany ze zniszczeniem błony erytrocytu); alkohol (metanol lub etanol), aceton itp. (przy użyciu tych czynników dojdzie raczej do zniszczenia struktury hemoglobiny, co łatwo zaobserwować po strąconym osadzie białka, który pojawi się w próbówce);
- 0.9% NaCl
- pipety o objętości 1-2 ml;
- zakraplacz lub pipety pasteurowskie;
- zestaw suchych probówek.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat składu krwi i budowy elementów morfotycznych.

☞ **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy błony biologicznej oraz na temat czynników wpływających na stan uwodnienia komórki.

☺ WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Opisz otrzymane od nauczyciela próbówki z krwinkami nazwami czynników hemolitycznych, nie wstrząsaj próbówkami – krwinki muszą tworzyć warstwę na dnie próbówki.
2. Do każdej próbówki dodaj czynnika hemolizującego – wody, alkoholu, acetonu w tej samej objętości co krwi; detergentu – kilka kropel.
3. Obserwuj efekt.
4. Porównaj z kontrolą przygotowaną przez nauczyciela dla wszystkich grup eksperymentalnych.

✍ PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

1. Składnikami morfotycznymi krwi są:
2. Eksperyment przeprowadzony został na
3. Hemoliza krwinek jest to zjawisko polegające na
4. Krwinki zostały zniszczone przy użyciu:
 -
 -
 -
 -
5. Wskaż czynniki, które doprowadziły do rzeczywistej hemolizy krwinek
6. W czasie dodawania wody do krwinek dochodzi do hemolizy ponieważ
7. W czasie dodawania detergentu do krwinek dochodzi do hemolizy, ponieważ
8. Wskaż czynniki, które doprowadziły do zniszczenia krwinek na innej drodze niż hemoliza
9. Jak proces miał miejsce w próbkach zawierający te czynniki
10. Podaj nazwy podstawowych chorób związanych z nieprawidłową budową erytrocytów
11. Jakie są konsekwencje biologiczne występowania takich chorób

⌚ Ćwiczenie powinno zostać wykonywane w zespołach liczących nie więcej niż cztery osoby. Każdy z zespołów może, lecz nie musi testować różne czynniki hemolityczne. Po zakończeniu eksperymentu zespoły porównują efekty działania różnych czynników hemolitycznych. Czas trwania – 20 min. Można polecić uczniom, aby sami pobierali krwinki do badań ze wspólnego dla wszystkich naczynia, w którym przygotowałeś krew (unikniesz w ten sposób wstępnego podziału krwi na porcje), ale trzeba zachować przy tym ostrożność, aby nie doprowadzić do wzburzenia warstwy osiadłych na dnie erytrocytów. Pamiętaj, że przy takim założeniu czas wykonania eksperymentu zostanie wydłużony.

B) LIZA KOMÓREK ROŚLINNYCH

📖 PRZYGOTUJ SIĘ DO ĆWICZEŃ

👉 **Przypomnij** sobie wiadomości na temat zjawiska lizy komórek

👉 **Przygotuj:**

- pipety o objętości 1,2 i 5 ml;
- zestaw suchych probówek;
- palnik i łapy do trzymania probówek;
- zestaw czynników litycznych np.: chloroform, 30% kwas octowy, 50% dowolny alkohol itp. – jako kontroli użyj próbki z wodą, nie przejmuj się zachwianiem izotoniczności środowiska i zawartości komórek, w przypadku komórek roślinnych możesz sobie na to pozwolić ze względu na obecność ściany komórkowej chroniącej komórki przed rozerwaniem jej błon poprzez wzrastające ciśnienie turgorowe.

📖 PRZYGOTUJ UCZNIÓW DO ĆWICZEŃ

👉 **Poleć**, aby uczniowie przypomnieli sobie wiadomości na temat budowy błony biologicznej.

👉 **Poleć**, aby uczniowie przygotowali jednakowej wielkości kostki (ok. 1 cm³) wycięte z korzenia zawierającego barwniki roślinne (najlepiej z buraka) – po 5 kostek na każdy ćwiczący zespół; wycięte kostki przed użyciem muszą być przez ok. 30 min. przepłukiwane bieżącą wodą celem odmycia barwnika wypływającego z mechanicznie uszkodzonych komórek, co zawsze towarzyszy wycinaniu fragmentów organów roślinnych – w ten sposób barwnik, który pojawi się w probówce w czasie trwania eksperymentu będzie pochodził wyłącznie z komórek, które rzeczywiście uległy lizie.

☺ WYKONAJCIE EKSPERYMENT

1. Przygotuj serię pięciu opisanych kolejnymi numerami probówek.
2. Do każdej włóż jedną, wcześniej odpowiednio przygotowaną kostkę, wyciętą z korzenia buraka.
3. Do pierwszej nalej 5 ml wody – to będzie Twoja kontrola służąca do porównywania barwy pojawiającej się w innych probówkach. Do drugiej nalej 5 ml wody i zawartość tej probówki gotuj ok. 5 min. nad płomieniem palnika gazowego. Do trzeciej dodaj 5 ml chloroformu. Do czwartej 5 ml kwasu octowego. Do ostatniej 5 ml alkoholu.
4. Probówki odstaw na ok. 30 min.
5. Po upływie tego czasu obserwuj zmiany jakie zaszły w zabarwieniu zawartości probówek, dokonaj ich porównania.

☞ PROPOZYCJA KARTY PRACY UCZNIĄ

TEMAT DOŚWIADCZENIA:

.....

1. Liza komórek to zjawisko polegające na
2. O zajściu tego zjawiska w komórce świadczy
3. Ściana komórkowa podlega / nie podlega zjawisku lizy.
4. Czynniki litycznymi użytymi w doświadczeniu są:
 -
 -
 -
 -
5. Wskaż inne czynniki prowadzące do lizy komórek
 -
 -
 -
6. W przypadku komórek roślinnych nie jest nim ponieważ
7. Narysuj fragment błony biologicznej i skaż te jej elementy na jakie oddziałuje chloroform oraz te, na które oddziałuje alkohol lub kwas octowy

8. Wyjaśnij dlaczego tak się dzieje

.....

9. Wyjaśnij co wspólnego ma proces kisenia warzyw (w tym również buraków) ze zjawiskiem obserwowanym w czasie trwania eksperymentu

.....

☞ Ćwiczenie powinno zostać wykonywane w zespołach liczących nie więcej niż cztery osoby. Każdy z zespołów może, lecz nie musi testować różne czynniki lityczne. Po zakończeniu eksperymentu zespoły porównują efekty działania różnych czynników litycznych. Czas wykonania – 20 min. – nie licząc czasu potrzebnego do zaobserwowania efektów lizy (ok. 30 min.), ponieważ można to zrobić, gdy uczniowie zakończą już lekcję danego dnia, albo na następny dzień.

BIBLIOGRAFIA

- M. Mejbaum-Katzenellenbogen, *Ćwiczenia z biochemii dla biologów*, 1992.
 A. Kozubek, *Molekularna organizacja komórki cz.II*, 1994.
 J. Buczek, *Ćwiczenia z fizjologii roślin*, 1994.
 J. Łubocka, M. Stasiuk, Z. Wróblewski, L. Zubik *Autorskie instrukcje do poszczególnych ćwiczeń* (maszynopis).