



**РОССИЙСКО-ТАДЖИКСКИЙ
СЛАВЯНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ
ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ДЛЯ КАФЕДРЫ
ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫХ ДИСЦИПЛИН
ПО НАПРАВЛЕНИЮ
«БИОЛОГИЯ»**



ОГЛАВЛЕНИЕ

Ботаника и физиология растений

1. Осмос. Зависимость осмотического давления от концентрации	3
2. Влияние силы тяжести и центробежной силы на растения	8
3. Биохимия и физиология растений	12
3.1 Фотосинтез (измерение давления O_2)	12
3.2 Фотосинтез (метод подсчета пузырьков)	17
3.3 Тепловой эффект процесса гликолиза	21
3.4 Гликолиз (измерение давления)	25
3.5 Ионная проницаемость клеточной мембраны	32
3.6 Определение константы Михаэлиса	38
3.7 Субстратное ингибирование фермента	46
3.8 Ферментативная активность каталазы	52

Зоология и физиология животных

4. Избирательная температура насекомых	59
5. Оптомоторная реакция насекомых	62
6. Мера объема дыхания мелких животных	67

Биохимия

7. Титрование различных аминокислот с помощью прибора Cobra4	71
--	----

БОТАНИКА И ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

1. Осмос. Зависимость осмотического давления от концентрации

P1135700

Понятия, относящиеся к теме

Осмос, осмотическое давление, концентрация

Принцип работы

Осмос описывает явление движения молекул растворителя через частично проницаемую мембрану в область более высокой концентрации растворенного вещества. Таким образом, концентрация растворенного вещества выравнивается по обеим сторонам. Экспериментальная установка состоит из семи камер, которые наполнены растворами сахара различных концентраций. Столб жидкости в капиллярах определяется, и зависимость осмотического давления от концентрации можно легко продемонстрировать.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Фильтрационный штатив для 2-ух воронок	33401-88
2	Поддерживающий стержень, l = 600 мм	02037-00
1	Поддерживающий стержень, l = 750 мм	02033-00
2	Прямоугольный зажим	37697-00
1	Камера для осмоса и электрохимическая камера	35821-00
5	Дополнительная камера для осмоса/электрохимическая камера	35821-10
7	Капиллярная трубка, $d_i = 1,7$ мм, l = 450 мм	05939-00
7	Стеклянный держатель для трубки	05961-00
7	Шкала, l = 350 мм	64840-00
3	Стеклянный стакан, 250 мл, большой	36004-00
1	Ложка со шпателем, нержавеющей сталь	33398-00
1	Промывалка, 500 мл	33931-00
1	Стеклянный стержень, боро 3,3, l = 300 мм, d = 7 мм	40485-05

Количество	Наименование	Код
1	Воронка, стеклянная, диаметр верхнего отверстия 55 мм	34457-00
1	Ножницы, прямые, 180 мм	64798-00
1	Целлофан, 300x200 мм, 5 листов	32987-00
1	Набор прецизионных весов Sartorius CPA 623S	49224-88
1	Сульфат меди II, кристаллический, 250 г	30126-25
1	Дистиллированная вода, 5 л	31246-81
1	D(+) моногидрат глюкозы, 250 г	30237-25



Рис. 1

Задачи

- Исследовать явление осмоса в ходе простого модельного эксперимента
- Определить зависимость осмотического давления от концентрации растворенных молекул

Инструкции по технике безопасности

Утилизация: Растворы, которые содержат ионы тяжелых металлов, необходимо собрать в контейнер для солевых растворов тяжелых металлов. Твердые остатки, которые содержат тяжелые металлы или их ионы, также необходимо собрать в этот контейнер.

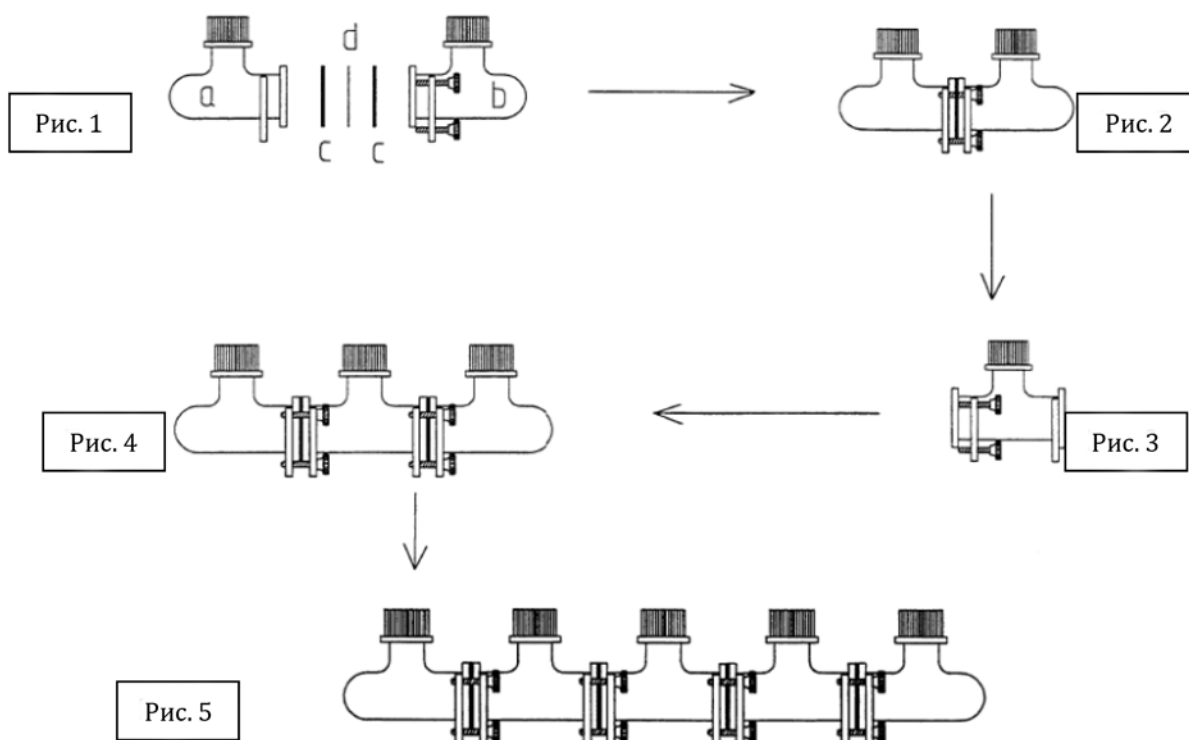
Установка

Камера для осмоса и электрохимическая камера идеально подходят для наблюдения и демонстрации осмотических процессов.

В своей простейшей форме этот аппарат из двух сегментов со стеклянными концами а и б (Рис. 1) и двух резиновых герметизирующих колец с, которые соединены с помощью держателя фланца. У каждого сегмента есть короткая стеклянная соединительная трубка с резьбой GL25, куда можно прикрутить соединительный колпачок с уплотнительным кольцом (25/8 мм). В ходе проведения осмотических экспериментов стеклянные капиллярные трубки вставляют в эти соединительные колпачки. Если подходящую полупроницаемую мембрану, сделанную, например, из целлофана, поместить между двумя уплотнительными кольцами (d, Рис. 1), а также, если скрутить две камеры вместе, включая уплотнительные кольца с мембраной, в результате получится двухкамерный аппарат, изображенный на Рис. 2.

Дополнительные камеры (Рис. 3), а также дополнительные держатели фланца, пары уплотнительных колец и мембраны можно также использовать для того, чтобы установить многокамерный аппарат (Рис. 4, 5 и 6).

Тип установки выбирается в зависимости от учебной цели. Если цель – простое наблюдение фундаментального процесса осмоса, то установки, изображенной на Рис. 2, будет вполне достаточно (основной аппарат плюс капилляры).



Однако, если целью является демонстрация зависимости осмотического давления от концентрации растворов, необходимо использовать многокамерную установку, изображенную на Рис. 5 и 6.

Мембраны сделаны из целлофана. Поскольку целлофан доступен только в крупных листах, необходимо вырезать круговую модель из тонкого картона диаметром 52 мм. Затем, можно использовать эту модель, чтобы нарисовать форму мембран на целлофановом листе с помощью водорастворимого маркера. Мембраны, изготовленные этим способом, необходимо вырезать острыми ножницами и поместить в чистую воду для набухания.

Для того чтобы закрепить мембраны в аппарате, всегда помещайте одну мембрану между двумя уплотнительными кольцами, не складывая ее, а затем, разместите эти элементы на горизонтальном фланце сегмента. Затем, прикрепите следующий сегмент с соответствующим фланцем и закрутите оба сегмента вместе с помощью держателя фланца. При соединении сегментов убедитесь, что стеклянные соединители с закручивающимися колпачками направлены в ту же сторону.

Устройство, собранное этим способом, расположено на держателях фланца. Для того чтобы зафиксировать стеклянные капилляры на месте, поддерживающую основу (от фильтрационного штатива) необходимо разделить, как показано на Рис. 6. Затем, поддерживающий стержень ($l = 600$ мм) необходимо закрепить, прежде чем прикрепить дополнительный поддерживающий стержень ($l = 750$ мм) горизонтально между двумя вертикальными поддерживающими стержнями с помощью двух прямоугольных зажимов. Этот горизонтальный поддерживающий стержень используют для удержания держателей стеклянной трубки, к которой, в свою очередь, прикреплены концы стеклянных капилляров.

Ход работы

Прежде всего, наполните сегменты, предназначенные для растворов (сегменты 2, 3 и 4 на Рис. 6). Это также обеспечивает правильное натяжение мембран. Для многокамерной установки, изображенной здесь, используют 5%, 10% и 15% растворы сульфата меди или соответствующий ряд сахарных растворов. После этого, проверьте мембраны на герметичность. Необходимо обеспечить,

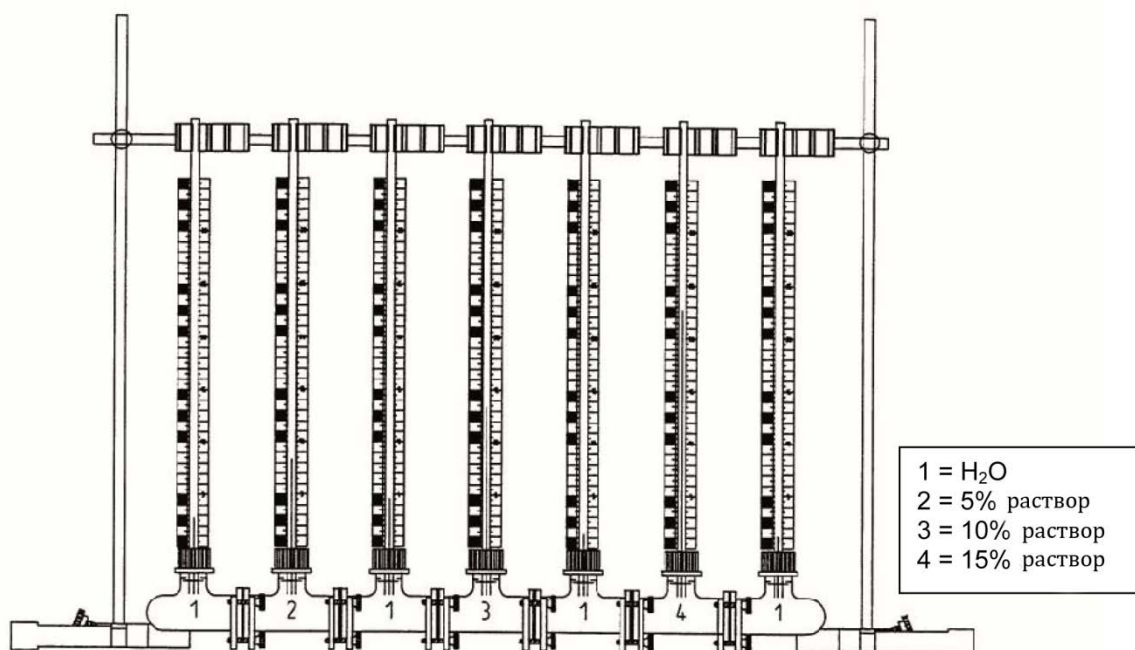


Рис. 6

чтобы ни один из растворов не мог попасть в соседние камеры!

Затем, заполните оставшиеся камеры чистой водой (сегмент 1 на Рис. 6). Растворы и вода должны достигать верхнего края стеклянных соединителей. Теперь, необходимо закрутить завинчивающиеся колпачки с уплотнительными кольцами. Вставьте капиллярные трубки в уплотнительное кольцо и протолкните их внутрь таким образом, чтобы жидкость поднялась до отметки 100 мл во всех капиллярных трубках. Затем, необходимо поместить весы под капиллярные трубки сзади. Это исходное положение можно отметить подходящим стеклянным маркером. Капиллярные трубки удерживают на месте за их верхние концы.

Теория и Оценка

Растворы в капиллярных трубках поднимаются, в то время как чистая вода – опускается. Чем выше концентрация раствора, тем быстрее он поднимается.

Примечание

Пожалуйста, обратитесь к соответствующей литературе за информацией по теории и объяснению осмоса.

Главные примечания

Это сегментное устройство предназначено не только для осмотических экспериментов, но и для экспериментов в других областях (например, электрохимии). Поскольку осмотические эксперименты вызывают интерес, это дает возможность удвоить поверхность эффективной мембраны и, таким образом, ускорить осмотический процесс, что является значительным преимуществом для демонстрационных уроков, в частности.

2. Влияние силы тяжести и центробежной силы на растения

P4050200

Понятия, относящиеся к теме

Положительный геотропизм корней, отрицательный геотропизм ростков, центробежная сила, скорость вращения, статолиты

Принцип работы и Задача

- Определить расположение ростков и корней, находящихся под влиянием центробежных сил, которые меньше, равны или больше силы тяжести.
- Вырастить саженцы подсолнуха в маленьких стаканах во вращающемся барабане. Установить разные центробежные силы посредством изменения скорости вращения двигателя барабана.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Стробоскопический барабан	65976.00
1	Вставка для стробоскопического барабана	65976.10
1	Двигатель с держателем диска	11614.00
1	Источник питания 0...12 В/2 А	13505.93
1	Соединительный шнур, $l = 750$ мм, красный, 32 А	07362.01
1	Соединительный шнур, $l = 750$ мм, синий, 32 А	07362.04
1	Поддерживающая основа, регулируемая	02001.00
1	Прямоугольный зажим (перекрестный зажим)	02043.00
2	Поддерживающий стержень, $l = 500$ мм, из нержавеющей стали	02032.00
1	Поддерживающий стержень, $l = 250$ мм, из нержавеющей стали	02031.00
10	Стеклянные стаканы, большие, 50 мл	36001.00
	Семена подсолнуха	
	Земля	
	Гониометр	

Установка

Стробоскопический барабан необходимо закрепить в одном из отверстий поддерживающей основы, а со стороны основания необходимо вставить 250 мм поддерживающие стержни (Рис. 1).

250 мм поддерживающий стержень необходимо закрепить во втором отверстии поддерживающей основы. Затем, с помощью прямоугольного зажима к этому поддерживающему стержню необходимо прикрепить двигатель таким образом, чтобы приводной ременной шкив двигателя и основа стробоскопического барабана располагались на одном уровне.

Приводной ремень необходимо установить и натянуть. Для того чтобы сохранить фиксированное расстояние между двигателем и барабаном, поддерживающие стержни, вставленные со стороны поддерживающей основы, необходимо надежно закрепить с помощью желтых рычагов.

Двигатель необходимо подключить к выходу постоянного тока источника питания с помощью соединительных шнуров. Источник питания необходимо установить на 0 В/2 А и включить.

Ход работы

В каждый из 8 стаканов, до краев заполненных землей, необходимо посадить одно семя подсолнуха. Стаканы помещают в отверстия центробежной вставки таким образом, чтобы выступ был обращен в точности по направлению к центру диска. После удаления поддерживающего стержня, который выступает из барабана, центробежную вставку вместе со стаканами помещают в барабан. Важно убедиться, что центробежная вставка расположена именно в горизонтальной плоскости.

Рис. 1: Экспериментальная установка



Напряжение источника питания регулируется таким образом, чтобы барабан совершал около 60 оборотов в минуту. Центробежное ускорение a при этой скорости вращения соответствует половине ускорения благодаря силе тяжести g . Самый простой способ определения скорости вращения – прикрепить кусок веревки к точке на краю барабана

таким образом, чтобы она соприкасалась с рукой человека, проводящего эксперимент, при каждом вращении барабана.

Семена, а точнее, саженцы подсолнуха в течение нескольких дней подвергаются воздействию ускорения в центрифуге. Поскольку во время центрифугирования почва быстро высыхает, стаканчики с землей необходимо обильно поливать хотя бы один раз в день. Когда саженцы подрастут до 3 см, эксперимент останавливается и стаканы изымаются из центробежной вставки. Угол наклона ростка в каждом стакане сразу же измеряют гониометром и записывают результаты. Также определяют положение кончика корня, что необходимо для дальнейшего определения направления роста корней.

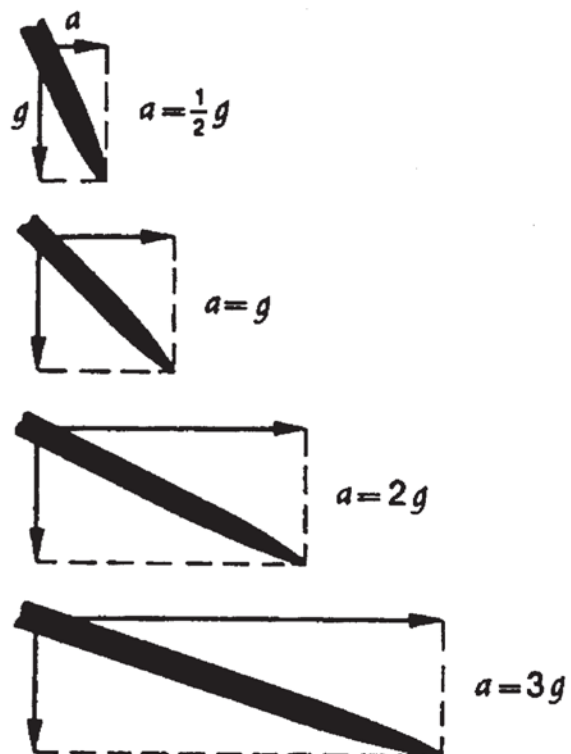
Эксперимент повторяют со скоростью барабана 85 оборотов в минуту ($= 1 g$), 120 оборотов в минуту ($= 2 g$) и 150 оборотов в минуту ($= 3 g$), используя новые саженцы для каждого эксперимента.

Результаты и оценка

Главный росток растения обычно расположен перпендикулярно относительно центра тяжести Земли (отрицательный геотропизм), в то время как главный корень растет по направлению к центру тяжести (положительный геотропизм). Однако если растение поместить на горизонтальный вращающийся диск, этот фактор изменит направление роста ростка и корня. Сила тяжести и центробежная сила, возникающая в результате вращения, очевидно, воспринимаются растениями идентично. Обе силы оказывают сжимающее воздействие на крахмальные зерна, содержащиеся в клеточной плазме. Эти зерна, вероятно, ведут себя подобно статолитам (таким же образом, как и у животных) при обнаружении воздействующей тяжести. Только те части ростка и корня, которые все еще могут расти, способны реагировать на этот раздражитель; это происходит, потому что геотропическая реакция основана на движении роста.

Ожидаемое направление роста ростка и корня рассчитываются для каждой из четырех скоростей вращения; оно определяется посредством параллелограмма сил, основанного на силе тяжести и центробежной силе (Рис. 2). Определенное направление роста ростка и корня (среднее значение восьми угловых измерений оборотов в минуту в каждом случае) практически совпадает с рассчитанным значением. Как видно из Рис. 2, с увеличением центробежного ускорения завязь растения все более склоняется по направлению к вращающемуся диску: росток направляется к центру, а корень – удаляется от центра.

Рис. 2: Направление роста корня



3. Биохимия и физиология растений

3.1 Фотосинтез (измерение давления O₂)

P1351360

Цель исследования

Представление интенсивности фотосинтеза растения путем измерения повышения давления кислорода, в белом и зеленом свете, а также в темноте.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Термодинамика» Cobra4	12638.00
1	Держатель Cobra4 с поддерживающей стойкой	12680.00
2	Разборное основание штатива	02001.00
1	Стойка, $l = 500$ mm	02032.00
2	Муфта	02043.00
1	Лапка	37715.00
1	Подъемный столик	02074.00
1	Лампа накаливания, 120 W, с рефлектором	06759.93
1	Гнездо для лампы, E27, с рефлектором	06751.01
1	Химический стакан, 1000 мл, низкий	46057.00
1	Резиновая пробка, 26/32, с отверстием 7 мм	39258.01
1	Резиновая трубка, $d = 6$ мм, 1 м	39282.00
1	Пробирка, 30x200 мм, SB 29	36294.00
1	Стеклянная трубка, $l = 80$ мм, 10 штук	36701.65
1	Стеклянная палочка, $l = 200$ мм, $d = 3$ мм	40485.01
1	Ложечка, $l = 150$ мм	33393.00
1	Глицерин, 99%, 100 мл	30084.10

Количество	Наименование	Код
1	Капельница, 50 мл, пластиковая	33920.00
1	Гидрокарбонат натрия, 250 г	30151.25
1	Тартазин (Е 102), 25 г	48498.04
1	Синий патентованный V (Е 131), 25 г	48376.04
1	Весы MXX-212R, 210 г / 0.01 г, RS232, 230 V	49111.93
1	Программное обеспечение Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
	Компьютер с USB-портом, Windows XP или выше	
	Алюминиевая фольга	
	Элодея (<i>Elodea canadensis</i>)	
	Дистиллированная вода	

Установка и ход работы



Рис. 1: Установка

Соберите установку (Рис. 1).

Вставьте лампу в одно отверстие основания штатива с одной стороны.

Прикрепите беспроводной измерительный блок Cobra4 с сенсорным блоком «Термодинамика» Cobra4 к держателю другой стойки.

Поместите пробирку с лапкой и муфту ниже термодинамического модуля Cobra4. Ввинтите стеклянную трубку в резиновую пробку с помощью некоторого количества глицерина. При помощи как можно более короткой резиновой трубки присоедините датчик давления сенсорного блока к стеклянной трубке.

Поставьте наполненный водой стакан между лампой и пробиркой. Он будет играть роль теплового фильтра.

Вставьте беспроводной USB-адаптер Cobra4 в USB порт ПК.

Запустите программу “Measure Cobra4”. Она автоматически определит измерительный прибор.



Рис. 2: Параметры измерения

Настройте значения как показано на Рис. 2 или просто откройте эксперимент “Photosynthesis (measurement of the O₂ pressure)” (Experiment > Open experiment...). Программа установит все необходимые параметры для записи данных.

Опыт 1:

Отрежьте стебель элодеи и поместите его в пробирку срезом вверх. Приготовьте 300 мл 3 % раствора NaHCO₃ (9 г на 300 г дистиллированной воды) и наполните пробирку немного ниже ободка. Стакан с водой поглощает тепло лампы.

Герметично закройте пробирку пробкой и подсоедините резиновую трубку к модулю давления. *Внимание: Убедитесь, что жидкость не проникает в сенсорный блок «Термодинамика» Cobra4.*

Когда подсоединяете резиновую трубку, не нажимайте на неё слишком сильно -- слишком большое давление будет влиять на результаты измерений. Совет: Когда

подсоедините трубку, сожмите её слегка, так чтобы измеренное давление приблизительно соответствовало атмосферному. Немного подождите, пока показания стабилизируются.

Включите лампу и запустите измерения. Проводите их не менее пяти минут.

Опыт 2:

Приготовьте зеленый раствор с красителями. Для этого в стакан 1000 мл добавьте на кончике шпателя желтые и зеленые красители и налейте примерно 1000 мл воды. Снимите пробку перед измерением для того чтобы позволить образовавшемуся газу улечься. Повторите измерения, как в опыте 1.

Опыт 3:

Заверните пробирку полностью в алюминиевую фольгу, так чтобы свет не мог проникнуть к растению. Перед измерением позвольте газу, который образовался, улечься. Повторите измерения, как в опыте 1.

Наблюдения и результаты

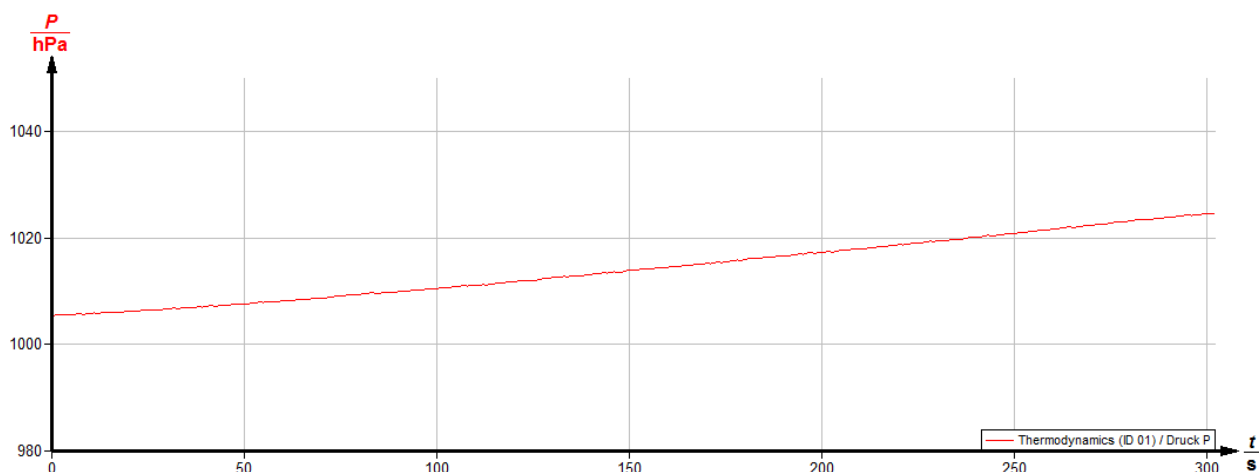


Рис. 3: Результаты измерения в белом свете

Первый эксперимент показывает явное повышение графика давления, которое обусловлено образованием кислорода (Рис. 3).

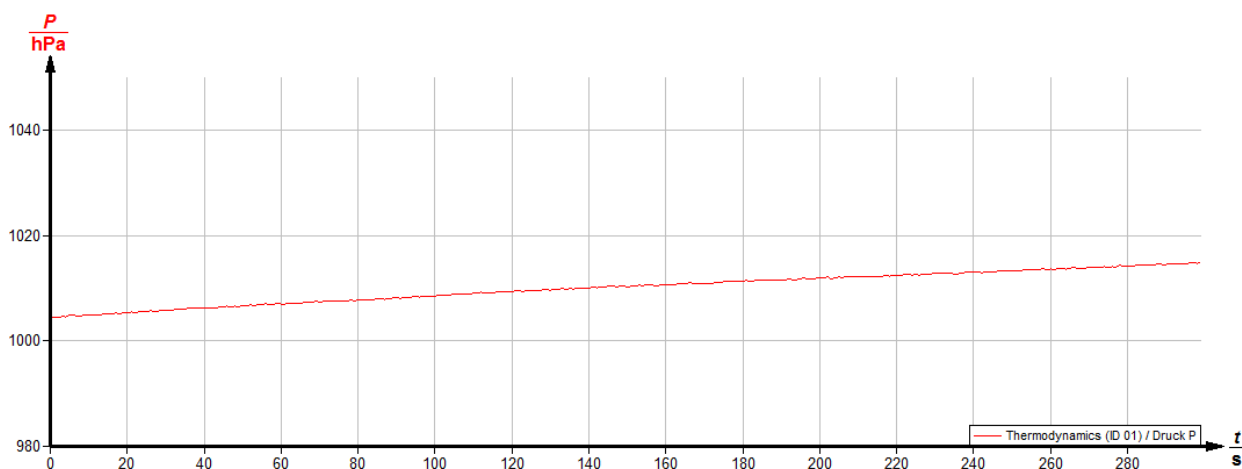


Рис. 4: Результаты измерения в зеленом свете

Во втором эксперименте, график давления поднимается менее четко (Рис. 4).

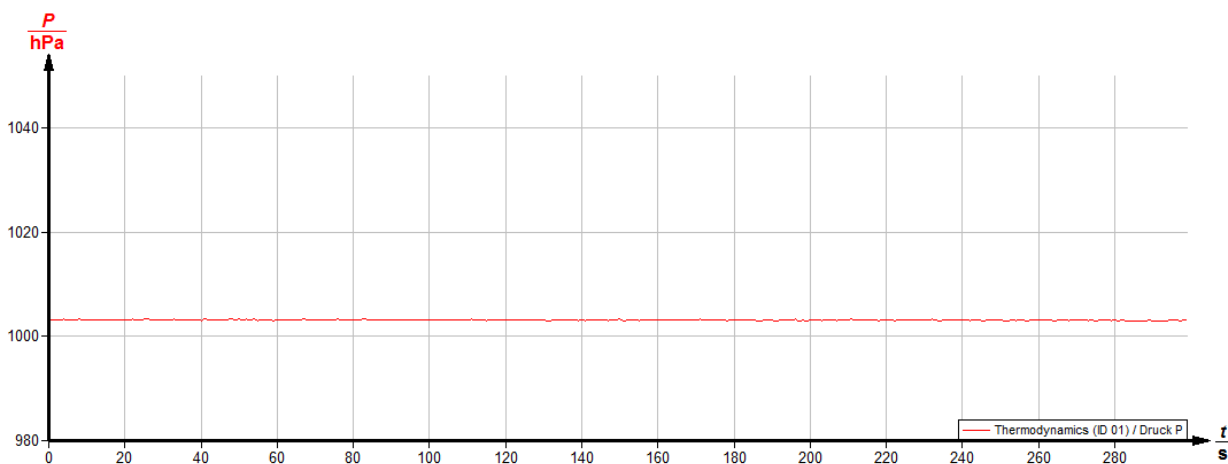


Рис. 5: Результаты измерения в темноте

В ходе эксперимента график давления не поднимается вообще (Рис. 5).

Примечания

Фотосинтез приводит к образованию O_2 , который в свою очередь вызывает увеличение давления. Разлагаясь, $NaHCO_3$ выступает как донор CO_2 .

Зеленый раствор поглощает большую часть красного и сине-фиолетового света, который необходим для фотосинтеза. Поэтому образуется меньше кислорода, который приводит к более слабому росту графика давления.

Фотосинтез не идет в темноте. Поэтому график давления не растет совсем.

3.2 Фотосинтез (метод подсчета пузырьков)

P1360860

Цель исследования

Измерение скорости фотосинтеза в зависимости от интенсивности света путем подсчета пузырьков кислорода, выделяемых водным растением.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Погода» Cobra4	12670.00
1	Держатель Cobra4 с поддерживающей стойкой	12680.00
2	Разборное основание штатива	02001.00
1	Стойка, $l = 250 \text{ mm}$	02031.00
1	Муфта	02043.00
1	Подъемный столик	02074.00
1	Лампа накаливания, 120 W, с рефлектором	06759.93
1	Гнездо для лампы, E27, с рефлектором	06751.01
1	Химический стакан, 1000 ml, низкий	46057.00
1	Химический стакан, 250 ml, высокий	46027.00
1	Программное обеспечение для Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
	Компьютер с USB-портом, Windows XP или выше	
	Элодея (<i>Elodea canadensis</i>)	
	Минеральная вода (сильно газированная)	

Установка и ход работы

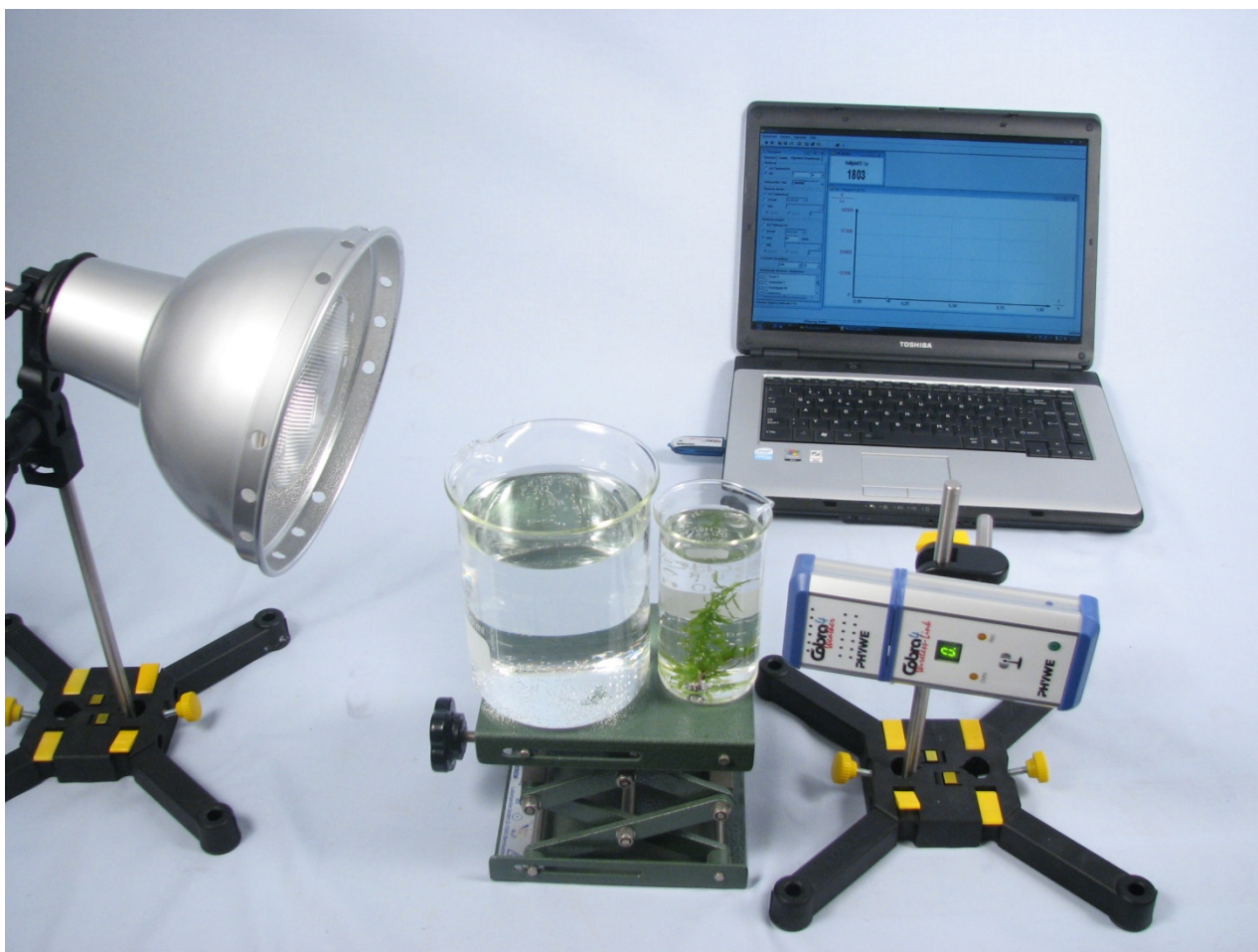


Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

Вставьте основание штатива.

Закрепите беспроводной измерительный блок Cobra4 с сенсорным блоком «Погода» Cobra4 горизонтально на другом штативе. Сенсорный блок должен быть обращен к лампе. В начале, расстояние между лампой и сенсорным блоком должно быть около 1.5 м.

Налейте в химический стакан на 250 мл минеральную воду и поставьте на подъемный столик между лампой и модулем «Погода» Cobra4.

Поставьте наполненный водой стакан на 1000 мл между лампой и стаканом на 250 мл. Он будет играть роль теплового фильтра.

Вставьте беспроводной USB-адаптер Cobra4 в USB порт ПК.

Запустите программу «Measure Cobra4». Она автоматически определит измерительный прибор.



Рис. 2: Параметры измерения

Настройте измерительные параметры, как показано на Рис. 2, или просто откройте эксперимент “Photosynthesis (bubble counting method)” (Experiment > Open experiment...). Программа установит все необходимые параметры для записи данных.

Методика

Срежьте стебель элодеи и поместите в стакан на 250 мл срезом наверх. Прикрепите грузик к растению, чтобы оно не плавало свободно. Это творческий процесс. Мы, например, использовали скрепку для бумаги и маленький болт для большего веса.

Сначала поднимаются пузырьки углекислого газа из стебля, и вода сильно пузырится (убедитесь, что стакан не загрязнен!). Поэтому измерения следует начинать через некоторое время.

Затем, в течение одной минуты посчитайте кислородные пузырьки на кончике стебля и значение запишите на листе бумаги. Там же отметьте значение освещенности в люксах.

Придвиньте лампу на 10 – 15 см к объекту и подождите около минуты, чтобы растение адаптировалось к новым условиям, посчитайте количество пузырьков. Повторяйте описанные выше измерения до тех пор, пока лампа находится перед стаканом на 1000 мл. Внимание: измерения следует проводить как можно быстрее, потому что минеральная вода теряет CO₂. Если количество пузырьков уменьшается при увеличении интенсивности света, минеральную воду следует заменить.

После окончания измерения постройте в программе «Measure» зависимость числа пузырьков от интенсивности света. Для этого выберите в меню раздел “Measurement” > “Enter data manually”. В столбце “X-Data” введите значения интенсивности света в люксах (“E/lx”) в в. В столбце “Measurement channels” введите посчитанное количество пузырьков в “Number of bubbles/min” в разделе. Примерный график показан на Рис. 3.

Наблюдения и результаты

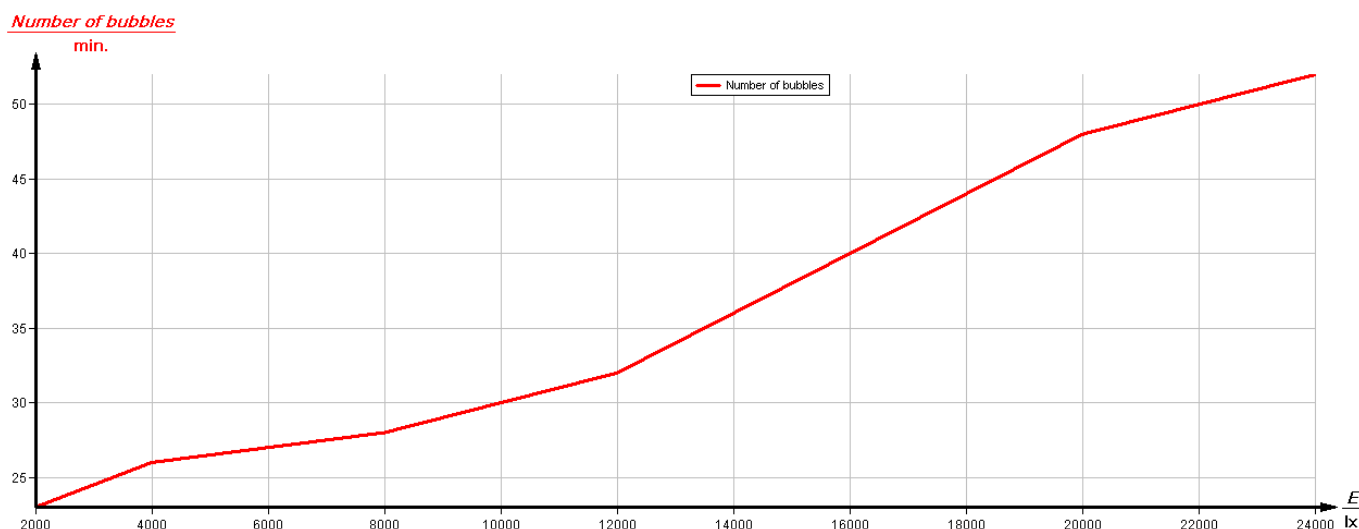


Рис. 3: Результат измерений

Скорость фотосинтеза, которая измеряется по количеству образовавшегося кислорода, увеличивается почти линейно, как функция от интенсивности света. Это связано с тем, что в условиях недостатка освещения, свет является лимитирующим фактором для фотосинтеза (Рис. 3).

Примечания

Когда интенсивность света выше (например, когда лампа находится близко к элодее), другие факторы, например доступный углекислый газ, являются лимитирующими. В этом случае, скорость фотосинтеза не повышается линейно в зависимости от интенсивности света, а стремится к величине насыщения.

Чтобы убедиться, что количество углекислого газа влияет на скорость фотосинтеза, повторите тот же опыт, уменьшив концентрацию углекислого газа. Для этого можно, например, взять водопроводную воду вместо минеральной.

3.3 Тепловой эффект процесса гликолиза

P1351460

Цель исследования

Определить тепловой эффект сбраживания сахара дрожжевыми клетками.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Термодинамика» Cobra4	12638.00
2	Погружной термометр NiCr-Ni, -50...1000°C	13615.03
1	Весы MXX-212R, 210 г / 0.01 г, RS232, 230 V	49111.93
2	Резиновая пробка, d=41/34 мм, 2 ho	64841.00
2	Термос, 500 мл	39261.02
1	Химический стакан, низкий, BORO 3.3, 1000 мл	46057.00
1	Программное обеспечение Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Свежие пекарские дрожжи, кубик	
1	Сахар-рафинад, 100г	
1	ПК с USB портом, Windows XP или выше	

Установка



Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1: Вставьте Сенсорный блок «Термодинамика» в беспроводной измерительный блок и воткните беспроводной USB адаптер в USB порт компьютера.

Методика

Из-под ОС «Windows» Запустите программу «*Measure Cobra4*».

Включите беспроводной измерительный блок, для того чтобы беспроводной USB адаптер распознал его.

Загрузите эксперимент «Glycolysis (measurement of temperature)» (меню Experiment > Open experiment...). Программа откроет все окна измерения и загрузит все необходимые параметры для записи измерений.

Если два погружных термометра показывают разную температуру, то их необходимо откалибровать. Для этого погрузите их в смесь воды со льдом и выставьте значение температуры равным 0.

В химическом стакане емкостью 1000 мл приготовьте 10% раствор сахара в воде с температурой 40°C

Налейте в два сосуда Дьюара (термосы) одинаковое количество раствора сахара. В один из сосудов добавьте 25 грамм дрожжей, небольшими порциями, одновременно перемешивая стеклянной палочкой.

Заткните термосы резиновыми пробками и опустите погружные термометры в отверстия (Рис. 1)

Начните запись (●).

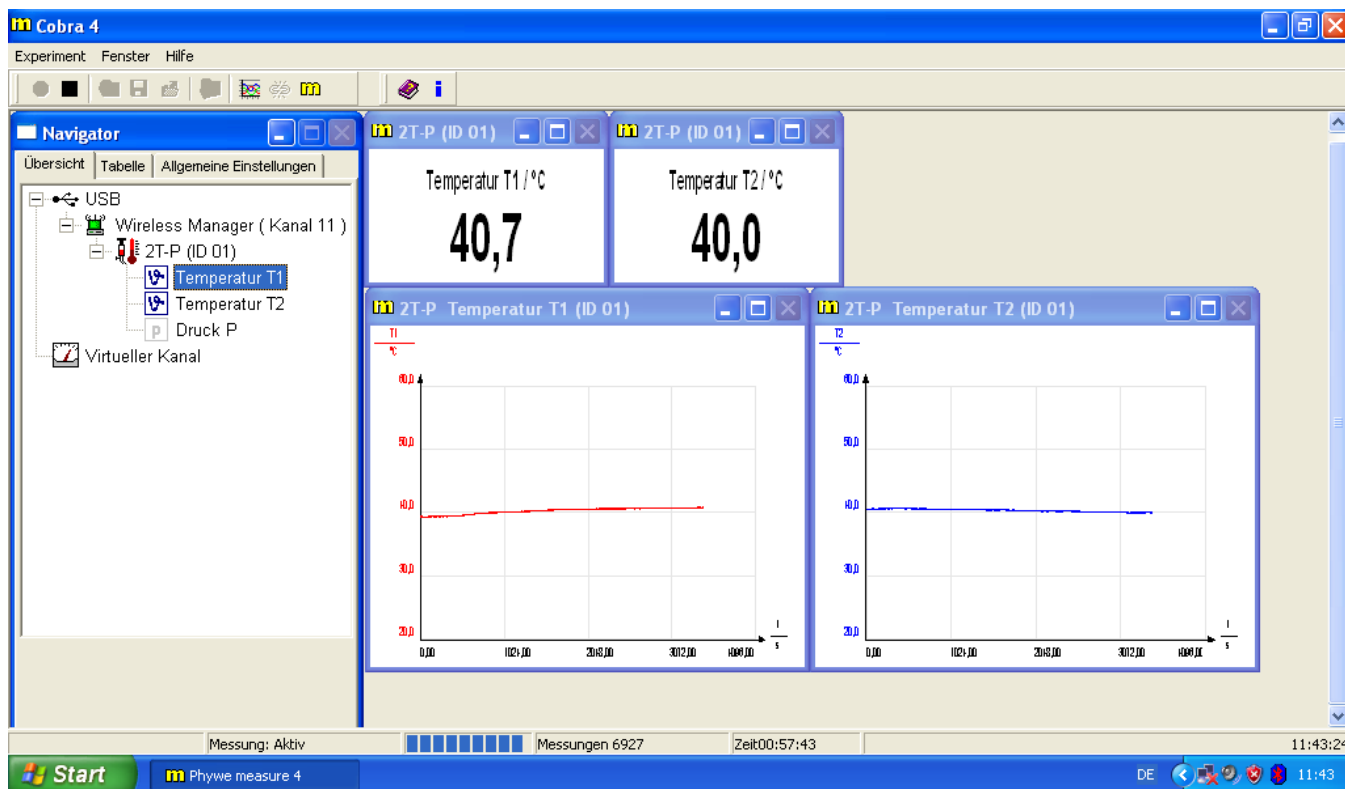


Рис. 2: программа «Measure Cobra4» во время измерения

Результаты

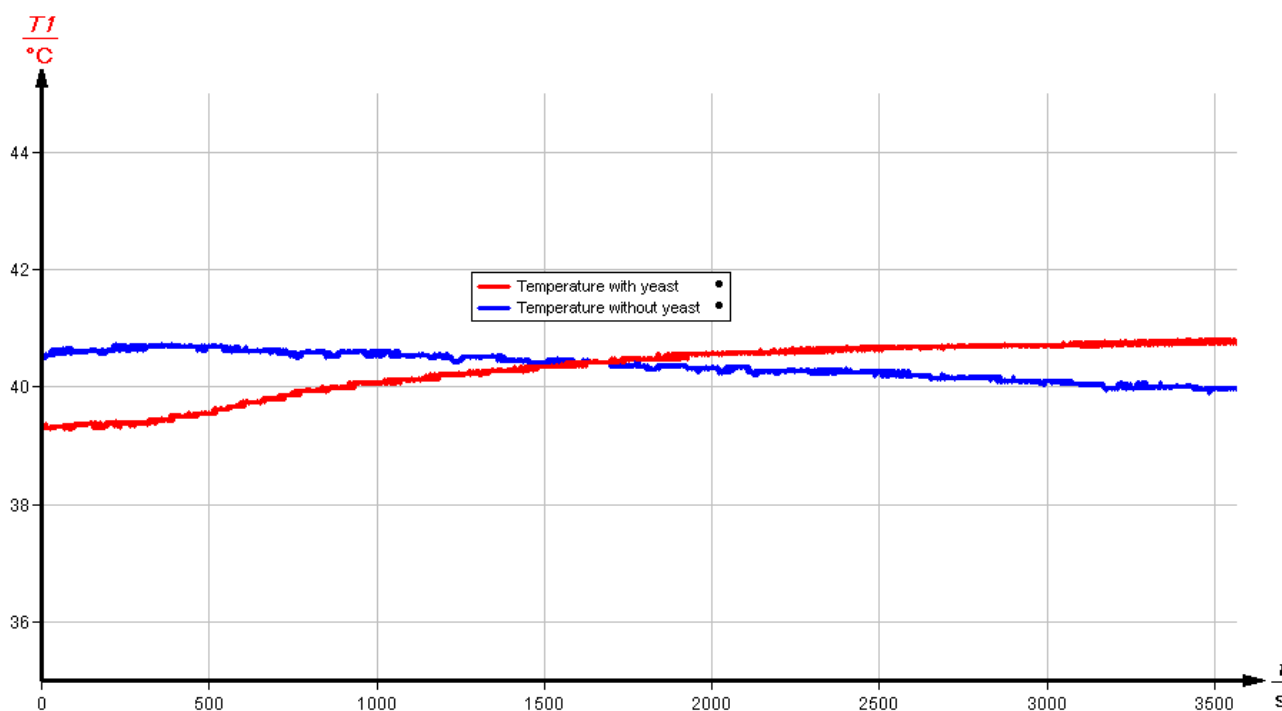


Рис. 3: Типичная зависимость температуры от времени. Красный – с дрожжами, синий – без дрожжей

Когда раствор сахара разлили по сосудам Дьюара, температура растворов в сосудах была одинаковой. После того, как в один из растворов добавили дрожжи, он немного остыл. (Рис. 3). В ходе измерений сахарный раствор без дрожжей остывал, а раствор с дрожжами нагревался в результате экзотермической реакции гликолиза.

Если проводить измерения в течение долгого времени, то можно увидеть, что через несколько часов дрожжевая суспензия начинает остывать.

Примечания

Дрожжевые клетки не используют полностью энергию, выделяющуюся при дыхании. Часть теряется в виде тепла. Температура начинает медленно падать только после нескольких часов, необходимых для полного сбраживания сахара. В сосуде Дьюара, который не содержит дрожжей, температура падает с самого начала.

Подобным образом можно изучать разные обменные процессы и явления, такие как гликолиз, брожение, аэробное и анаэробное дыхание, эффект Пастера и другие.



Рис. 4: Образование пены во время выделения CO_2

3.4 Гликолиз (измерение давления)

P1360969

Цель исследования

Доказать наличие гликолиза измеряя давление выделяющегося CO₂ в различных условия (температура, pH).

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Термодинамика» Cobra4	12638.00
1	Держатель Cobra4 с поддерживающей стойкой	12680.00
1	Разборное основание штатива	02001.00
1	Стойка, $l = 500$ мм	02032.00
2	Муфта	02043.00
1	Лапка с прокладкой	37716.00
1	Магнитная мешалка, мини	47334.93
1	Якорь для магнитной мешалки, $l = 50$ мм	46299.03
1	Коническая колба, 250 мл, SB 29	36424.00
2	Химический стакан, 250 мл, высокий	46027.00
1	Химический стакан, 1000 мл, низкий	46057.00
1	Мерная пипетка, 10 мл	36600.00
1	Резиновая пробка, 26/32, 7 мм отверстие	39258.01
1	Резиновая пробка, 26/32, 7 мм отверстие	39282.00
1	Стеклянная трубка, $l = 80$ мм, $d_i = 8$ мм, 10 штук	36701.65
1	Горелка Бунзена, природный газ	32165.05
1	Трубка для газа, 1 м	39281.10
2	Хомут шланга, $d = 8...12$ мм	40996.01

Количество	Наименование	Код
1	Тренога	33299.00
1	Проволочная сетка	33287.03
1	Стеклянная палочка, $l = 200$ мм, $d = 3$ мм	40485.01
1	Лабораторный термометр, $-10...100^{\circ}\text{C}$	47040.00
1	Таблетка буферного раствора, pH 4.00, 100 шт.	30281.10
1	Таблетка буферного раствора, pH 10.00, 100 шт.	30283.10
1	Глицерин, 100 мл	48159.04
1	Капельница, 50 мл, пластмассовая	33920.00
1	Весы MXX-212R, 210 г / 0.01 г, RS232, 230 В	49111.93
1	Программное обеспечение для Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
	ПК с USB портом, Windows XP или выше	
	Виноградный сок	
	Свежие пекарские дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
	Кубики льда	

Установка



Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

Закрепите беспроводной измерительный блок Cobra4 с сенсорным блоком «Термодинамика» Cobra4 на стойке штатива.

Поставьте коническую колбу на магнитную мешалку и опустите ниже модуль давления с помощью лапки и муфты. Смажьте стеклянную трубку глицерином и ввинтите её в резиновую. При помощи как можно более короткой резиновой трубки присоедините сенсорный блок «Термодинамика» к стеклянной трубке.

Вставьте беспроводной адаптер Cobra4 в порт USB ПК.

Запустите программу «Measure Cobra4». Она автоматически определит измерительный прибор.

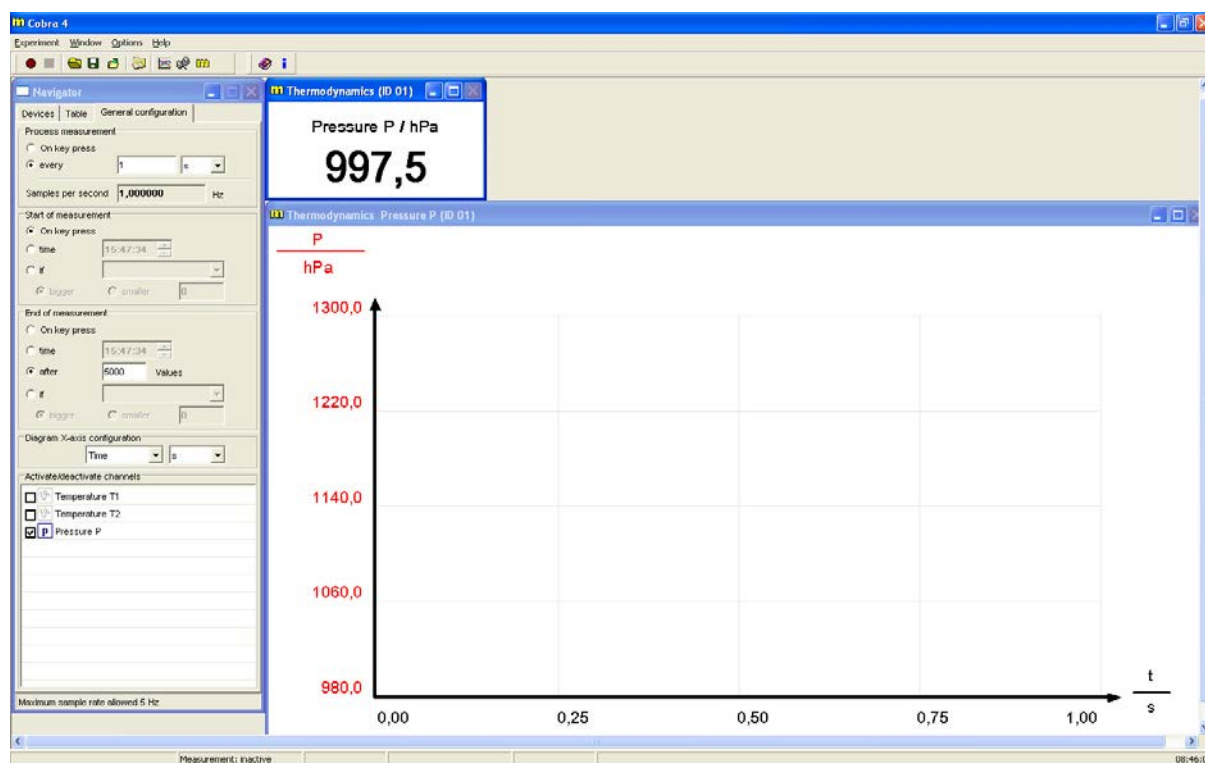


Рис. 2: Параметры измерения

Настройте измерительные параметры, как показано на Рис. 2, или просто откройте эксперимент “Glycolysis (pressure measurement)” (Experiment > Open experiment...). Программа установит все необходимые параметры для записи данных.

Методика

Опыт 1:

Нагрейте 150 мл виноградного сока до 30-35°C при помощи горелки Бунзена.

Взвесьте 10 г пекарских дрожжей и перенесите в химический стакан на 250 мл. Налейте до отметки 100 мл теплой водопроводной воды, перемешайте стеклянной палочкой.

В коническую колбу на 250 мл налейте подогретый виноградный сок и 10 мл суспензии дрожжей. Погрузите в колбу якорь для магнитной мешалки.

Заткните коническую колбу резиновой пробкой, поставьте на магнитную мешалку. Закрепите колбу на месте с помощью лапки. Установите низкую скорость перемешивания и подключите сенсорный блок «Термодинамика». Убедитесь, что воздухозаборный штуцер сенсорного блока находится выше колбы.

Запустите измерения на 5000 секунд.

Опыт 2: (выполняйте так же, как опыт 1)

В химический стакан на 1000 мл налейте до половины воды. Поставьте коническую колбу с виноградным соком и дрожжами в этот стакан и добавьте несколько кубиков льда. Заткните коническую колбу пробкой. Запустите измерения на 5000 секунд.

Опыт 3: (выполняйте аналогично, как в опыте 1)

В химический стакан на 1000 мл налейте до половины горячей воды из под крана (попробуйте разные температуры, например 50/70/90°C).

Поставьте коническую колбу с соком и дрожжами в стакан, заткните пробкой. Запустите измерения на 5000 секунд.

Опыт 4: (выполняйте аналогично, как в опыте 1)

Добавьте в коническую колбу с соком и дрожжами различные буферные растворы (например, 20 мл буферного раствора с рН 4.01 или с рН 10.01). Для этого растворите таблетку буферного раствора в 20 мл воды.

Заткните коническую колбу пробкой. Запустите измерения на 5000 секунд.

Наблюдения и результаты

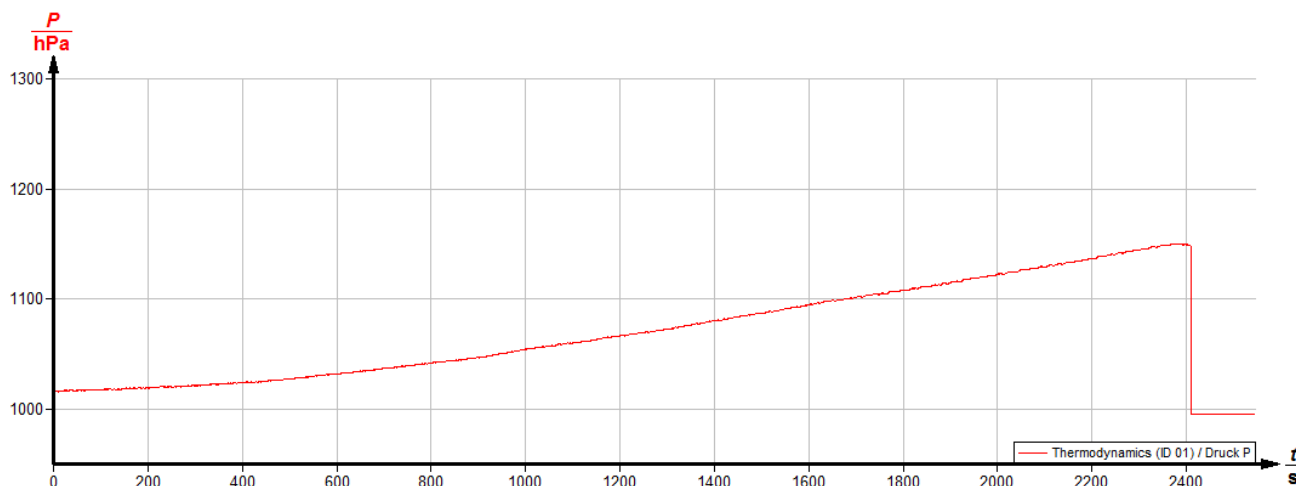


Рис. 3: Результаты измерения при комнатной температуре

Опыт 1 (нормальные условия): График значительно поднимается. После 40 минут при давлении около 1150 гПа резиновую пробку выбило из конической колбы (Рис. 3).

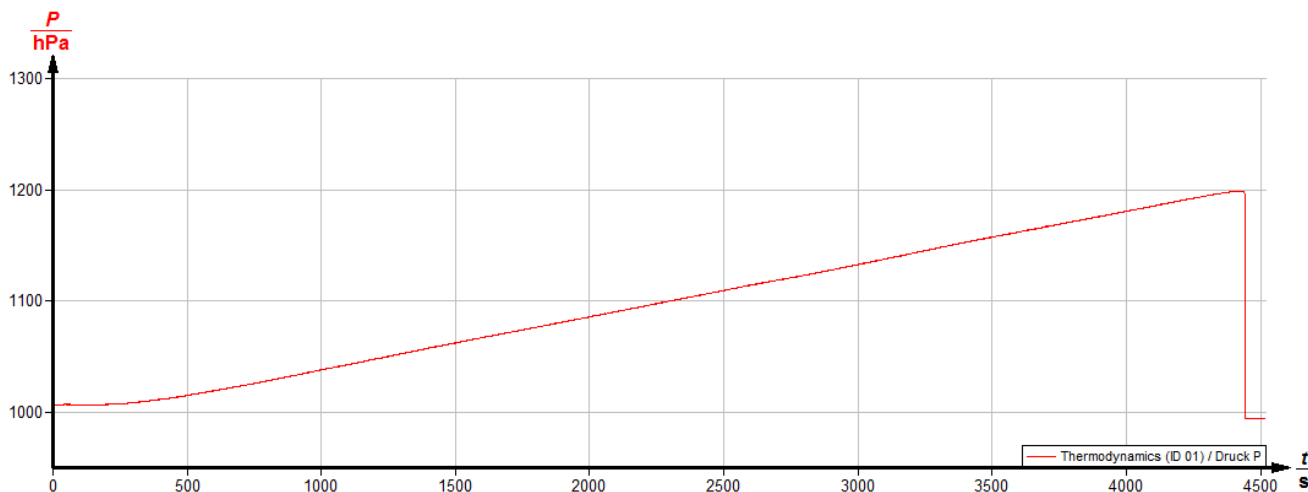


Рис. 4: Результаты измерения при низкой температуре

Опыт 2 (низкая температура): В начале давление поднимается незначительно. Затем скорость её роста увеличивается более сильно, но не столь выражено, как при комнатной температуре. После 74 минут при давлении около 1200 гПа, резиновую пробку выбило из конической колбы (Рис. 4).

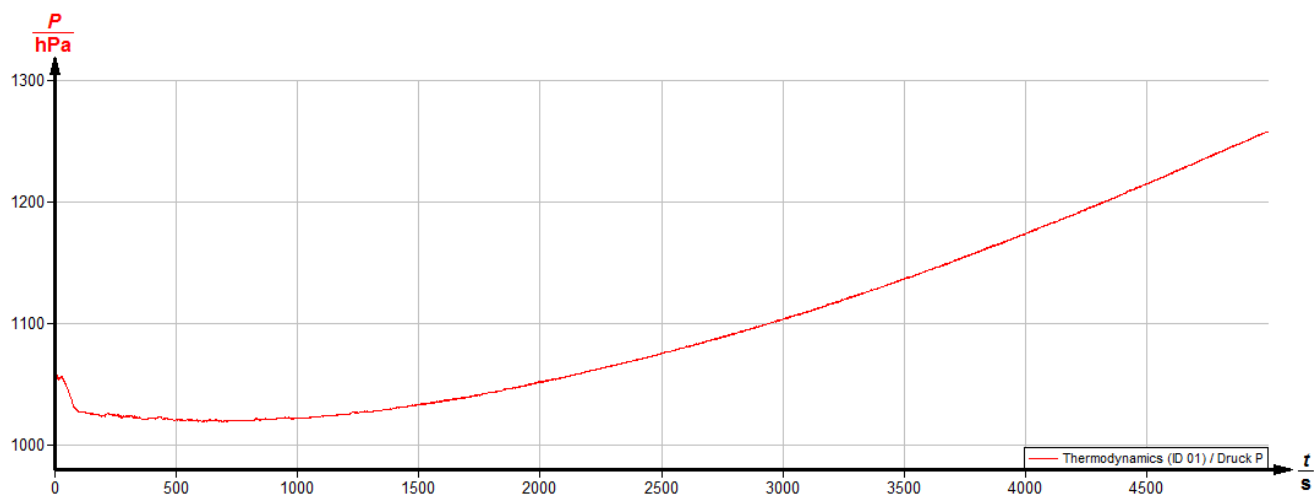


Рис. 5: Результаты измерения при 70°C

Опыт 3 (повышенная температура): В начале, кривая понижается, примерно до 17й минуты выравнивается и после резко идет вверх (Рис. 5).

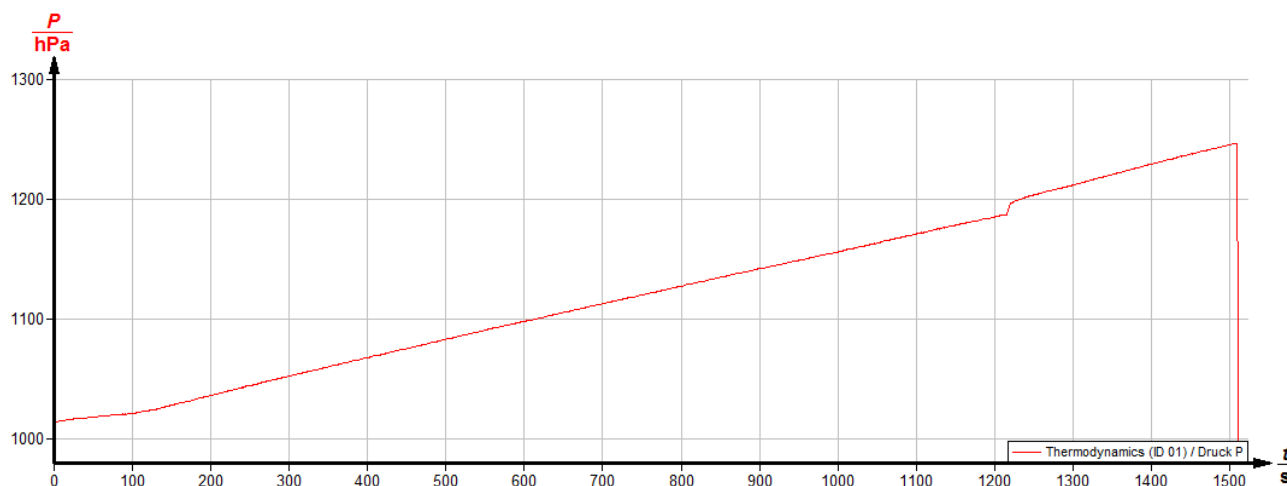


Рис. 6: Результаты измерения при добавлении кислого буферного раствора

Опыт 4 (пониженное pH питательной среды): Кривая резко поднимается вверх, после 25 минут резиновую трубку выбивает из конической колбы, при давлении примерно 1250 гПа (Рис. 6).

Примечания

Для того чтобы продемонстрировать влияние различных условий, необязательно ждать когда пробку выбьет из колбы в каждом опыте, достаточно 5 минут (лучше 10 минут) измерений.

Опыт 1: Дрожжи сбраживают сахар. В этом процессе глюкоза виноградного сока подвергается гликолизу. При гликолизе одна молекула глюкозы превращается в две молекулы пирувата через десять ферментно-каталитических реакций. Побочным продуктом реакции является CO_2 .

Опыт 2: Под действием холода метаболизм дрожжей понижается. Это хорошо видно в начале опыта—углекислый газ едва выделяется. Когда лед тает, температура медленно повышается и начинает образовываться CO_2 . Этот опыт показывает, что скорость гликолиза зависит от температуры (Рис. 4).

Опыт 3: Если температура слишком высокая, метаболизм дрожжей полностью прекращается. При длительной температуре в 45°C либо погибают дрожжи, либо инактивируются ферменты, участвующие в гликолизе. С другой стороны, при оптимальных температурах (около 32°C) ферменты активируются, что вызывает усиление метаболизма.

Опыт 4: Оптимальным диапазоном pH для дрожжей является 3,8 - 5,2. Поэтому при добавлении кислого буферного раствора метаболизм усиливается. Если добавить щелочной буферный раствор, условия не будут оптимальными для дрожжей. В результате метаболизм ослабнет.

3.5 Ионная проницаемость клеточной мембраны

P1369760

Цель исследования

Клеточная мембрана контролирует как транспорт питательных веществ и воды внутрь клетки, так и транспорт продуктов жизнедеятельности и воды из клетки. Транспорт бывает пассивным (вещества диффундируют через мембрану за счёт теплового движения), и активным (специальные транспортные системы в мембране «протаскивают» вещества через неё с затратой энергии. Целью данного эксперимента является изучение селективной проницаемости искусственной мембраны (диализной трубки) ионами H^+ и OH^- .

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	
1	Сенсорный блок Cobra4 «pH», «BNC конектор»	
1	Программное обеспечение для Cobra4	
1	pH электрод гелевый, , разъём BNC	
1	Магнитная мешалка, мини, без подогрева	
1	Якорь для магнитной мешалки, $l = 30$ мм	
1	Стержень для извлечения магнитных якорей	
1	Штатив со стойкой, $l = 750$ мм	
2	Муфта	
2	Лапка	
1	Мерный цилиндр, 25 мл	
1	Воронка, $d = 55$ мм	
1	Промывалка, 500 мл, пластик	
2	Химический стакан, 250 мл, высокий	
2	Химический стакан, 50 мл, высокий	
1	Диализная трубка, $d = 24$ мм, 1 м	

Количество	Наименование	Код
2	Зажим для диализной трубки	
1	Одноразовые перчатки, средние, латекс	
1	Таблетка буферного раствора, рН 4.00	
1	Таблетка буферного раствора, рН 10.00	
1	Соляная кислота 1 моль/л, 1 л	
1	Гидроксид натрия 1 моль/л, 1 л	
1	Дистиллированная вода, 5 л	

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
1	ПК с USB портом, Windows XP или выше	

Меры безопасности



В зависимости от концентрации растворы гидроксида натрия оказывают сильное разъедающее или раздражающее действие на кожу, глаза и слизистые оболочки. Пары гидроксида натрия раздражают органы дыхания. Химические ожоги вызывают разрушение тканей и сильную боль. Хранить вдали от детей.

В зависимости от концентрации соляная кислота оказывает сильное разъедающее или раздражающее действие. Пары соляной кислоты раздражают органы дыхания, в частности слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Концентрированные кислоты разрушают кожу и ткани.

Не дышите парами и туманом соляной кислоты. Избегайте её контакта с кожей. Надевайте соответствующую защитную одежду, перчатки и защитные очки при работе с этими веществами.

Первая помощь: При попадании этих веществ на кожу, немедленно промойте её большим количеством воды. Если попадает в глаза, немедленно промойте большим количеством воды, держа их открытыми. В случае травмы глаза немедленно обратитесь за медицинской помощью. Если произошел несчастный случай или больной плохо себя чувствует, немедленно обратитесь за медицинской помощью. В случае вдыхания паров обеспечить доступ свежего воздуха и поддерживать дыхательные пути чистыми. Если дыхание затруднено, транспортируйте пострадавшего в полусидящем положении к врачу.

Утилизация: Разбавьте раствор водой, нейтрализуйте гидрокарбонатом натрия до pH 6-8 и слейте в раковину под сильным напором воды.

Подготовка

Приготовление искусственной клетки (камера из диализной трубки):

От диализной трубки отрежьте два куска примерно 15 см и скрепите один конец с помощью диализного зажима. Получится диализный пакет. *Совет:* Если диализную трубку сложно открыть, увлажните ее несколько раз дистиллированной водой.

Следующую операцию проводить в защитных очках и перчатках

Положите один диализный пакет в химический стакан на 250 мл и добавьте в него с помощью мерного цилиндра 15 мл соляной кислоты (1 моль/л). Затем запечатайте пакет вторым диализным зажимом, обмойте снаружи дистиллированной водой и положите на чистую поверхность.

Помойте химический стакан на 250 мл. Заполните таким же способом второй пакет раствором гидроксида натрия (1 моль/л). Убедитесь, что два пакета не касаются друг друга.

Установка и Ход работы

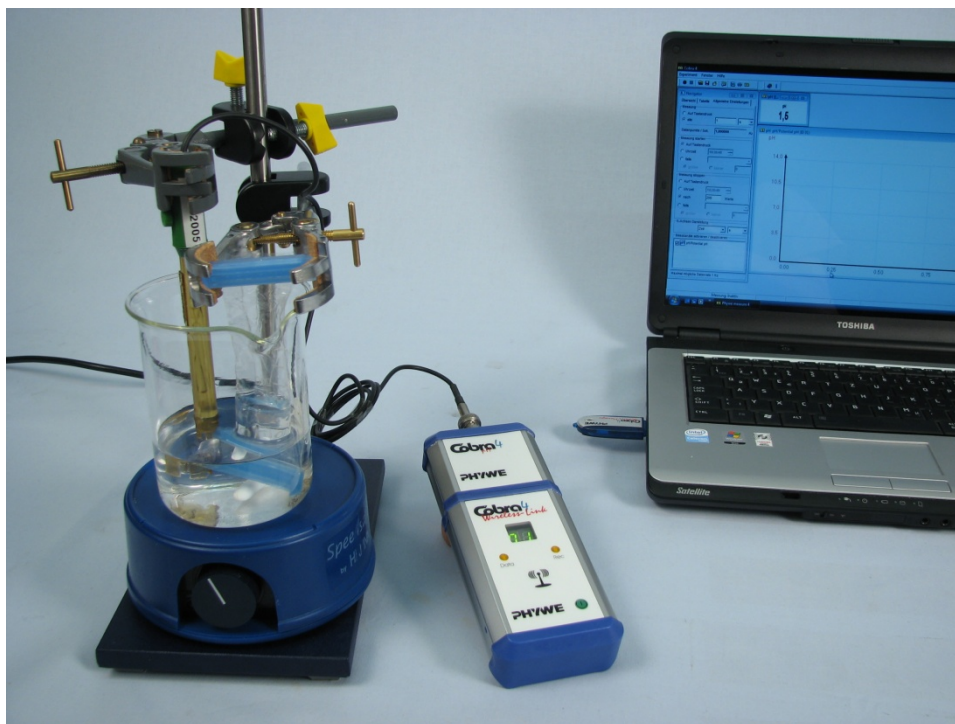


Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

Подключите pH электрод в соответствующий разъем сенсорного блока «pH» Cobra4.

Воткните беспроводной USB-адаптер в USB порт ПК.

Запустите программу “Measure Cobra4”. Она автоматически определит измерительный прибор.

Настройте значения, как показано на Рис. 2. Откройте в меню команду “Navigator”, выберите вкладку <General configuration> и в разделе <End of measurement> поставьте длительность измерения 200 с. Щелкните правой кнопкой мыши на диаграмме и в разделе <Display options> установите pH 1-12. Вместо этого вы можете просто загрузить

эксперимент “Ionic permeability of the cell membrane” (Experiment > Open experiment...).

Программное обеспечение загрузит все необходимые параметры для записи измерений.

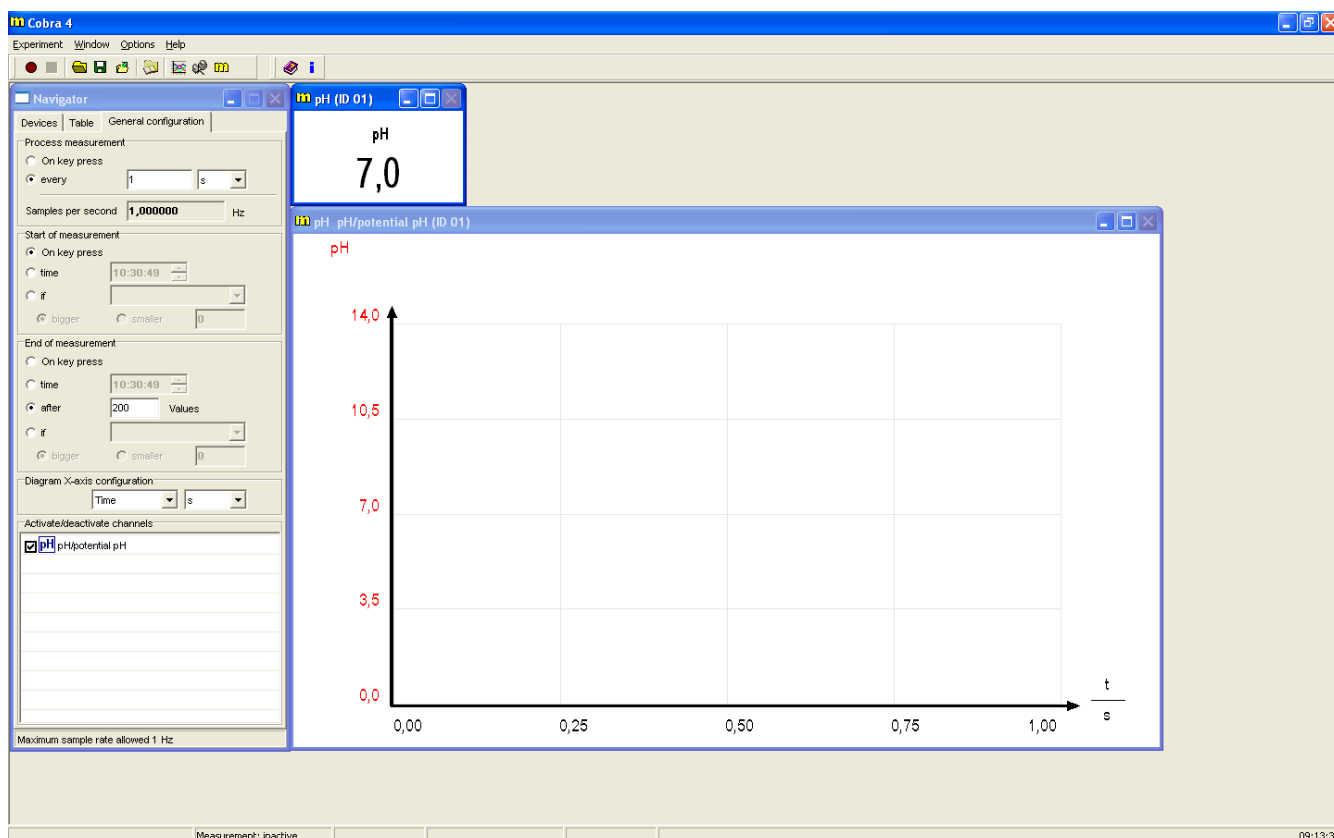


Рис. 2: Параметры измерения

При необходимости откалибруйте рН электрод. Для этого в два химических стакана на 50 мл налейте два буферных раствора и в окне <Channel рН / potential рН> выберете <Calibration>. Если электрод был недавно откалиброван, повторная калибровка не требуется (система автоматически сохраняет данные калибрования).

Закрепите лапку с муфтой на стойке штатива.

В химический стакан на 250 мл погрузите якорь магнитной мешалки, добавьте примерно 150 мл дистиллированной воды и поставьте стакан на магнитную мешалку.

Закрепите рН электрод в лапке установки так, что бы он был полностью погружен в дистиллированную воду.

Установите среднюю скорость на магнитной мешалке. (*Осторожно*: якорь для магнитной мешалки не должен задевать рН электрод!)

Начните измерения.

Закрепите диализную сумку с соляной кислотой на второй лапке. Примерно через 20 секунд после начала измерений опустите её в стакан с дистиллированной водой и рН-электродом.

Время после начала реакции можно увидеть на экране. Измерение автоматически остановится после 200 с.

После измерения, данные могут быть сохранены с помощью опции в окне <Data processing>.

Тщательно помойте дистиллированной водой стакан, рН электрод и якорь для магнитной мешалки. Повторите измерения аналогичным образом для диализного пакета с раствором гидроксида натрия.

Результаты и их обсуждение

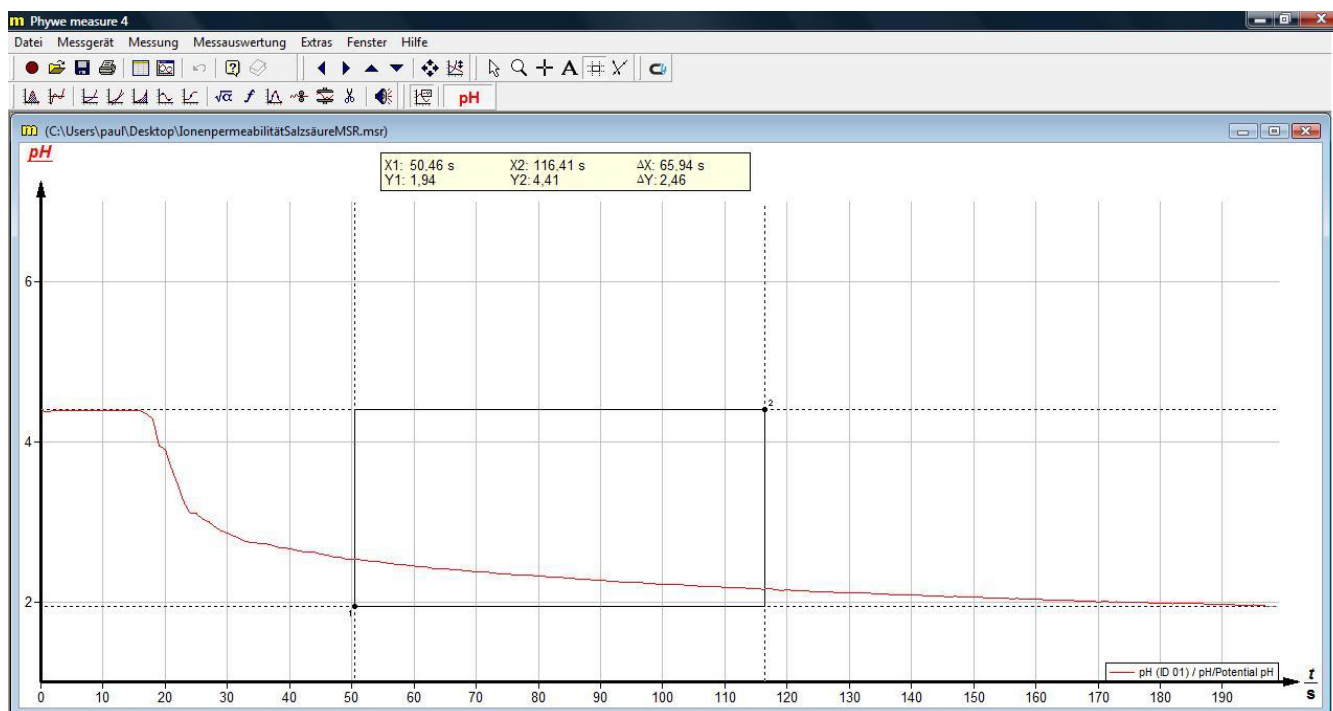


Рис. 3: Кривая зависимости рН от времени при выходе ионов H^+

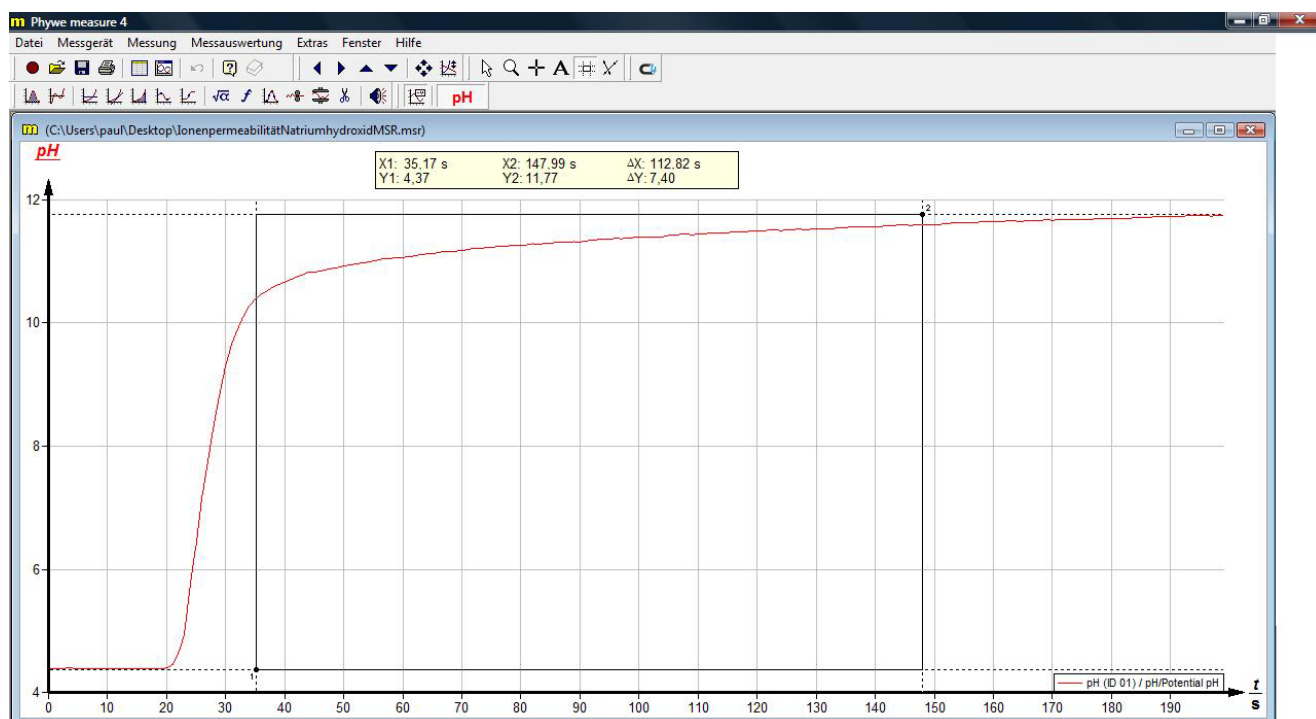


Рис. 4: Кривая зависимости рН от времени при выходе ионов OH^-

На рис. 3 и 4 показаны результаты эксперимента. На Рис. 3 – зависимость от времени рН в стакане, в который был погружён пакет с соляной кислотой, на рис 4 – такая же зависимость для гидроксида натрия.

За счет диффузии ионов H^+ и OH^- соответственно, pH в стакане с соляной кислотой уменьшается, а в стакане с гидроксидом натрия – увеличивается.. Скорость изменения pH может быть вычислена при помощи функции <Survey> (Рисунок 3 и 4). Для соляной кислоты скорость изменения составляет 2.46 pH/183 с (= 0.013 pH/с). Для гидроокиси натрия 7.40 pH/180 с (= 0.041 pH/с). Из этого видно, что ионы OH^- проходят через диализную мембрану быстрее, чем ионы H^+ .

Если вы используете дистиллированную воду вместо деминерализованной, как в описании нашего эксперимента, pH может быть выше. Вы можете увеличить pH, прокипятив воду. Тогда улетучивается углекислый газ, растворенный в воде.

3.6 Определение константы Михаэлиса

P1369860

Цель исследования

При ферментативном гидролизе мочевины в водном растворе образуется углекислый газ и аммиак. Соответствующие ионы повышают электропроводность раствора. Скорость гидролиза мочевины, вызванного ферментом уреазой, может быть определена измерением электропроводности в растворах с разной концентрацией. Полученные значения могут быть использованы для подсчета константы Михаэлиса.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Электропроводность/Температура» Cobra4	12632.00
1	Датчик электропроводности/температуры	13701.01
1	Магнитная мешалка, мини, без подогрева	47334.93
1	Якорь для магнитной мешалки, $l = 30$ мм	46299.02
1	Стержень для извлечения магнитных якорей	35680.03
1	Весы MXX-212R, 210 г / 0.01 г, RS232, 230 В	49111.93
1	Штатив со стойкой 750 мм	37694.00
1	Муфта	02043.00
1	Лапка	37715.00
6	Химический стакан, 100 мл, высокий, Duran	36002.00
1	Химический стакан, 250 мл, низкий, PP	36013.01
6	Коническая колба, 100 мл, узкое горло, SB 19	36418.00
6	Резиновая пробка, 22/25 мм	39255.00
1	Мерная пипетка, 20 мл	36579.00
1	Мерная пипетка, 50 мл	36581.00

Количество	Наименование	Код
1	Пипеттор	36592.00
1	Микролитровый шприц, 100 мкл	02606.00
1	Ложечка из нержавеющей стали	33393.00
1	Промывалка пластиковая, 500 мл	33931.00
1	Мочевина, 250 г	30086.25
1	Раствор уреазы в 50% глицерине, 1000 U/мл, 10 мл	31924.03
1	Дистиллированная вода, 5 л	31246.81
1	Программное обеспечение Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
1	ПК с USB портом, Windows XP или выше	
1	Бумажные полотенца	

Подготовка

Для эксперимента необходимы растворы мочевины различной концентрации. Эти растворы должны быть свежими и приготовлены до выполнения опыта:

0.4% раствор мочевины (запасный раствор мочевины): Взвесите 0.40 г мочевины в 100 мл конической колбе и растворите в 99.6 г дистиллированной воды.

0.2% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0.4% раствора мочевины с помощью 50 мл мерной пипетки в 100 мл коническую колбу и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.1% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0.2% раствора мочевины с помощью 50 мл мерной пипетки в 100 мл коническую колбу и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.05% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0.1% раствора мочевины с помощью 50 мл мерной пипетки в 100 мл коническую колбу и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.025% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0.05% раствора мочевины с помощью 50 мл мерной пипетки в 100 мл коническую колбу и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.0125% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0.025% раствора мочевины с помощью 50 мл мерной пипетки в 100 мл коническую колбу и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

Примечание: Раствор уреазы должен храниться в холодильнике!

Установка и ход работы



Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

Закрепите лапку с муфтой на стойке штатива.

Подключите датчики электропроводности/температуры в соответствующие порты сенсорного блока «Электропроводность/Температура» Cobra4

Закрепите датчик электропроводности в лапке.

Вставьте беспроводной USB-адаптер Cobra4 в USB порт ПК.

Запустите программу «Measure Cobra4». Она автоматически определит измерительный прибор.

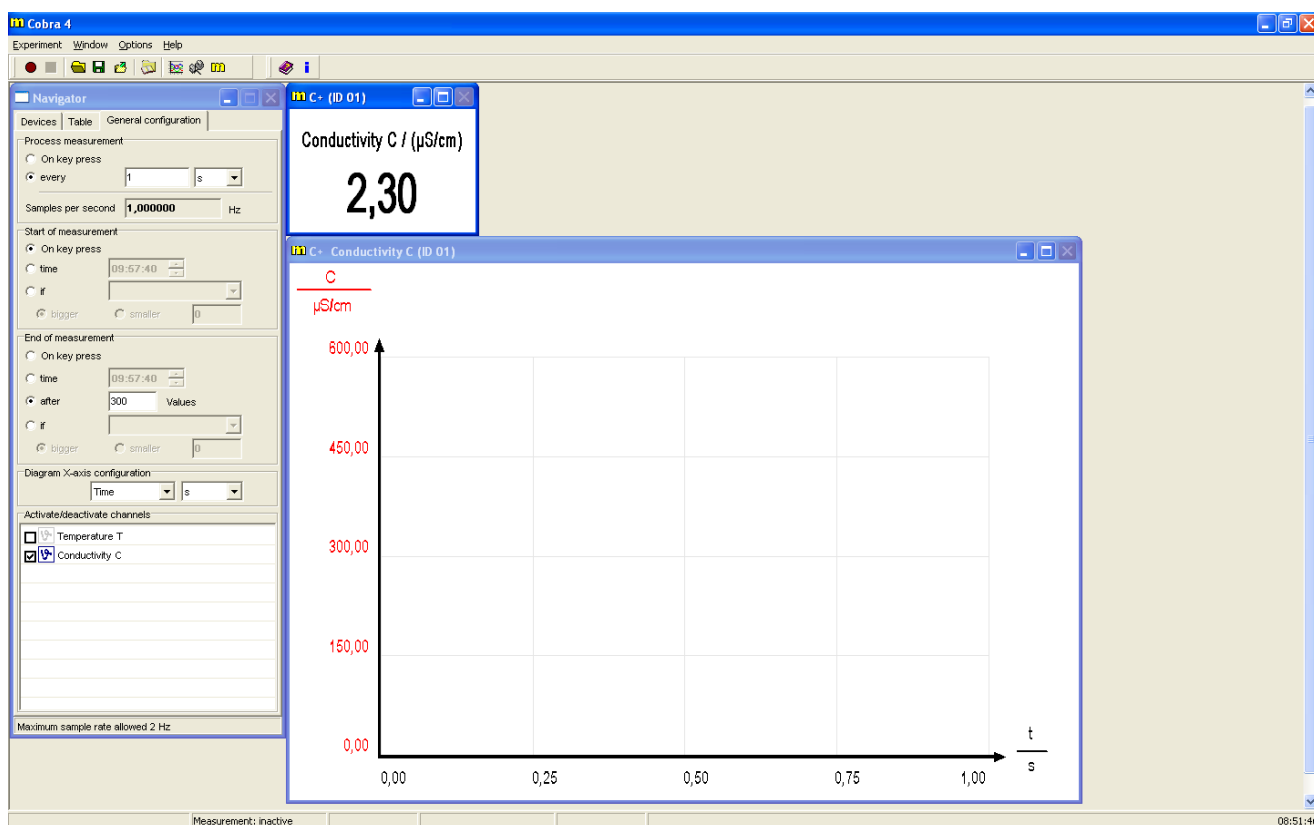


Рис. 2: Параметры измерения

Настройте значения, как показано на Рис. 2. Откройте в меню команду “Navigator”, выберите вкладку <General configuration> и поставьте длительность измерения 300 с в разделе <End of measurement>. Щелкните правой кнопкой мыши на диаграмме и в разделе <Display options> установите электропроводность в диапазоне от 0 до 600 мкСм/см. Кроме того, вы можете просто загрузить эксперимент “Determination of the Michaelis constant” (Experiment > Open experiment...). Программное обеспечение загрузит все необходимые параметры для записи измерений.

Перенесите 40 мл 0.0125% раствора мочевины (наименьшая концентрация) в два этапа с помощью 20 мл мерной пипетки в 100 мл химический стакан и погрузите туда якорь для магнитной мешалки.

Поставьте химический стакан на магнитную мешалку и опустите датчик электропроводности в раствор.

Установите мешалку на среднюю скорость перемешивания (*Внимание: якорь для магнитной мешалки не должен задевать датчик электропроводности!*).

Добавьте 50 мкл раствора уреазы с помощью микролитрового шприца и сразу начните измерения, нажав кнопку пуск ●.

Время после начала реакции можно увидеть на экране.

По окончании измерения сохраните данные для дальнейшей обработки.

Повторите измерения для 6 приготовленных растворов мочевины (в порядке увеличения концентрации)

Перед выполнением каждого измерения снимите химический стакан с магнитной мешалки и извлеките якорь для магнитной мешалки из раствора с помощью стержня.

Тщательно промойте якорь для магнитной мешалки дистиллированной водой, высушите бумажным полотенцем и положите в следующий раствор.

Датчик электропроводности так же промойте дистиллированной водой перед каждым экспериментом.

Результаты и их обсуждение

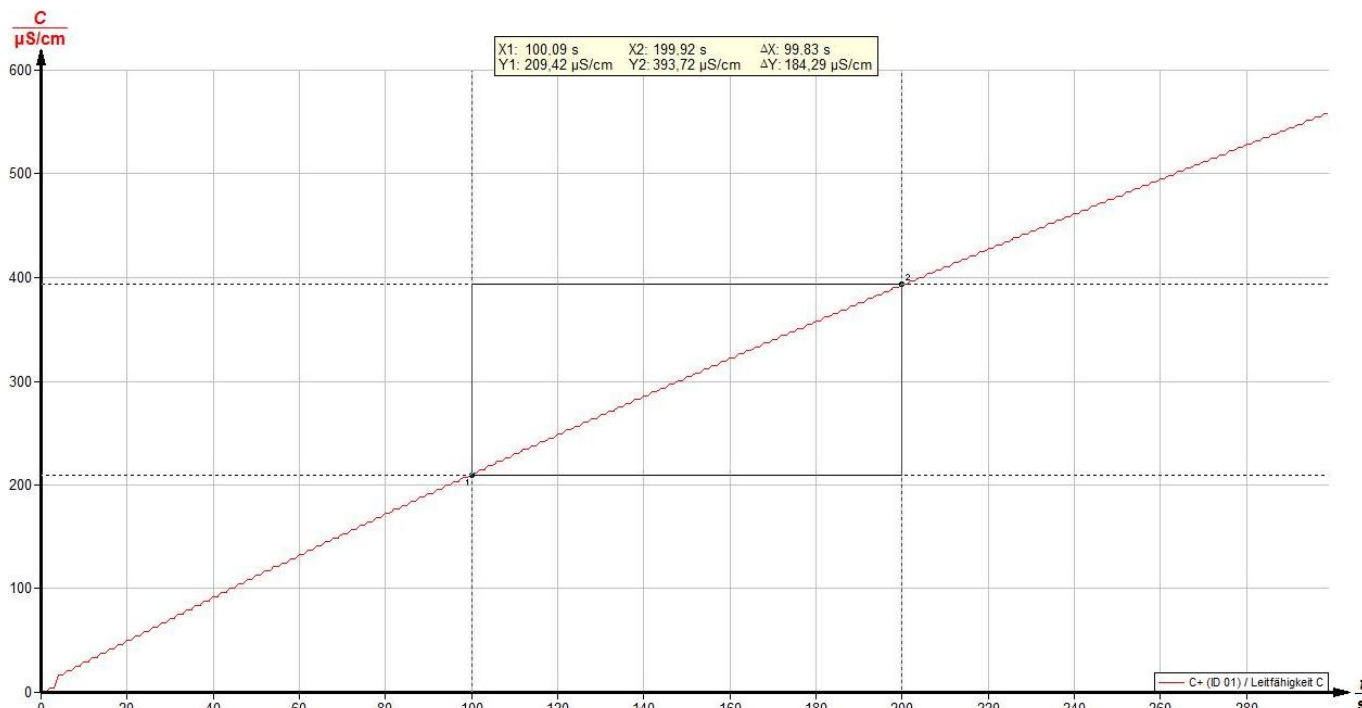

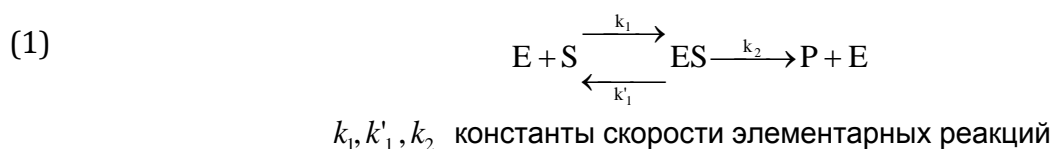


Рис. 3: Диаграмма зависимости электропроводности от времени для гидролиза мочевины с уреазой

На рисунке 3 показан пример диаграммы электропроводности от времени, построенной программой после завершения измерений.

Чтобы определить константу Михаэлиса, используйте функция “Survey”  программы “Measure”. С её помощью определите значение электропроводности при 100 и 200 секундах, а также разность между ними ΔY для всех шести измерений.

Механизм ферментно-каталитической реакции в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен включает образование фермент-субстратного комплекса ES из фермента E и субстрата S. Этот процесс обратим. С другой стороны, комплекс ES необратимо разрушается до продукта P и неизменного фермента E:



В соответствии с принципом Боденштейна, концентрации ES практически не меняется во времени:

$$(2) \quad \frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k'_1 c_{ES} - k_2 c_{ES} \approx 0$$

Решая это уравнение, относительно концентрации ES, получаем:

$$(3) \quad c_{ES} = \frac{k_1 c_E c_S}{k'_1 + k_2}$$

Концентрация свободного субстрата c_S может быть приравнена к общей концентрации S, потому что добавлено небольшое количество фермента. Общая концентрация E, $c_{E,0}$, равна сумме концентраций свободного фермента c_E и ферментно-субстратного комплекса c_{ES} :

$$(4) \quad c_{E,0} = c_E + c_{ES}$$

Решаем уравнение, подставляя уравнение (4) в уравнение (3), получаем:

$$(5) \quad c_{ES} = \frac{k_1 \cdot (c_{E,0} - c_{ES}) c_S}{k'_1 + k_2}$$

Результат решения уравнения для c_{ES} :

$$(6) \quad c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_{E,0} \cdot c_S}{k'_1 + k_2 + k_1 c_S}$$

Временная зависимость для образования продукта:

$$(7) \quad \frac{dc_P}{dt} = k_2 c_{ES}$$

Если заменить c_{ES} членом из уравнения (6), получим:

$$(8) \quad \frac{dc_P}{dt} = \frac{k_1 k_2 c_{E,0} c_S}{k'_1 + k_2 + k_1 c_S}$$

Коэффициент

$$(9) \quad \frac{k'_1 + k_2}{k_1} = K_M$$

называют константой Михаэлиса K_M . В результате получаем временную зависимость:

$$(10) \quad \frac{dc_P}{dt} = \frac{k_2 c_{E,0} c_S}{K_M + c_S}$$

Это означает, что скорость ферментативного расщепления линейно зависит от концентрации фермента. Влияние концентрации субстрата, однако, более сложное. В случае, если $c_S > K_M$, то уравнение (10) упрощается:

$$(11) \quad \frac{dc_P}{dt} = k_2 c_{E,0}$$

В данном случае, реакция является реакцией нулевого порядка по S и максимальная скорость ферментативного расщепления есть k_2 (при $c_E=0$). Если $c_S = K_M$, тогда достигается половина максимальной скорости. То есть константа Михаэлиса K_M равна концентрации субстрата, на котором проходит реакция, при половине максимальной скорости. Если субстрата мало, т.е. если $c_S < K_M$, получим:

$$(12) \quad \frac{dc_P}{dt} = \frac{k_2}{K_M} \cdot c_{E,0} c_S$$

Это означает что скорость образования P уравнение первого порядка по E и S.

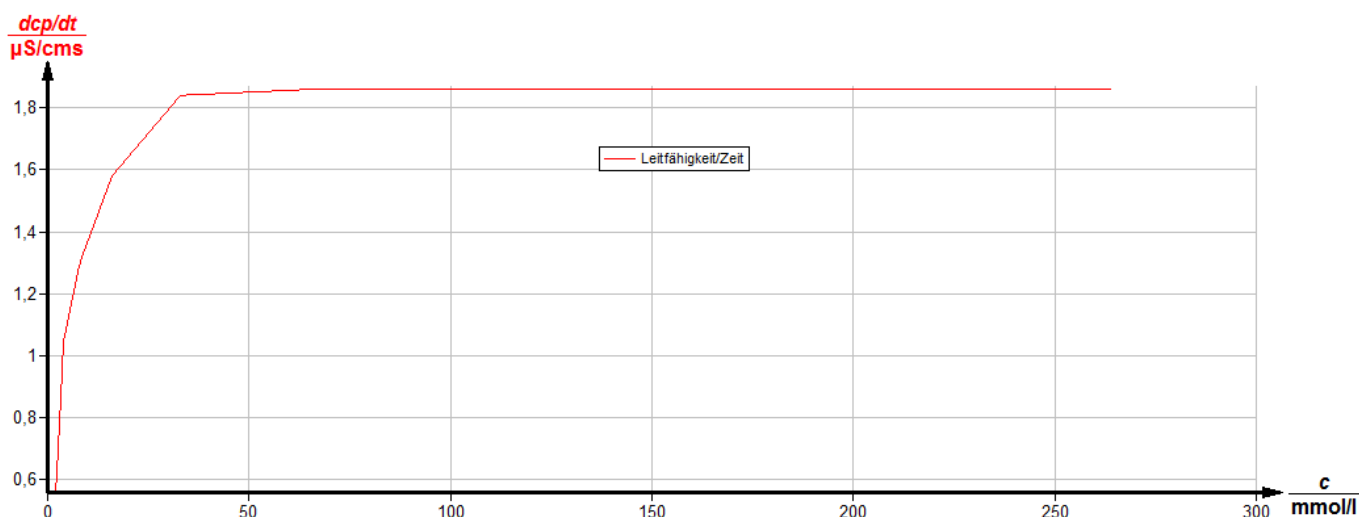


Рис. 4: Зависимость скорости ферментативного расщепления от концентрации

Для вычислений определите скорость ферментативного расщепления между 100 и 200 секундами после начала реакции. Для этого, разницу значений электропроводности при 100 и 200 секундах (ΔY) поделите на 100 секунд. Зависимость скорости (размерность МКСМ $cm^{-1} s^{-1}$) от концентрации мочевины (размерность моль l^{-1}) нанесите на график (Рис.4). Концентрация субстрата c_S (размерность ммоль/л) считается по формуле:

$$(13) \quad c_S = (W10000) / M$$

где: W = концентрация раствора мочевины %

M = молярная масса мочевины = 60.06 г/моль

Поскольку очень трудно сразу посчитать концентрации, соответствующие половине максимальной скорости, т. е. K_M , используйте диаграмму Линевер-Бурк (Рис. 5). Она получается, если обозначить скорость реакции = dc_P/dt за v и обернуть числитель и знаменатель в уравнении (10):

(14)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_M}{k_2} \cdot \frac{1}{c_S}$$

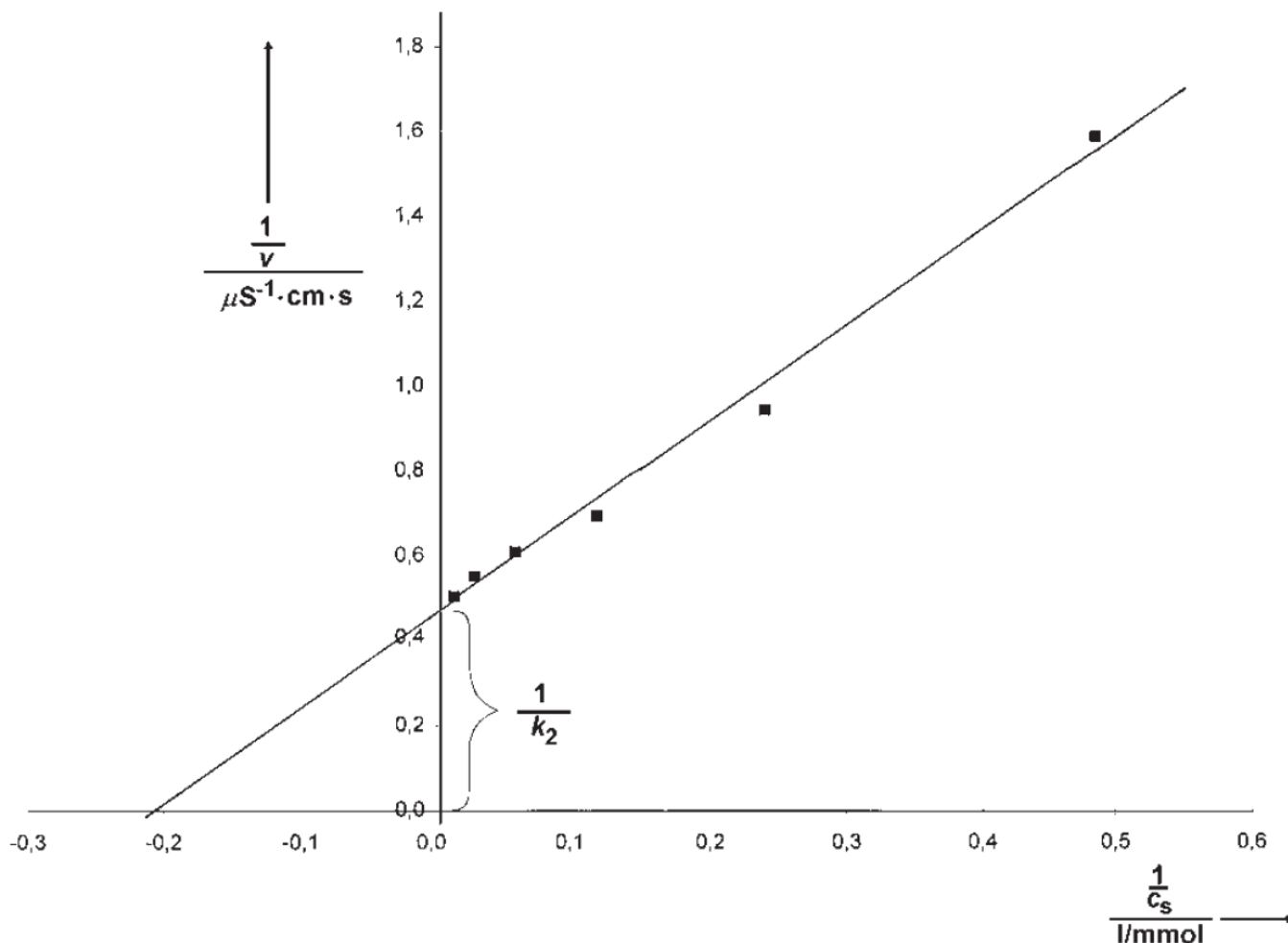


Рис. 5: Диаграмма Линевивер-Бурк

По кривой зависимости $1/v$ от $1/c_s$ (Рис. 5), получите k_2^{-1} как пересечение прямой с осью ординат ($1/c_s = 0$) и K_M/k_2 как угол наклона прямой. Для этого, во-первых, определите отрезок на оси ординат и наклон прямой линии. Затем поделите величину наклона на величину отрезка на оси ординат, чтобы получить константу Михаэлиса. На Рис. 4 значение константы Михаэлиса составляет для уреазы 4.86×10^{-3} моль л⁻¹.

Небольшое значение K_M означает, что фермент обладает большим сродством к субстрату. Уреаза была первым ферментом, который может быть получен в кристаллическом виде (Самнер, 1926). В отличие от аллостерических ферментов, уреазы является наиболее подходящим ферментом для механизма Михаэлиса-Ментен.

3.7 Субстратное ингибирование фермента

P1369960

Цель исследования

При ферментативном гидролизе мочевины в водном растворе образуется углекислый газ и аммиак. Соответствующие ионы повышают электропроводность раствора. Скорость гидролиза мочевины, вызванного ферментом уреазой, может быть определена измерением электропроводности в растворах с разной концентрацией. Цель исследования – измерить скорость реакции ферментативного гидролиза при высоких концентрациях субстрата, при которых возникает субстратное ингибирование, то есть угнетение деятельности фермента.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Электропроводность/Температура» Cobra4	12632.00
1	Электрод электропроводности/температуры	13701.01
1	Магнитная мешалка мини / MST	47334.93
1	Якорь для магнитной мешалки 30 мм	46299.02
1	Стержень для якоря	35680.03
1	Весы MXX-212R, 210 г/ 0.01 г, RS232, 230 В	49111.93
1	Разборное основание штатива, 180 x 100 мм, h = 750 мм	37690.00
1	Прямоугольный зажим	37697.00
1	Лапка	37715.00
8	Стеклянный химический стакан DURAN, высокий, 100 мл	36002.00
1	Стеклянный химический стакан DURAN, низкий, 250 мл	36013.00
7	Коническая колба, с узким горлом, 100 мл	36418.00
7	Резиновая пробка, d=22/17 мм	39255.00
1	Мерная пипетка, 20 мл	36579.00
1	Мерная пипетка, 50 мл	36581.00

Количество	Наименование	Код
1	Пипеттор	36592.00
1	Микролитровый шприц, 100 мкл	02606.00
1	Ложечка из нержавеющей стали	33393.00
1	Промывалка, пластиковая, 500 мл	33931.00
1	Мочевина, 250 г	30086.25
1	Раствор уреазы в 50% глицерине, 10 мл	31924.03
1	Дистиллированная вода, 5 л	31246.81
1	Программное обеспечение для Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
1	ПК с USB портом, Windows XP или выше	
1	Бумажные полотенца	

Подготовка

Для эксперимента необходимы растворы мочевины различной концентрации. Эти растворы должны быть свежими и приготовлены до выполнения опыта серией разбавлений:

1.6% Раствор мочевины (запасный раствор мочевины): В 250 мл химическом стакане взвесьте 2.00 г мочевины и растворите в 123.00 г дистиллированной воды.

0.8% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 1.6% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.4% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.8% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.2% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.4% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.1% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.2% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.05% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.1% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.025% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.05% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

0.0125% Раствор мочевины: С помощью мерной пипетки на 50 мл перенесите 50 мл 0.025% раствора мочевины в коническую колбу на 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

В работе также используется раствор уреазы, который должен храниться в холодильнике!

Установка и ход работы



Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

На стойке штатива закрепите муфту, а в ней – лапку.

Вставьте сенсорный блок «Электропроводность/Температура» Cobra4 в беспроводной измерительный блок.

Подключите электрод электропроводности/температуры в соответствующие входы сенсорного блока «Электропроводность/Температура»

Зафиксируйте щуп датчика электропроводности в лапке.

Вставьте беспроводной USB адаптер Cobra4 в порт USB ПК.

Включите беспроводной измерительный блок.

Запустите программу “Measure Cobra4”. Она автоматически определит измерительный прибор.

Настройте измерительные параметры, как показано на Рис. 2. Для этого откройте в меню команду “Navigator”, выберите вкладку <General configuration> и поставьте длительность измерения 300 с в разделе <Stop measuring after>. Щелкните правой кнопкой

мыши на диаграмме и в разделе <Display options> установите электропроводность в диапазоне от 0 до 600 мкСм/см. Кроме того, вы можете просто загрузить эксперимент «Substrate inhibition of enzymes» (Experiment > Open experiment...). Программное обеспечение загрузит все необходимые параметры для записи измерений.

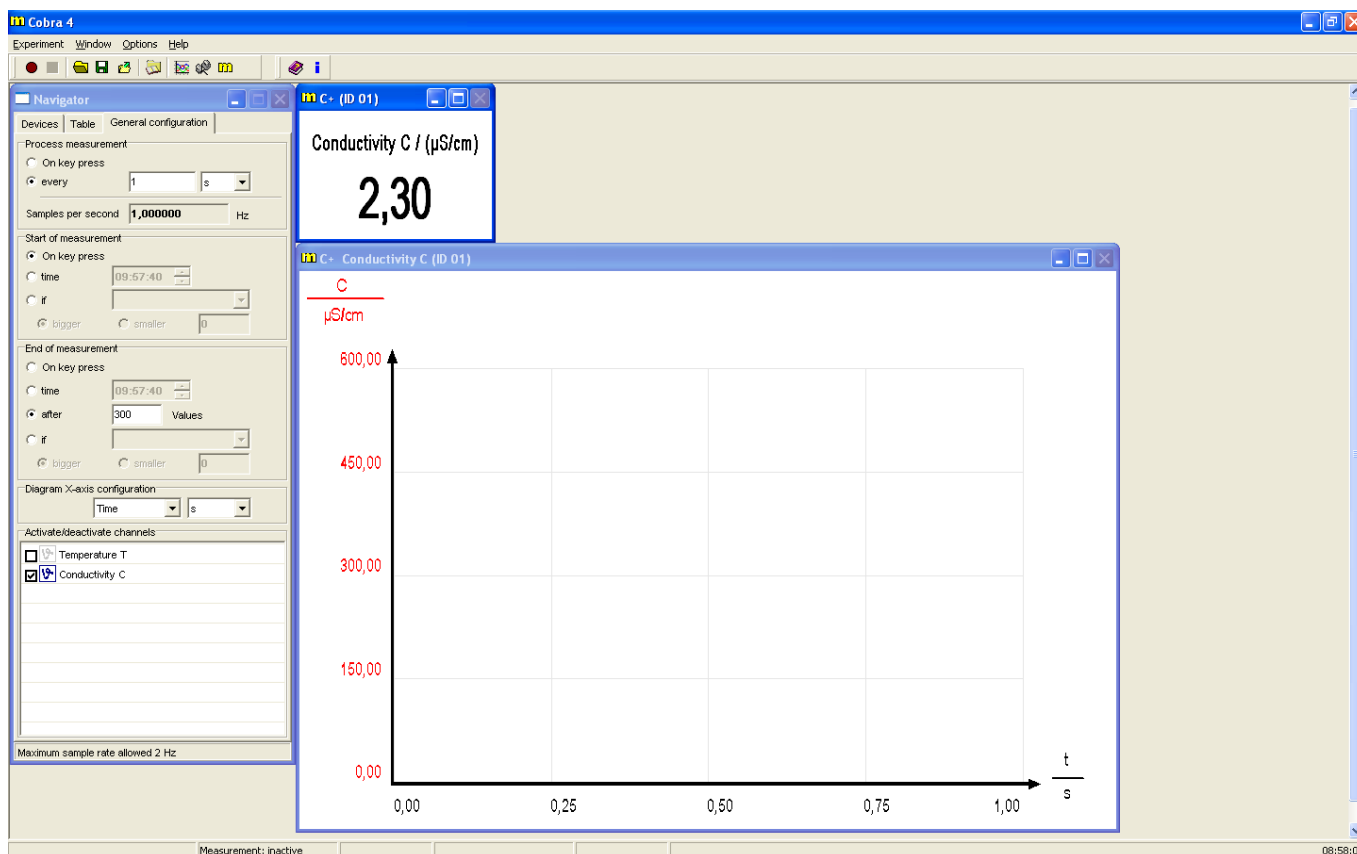


Рис. 2: Измерительные параметры

С помощью мерной пипетки на 20 мл за два раза перенесите 40 мл 0.0125% раствора мочевины в 100 мл химический стакан и погрузите якорь для магнитной мешалки.

Поставьте стакан на магнитную мешалку и погрузите щуп датчика электропроводности в раствор.

Установите мешалку на среднюю скорость перемешивания (*Внимание: якорь для магнитной мешалки не должен задевать датчик электропроводности!*).

Добавьте 50 мкл раствора уреазы с помощью микролитрового шприца и сразу начните измерения

Время после начала реакции можно увидеть на экране.

После завершения измерений каждый раз сохраняйте полученные данные. Для этого в программе «Measure» в меню <File> нажмите на вкладку <Save measurement as...>.

Повторите измерения для всех приготовленных растворов мочевины (в порядке увеличения концентрации). При этом:

- после выполнением каждого измерения снимите химический стакан с магнитной мешалки и извлеките якорь мешалки из раствора с помощью стержня;
- тщательно промойте якорь для магнитной мешалки дистиллированной водой,

высушите бумажным полотенцем и положите в следующий раствор.

- датчик электропроводности и стакан так же промойте дистиллированной водой перед каждым экспериментом

Результаты и их обсуждение

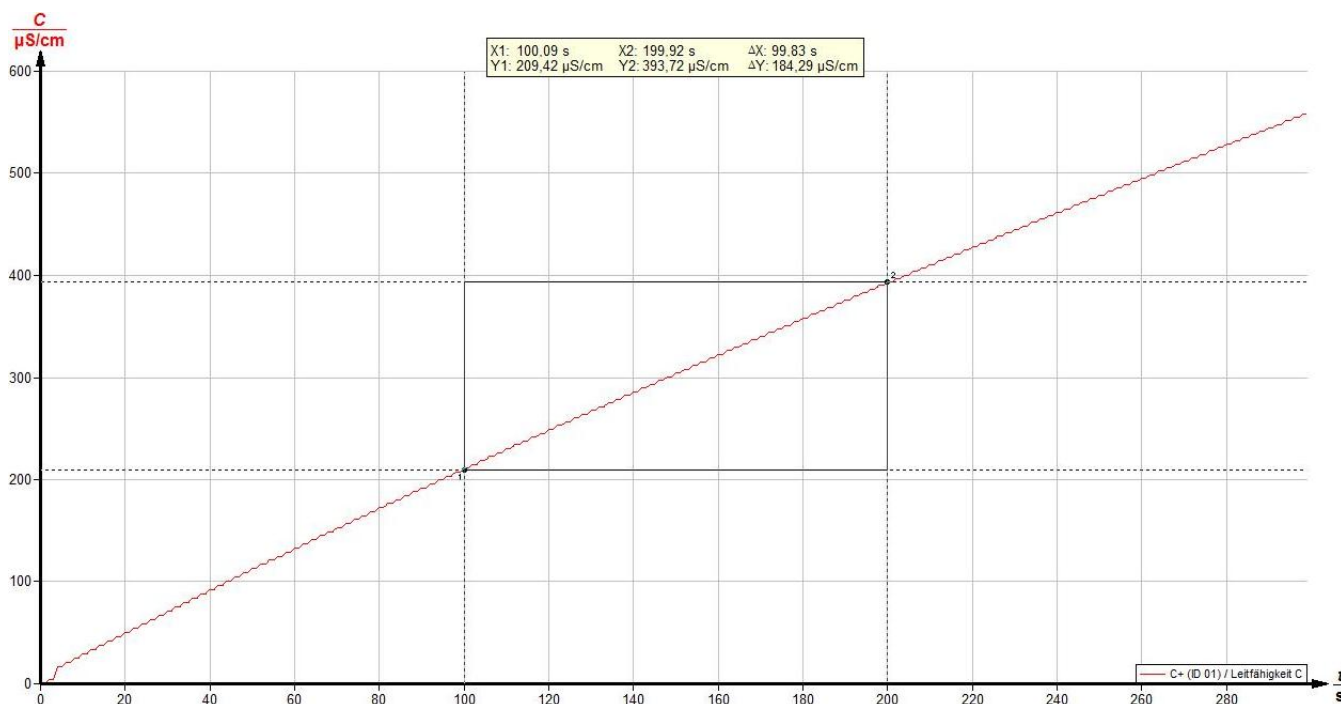


Рис. 3: График зависимости электропроводности от времени гидролиза мочевины с уреазой

На Рис. 3 показан пример зависимости электропроводности от времени, которую программа построила после завершения измерений. Для определения концентрации субстрата, при которой возникает ингибирование, используйте функцию “Survey” . С её помощью определите значение электропроводности при 100 и 200 секундах, а также разность между ними ΔY для всех восьми измерений.

Большое количество субстрата приводит к обратимому ингибированию фермента, то есть скорость реакции не возрастает с увеличением концентрации субстрата, но остается постоянной или даже уменьшается. Так происходит потому, что молекулы субстрата мешают друг другу в пространстве. Это явление называется «субстратное ингибирование».

Для вычислений определите среднюю скорость ферментативного гидролиза между 100 и 200 секундами после начала реакции. Для этого разницу значений электропроводности при 100 и 200 секундах (ΔY) поделите на 100 секунд. Зависимость скорости (размерность мкСм/(см·с)) от концентрации мочевины (размерность моль/л) нанесите на график (Рис.4). Концентрация субстрата c_s (размерность ммоль/л) считается по формуле через процентные концентрации:

$$c_s = (W \cdot 10000) / M$$

где: W = концентрация раствора мочевины %

M = молярная масса мочевины = 60.06 г/моль

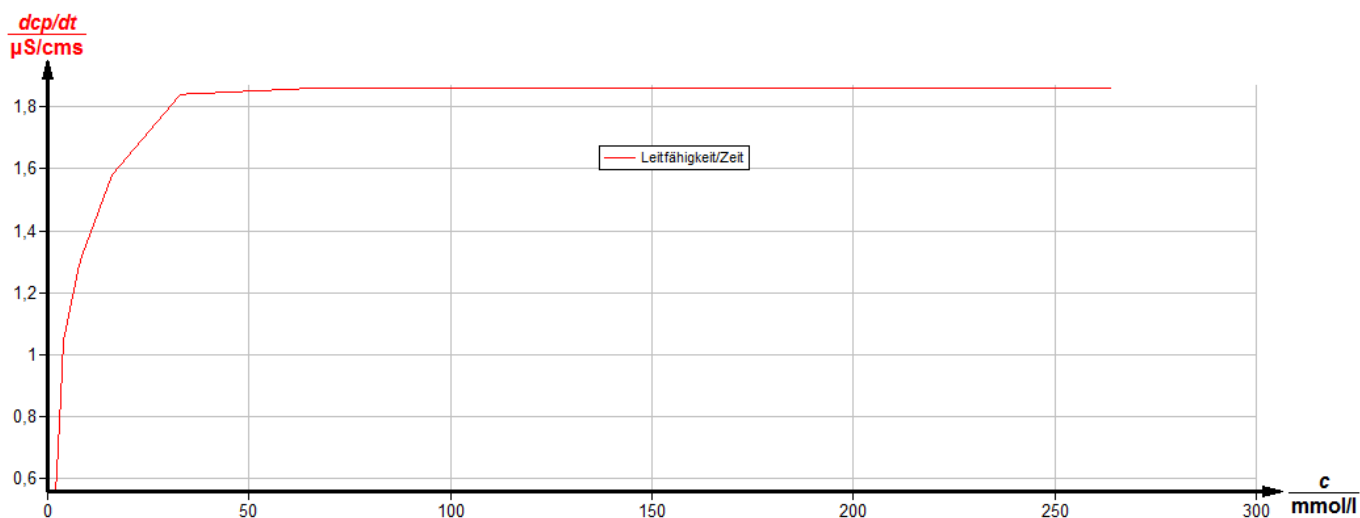


Рис. 4: Зависимость скорости ферментного разложения от концентрации

Концентрацию, при которой происходит субстратное ингибирование, можно оценить графически. Она соответствует максимуму графика зависимости скорости реакции от концентрации. В нашем опыте это наблюдается при 40 ммоль/л, после чего происходит субстратное ингибирование (Рис. 4).

3.8 Ферментативная активность каталазы

P1360760

Цель исследования

Изучить ферментативное разложение в печени пероксида водорода – токсина, которое образуется в клетках в качестве промежуточных продуктов дыхания.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной USB-адаптер Cobra4	12600.00
1	Беспроводной измерительный блок Cobra4	12601.00
1	Сенсорный блок «Термодинамика» Cobra4	12638.00
1	Держатель для Cobra4 со стойкой	12680.00
1	Штатив, разборный	02001.00
1	Стойка, $l = 500$ мм	02001.00
2	Муфта	02043.00
1	Лапка с шарниром	37716.00
1	Магнитная мешалка, мини	47334.93
1	Якорь для магнитной мешалки, $l = 50$ мм	46299.03
1	Коническая колба, 250 мл, SB 29	36424.00
2	Мерный цилиндр, 100 мл, стеклянный	36629.00
1	Ступка с пестиком, 150 мл	32604.00
1	Сито, $d = 60$ мм, мелкоячеистое	40968.00
2	Химический стакан, 250 мл, высокий	46027.00
1	Резиновая пробка 26/32, отверстие 7 мм	39258.01
1	Резиновая трубка, $d_i = 6$ мм, 1 м	39282.00
1	Стеклянная трубка, $l = 80$ мм	36701.65
1	Мерная пипетка, 1 мл	36595.00
2	Мерная пипетка, 10 мл	36600.00

Количество	Наименование	Код
1	Пробирка, 100 мм, $d = 12$ мм	36307.10
1	Глицерин, 99%, 100 мл	36307.10
1	Промывалка пластиковая, 500 мл	36307.10
1	Перекись водорода, 30%, 250 мл	31710.25
1	Соляная кислота, 1 моль/л, 1 л	48454.70
1	Раствор гидроксида натрия, 1 моль/л, 1 л	48329.70
1	Программное обеспечение для Cobra4	14550.61

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
	ПК с USB портом, Windows XP или выше	
	Кубики льда	
	Ёмкость для кипячения воды	
	Дистиллированная вода	
	Небольшой кусочек печени цыпленка	



Меры безопасности

В зависимости от концентрации растворы гидроксида натрия разъедают и раздражают кожу, глаза и слизистые оболочки. Пары гидроксида натрия раздражают органы дыхания. Химические ожоги гидроксидом натрия вызывают разрушение тканей и сильную боль. Хранить вдали от детей.

В зависимости от концентрации соляная кислота разъедают и раздражают кожу, глаза и слизистые оболочки. Пары соляной кислоты раздражают органы дыхания, в частности слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Концентрированные кислоты разрушают кожу и ткани.

Не дышите парами и туманом соляной кислоты. Избегайте её контакта с кожей. Надевайте соответствующую защитную одежду, перчатки и защитные очки при работе с ней.

Первая помощь: При попадании этих веществ на кожу, немедленно промойте её большим количеством воды. Если попадает в глаза, немедленно промойте большим количеством воды, держа их открытыми. В случае травмы глаза немедленно обратитесь за медицинской помощью. Если произошел несчастный случай или больной плохо себя чувствует, немедленно обратитесь за медицинской помощью. В случае вдыхания паров обеспечить доступ свежего воздуха и поддерживать дыхательные пути чистыми. Если дыхание затруднено, транспортируйте пострадавшего в полусидящем положении к врачу.

Утилизация: Разбавьте раствор водой, нейтрализуйте гидрокарбонатом натрия до pH 6-8 и слейте в раковину под сильным напором воды.

Поскольку в ходе эксперимента значительно возрастает давление, мы рекомендуем носить защитные очки.

Установка



Рис. 1: Установка

Соберите установку, как на Рис. 1.

Закрепите беспроводной измерительный блок Cobra4 с сенсорным блоком «Термодинамика» Cobra4 на стойке штатива.

Поставьте коническую колбу на магнитную мешалку и опустите штуцер датчика давления на уровень чуть выше уровня колбы. Смажьте стеклянную трубку глицерином и ввинтите её в резиновую пробку. При помощи как можно более короткой резиновой трубки присоедините штуцер датчика давления к стеклянной трубке.

Вставьте беспроводной USB адаптер Cobra4 в порт USB ПК.

Запустите программу «Measure Cobra4». Она автоматически определит измерительный прибор.

Настройте измерительные параметры, как показано на Рис. 2, или просто откройте эксперимент «Enzymatic activity of catalase» (Experiment > Open experiment...). Программа установит все необходимые параметры для записи данных.

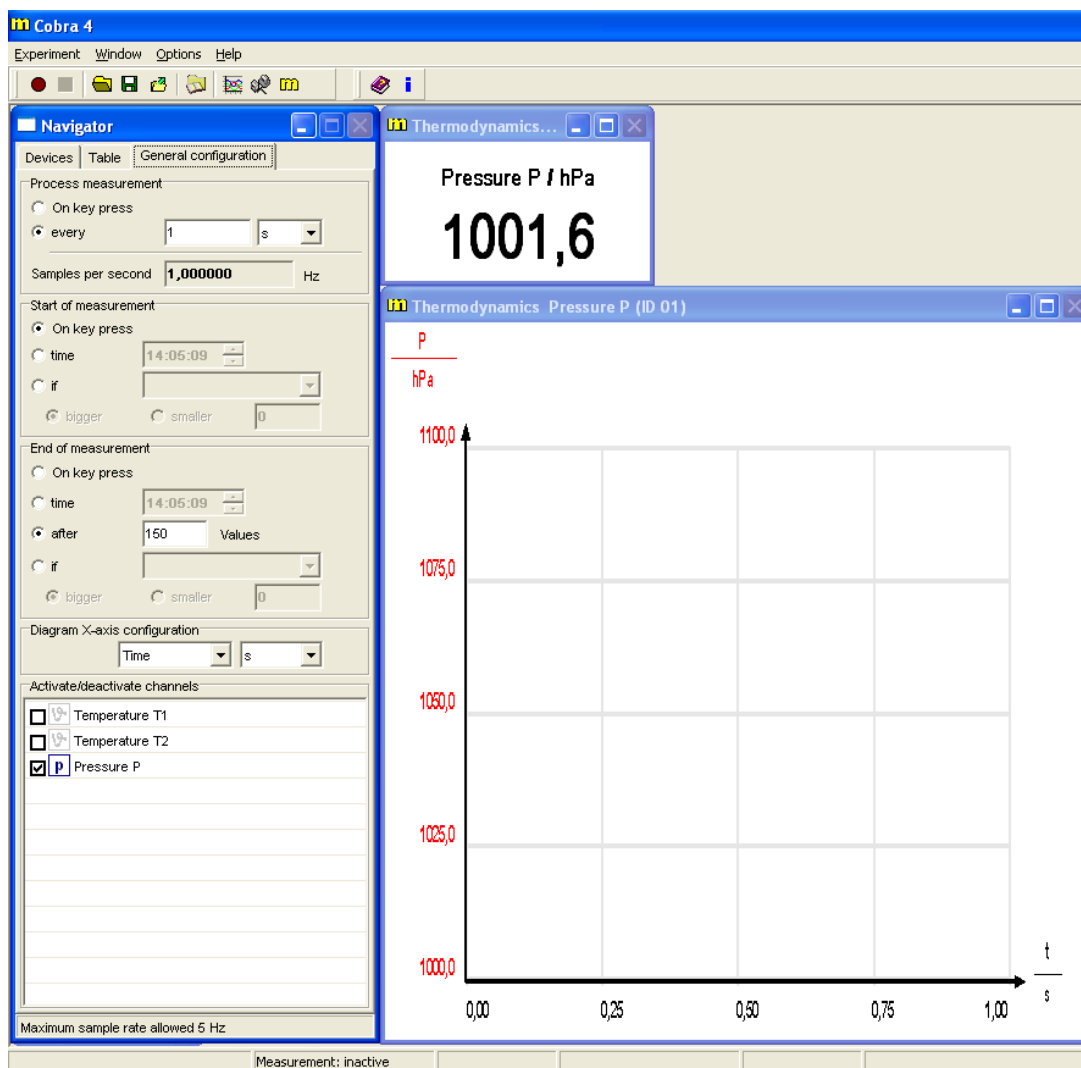


Рис. 2: Измерительные параметры

Методика

Положите маленький кусочек печени (при необходимости заранее нарежьте) в ступку и добавьте немного дистиллированной воды. Раздавите пестиком и через сито перенесите сок в химический стакан.

Опыт 1:

Необходимо приготовить 0.5% раствор перекиси водорода. Для этого в мерный цилиндр налейте 10 мл 30% раствора H_2O_2 и 90 мл дистиллированной воды, тем самым получив 3% раствор. Затем в цилиндр на 100 мл налейте 15 мл полученного 3% раствора перекиси водорода и доведите до отметки 100 мл дистиллированной водой. Можно сразу использовать 3%-ный раствор пероксида водорода, приобретённый в аптеке.

Из конической колбы извлеките пробку, подсоединённую к датчику давления. Налейте в неё приготовленный 0.5% раствор пероксида водорода, погрузите туда якорь для магнитной мешалки и поставьте колбу на магнитную мешалку.

Выставьте низкую скорость перемешивания и начните измерения. Добавьте в коническую колбу 1 мл сока печени и сразу закройте резиновой пробкой.

Закончите примерно через 150 с.

Опыт 2а+b:

Выполняйте аналогично опыту 1, но к раствору пероксида водорода добавьте 10 мл раствора гидроксида натрия (1 моль/л) или 10 мл раствора соляной кислоты (1 моль/л).

Опыт 3а+b:

Выполняйте аналогично опыту 1, но перед добавлением сока печени поставьте колбу на пять минут в стакан со смесью воды и льда или в стакан с кипятком, после чего выньте.

Наблюдения и результаты

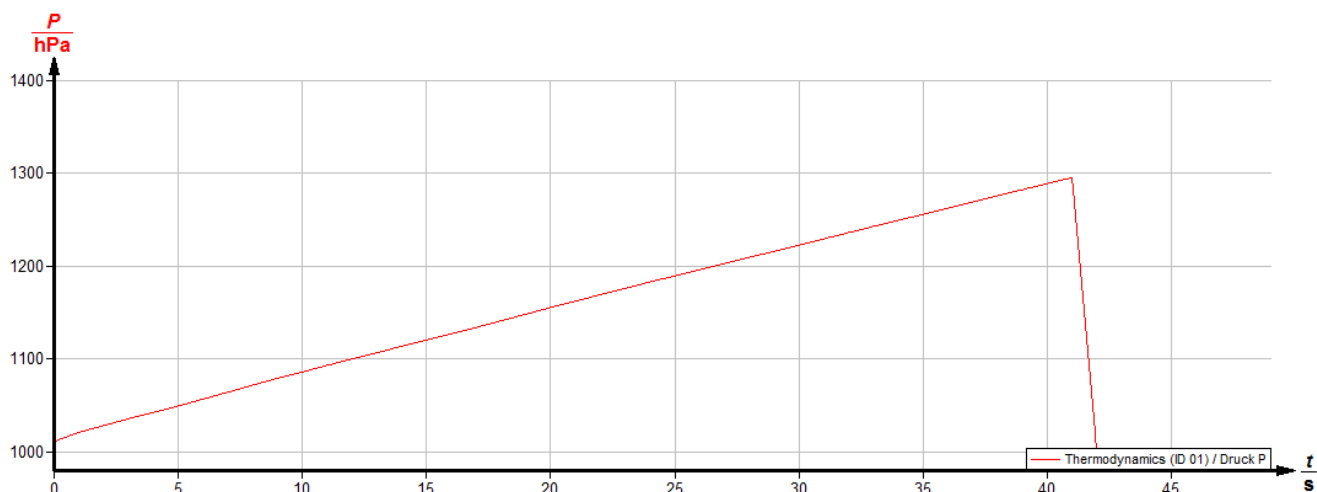


Рис. 3: Результаты измерений при комнатной температуре без добавления кислоты или основания

Опыт 1: В ходе первого опыта график давления резко возрастает (Рис. 3). Под конец кривая резко падает, поскольку выделяющийся газ выбивает пробку.

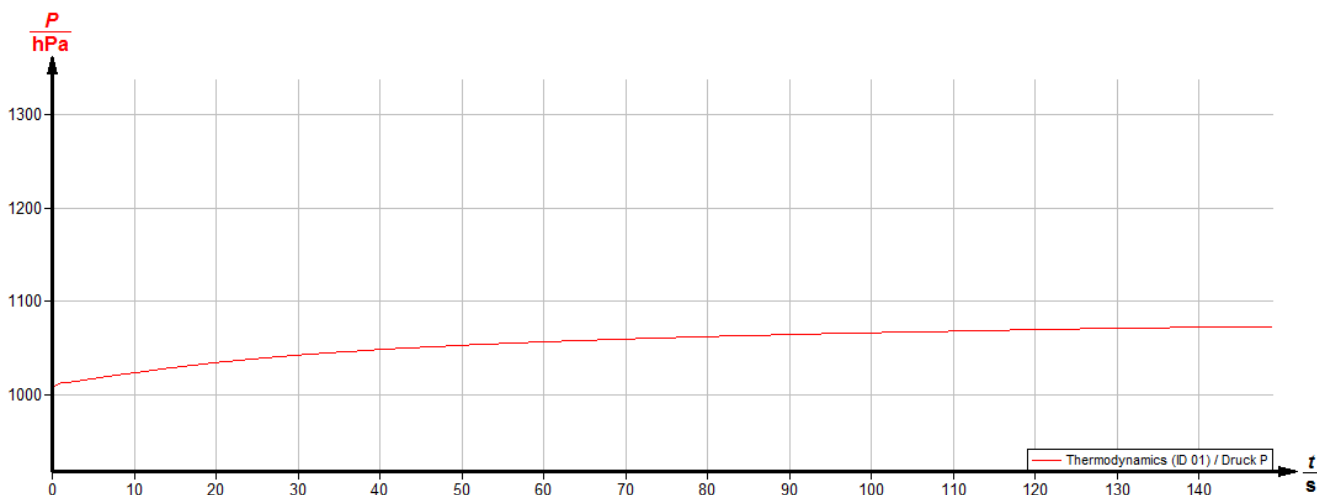


Рис. 4: Результаты измерений в присутствии щелочи

Опыт 2а: При добавлении гидроксида натрия давление поднимается гораздо медленнее (Рис. 4).

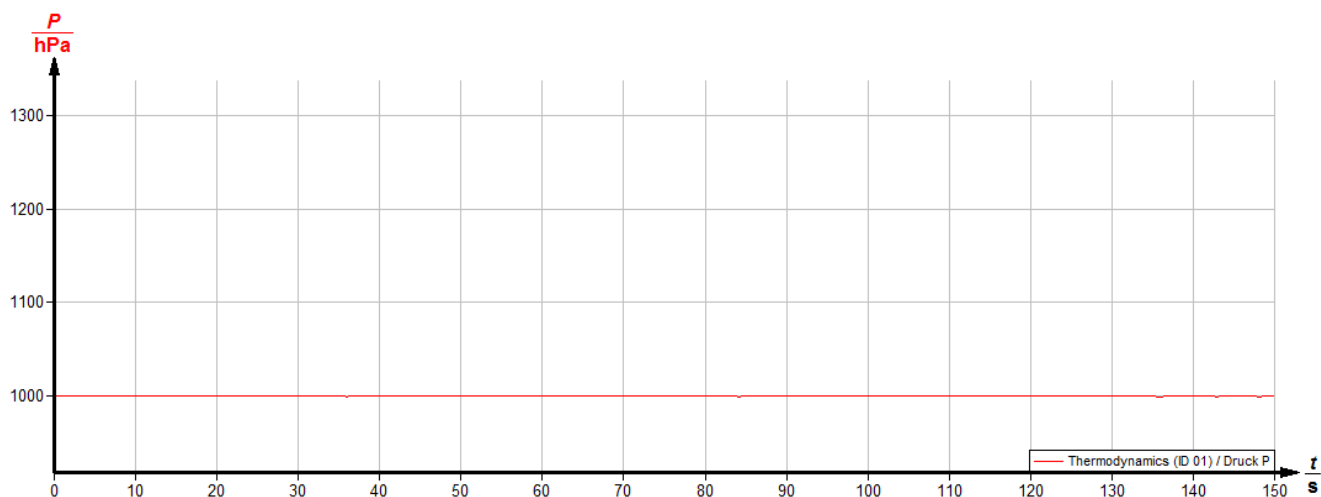


Рис. 5: Результаты измерений в присутствии кислоты

Опыт 2b: При добавлении соляной кислоты давление не поднимается вообще (Рис. 5).

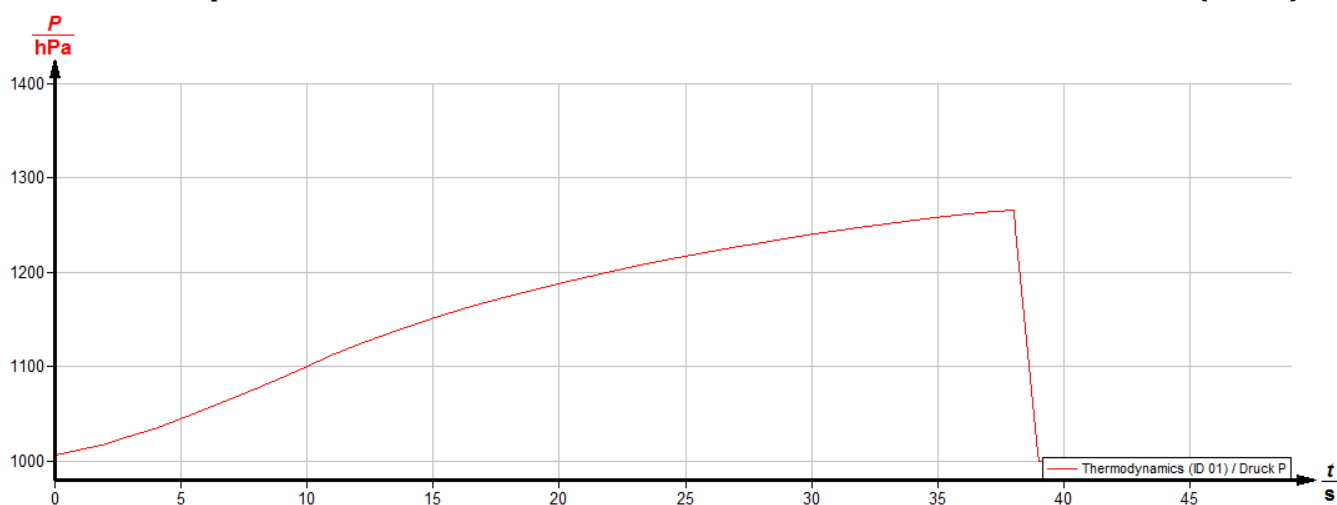


Рис. 6: Результаты измерений на холоде

Опыт 3a: После 5ти минутной холодной бани, давление увеличивается так же быстро, как и при нормальных условиях (Рис. 6). Под конец кривая резко падает, поскольку выделяющийся газ выбивает пробку.

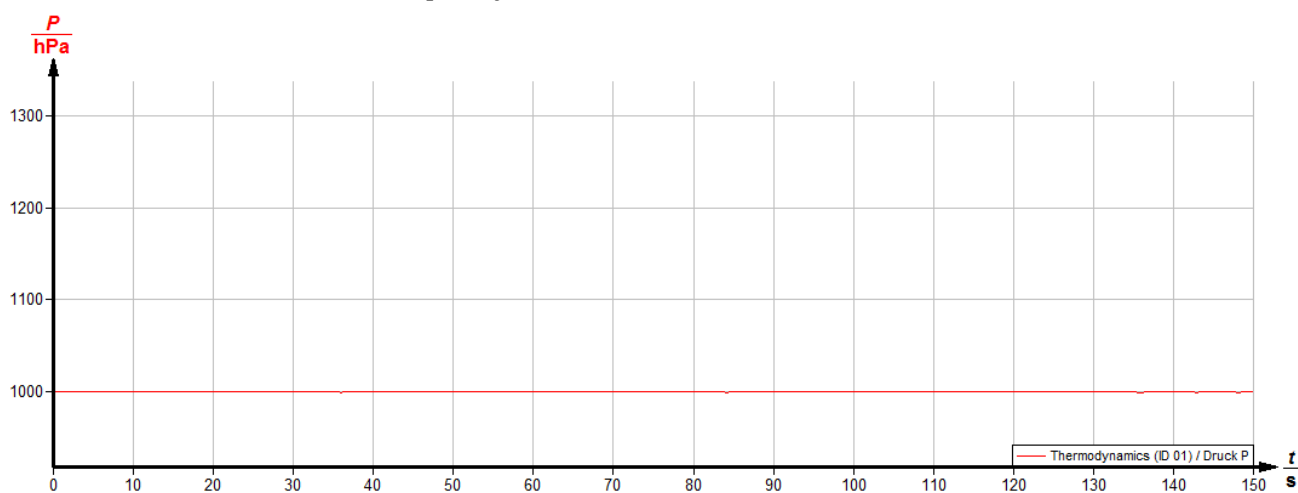


Рис. 7: Результаты измерений (горячо)

Опыт 3b: После 5ти минутной горячей бани, давление в конической колбе остается неизменным (Рис. 7).

Примечания

Каталаза – это фермент, который преимущественно содержится в печени и эритроцитах человека. Она разлагает перекись водорода (H_2O_2), которая является токсичным продуктом клеточного дыхания, до воды и кислорода. Например если смешать кровь с H_2O_2 , то в результате можно увидеть кислородные пузырьки.

Активность фермента зависит от pH. Опыт 2 показал, что активнее всего он в нейтральной среде. В кислой среде фермент вовсе прекращает свою деятельность.

Ферменты состоят их белков. Белки денатурируют при высоких температурах (для каталазы достаточно $40^{\circ}C$). Поэтому в опыте 3b после 5ти минутной обработки горячей водой давление не поднимается вообще. Белки фермента были разрушены при нагревании. Низкая температура инактивируют каталазу только на время: как только температура поднялась, ферменты начали нормально работать.

ЗООЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

4. Избирательная температура насекомых

P4060200

Понятия, относящиеся к теме

Температурный оптимум, пойкилотермные животные, терморегуляция, фототаксис, тигмотаксис, вялость, экологические требования, географическое разделение.

Принцип работы и Задача

- Проверить температурные требования пойкилотермных животных. С помощью своих терморцепторов животные контролируют температуру; они собираются в месте с оптимальной для них температурой (термотаксис) и таким образом, демонстрируют свою избирательную температуру.
- Получить температурный градиент между приблизительно 45°C и 10°C с помощью кольцеобразного температурного органа.
- Зафиксировать позиции отдельных животных.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Температурный орган	65983.93
6	Лабораторный термометр, -10°C...+50°C	38055.00
2	Резиновая трубка, $d_i = 8$ мм	39283.00
1	Морской песок, очищенный, 1 кг	30220.67
	10-20 насекомых разных видов	
	Опознавательный цвет (например, лак для ногтей)	

Установка

- Температурный орган устанавливается таким образом, чтобы свет распределялся равномерно, например, возле окна. Оборудование подключается к источнику питания и водоснабжения примерно за полчаса – час до начала эксперимента. Выпускаемая охлаждающая вода стекает. По дну температурного органа рассыпают песок и слегка смачивают.

- По одну сторону температурного органа в отверстия вставляют 6 термометров. Для защиты термометров от повреждений на них надевают прозрачный рукав. Температуры шести сегментов органа считываются в короткие промежутки времени, до тех пор, пока не получаются постоянные значения. Эти шесть температур записываются.

Ход работы

- Около 20 насекомых разных видов (по крайней мере, по три особи каждого вида) маркируются цветными точками и помещаются в температурный орган. Крышку из органического стекла помещают на орган таким образом, чтобы нагревательный элемент находился между 6 и 7 сегментом.

- Через полчаса после акклиматизации позиции каждого отдельного насекомого записываются с пятиминутным интервалом в течение одного часа. Из холодной области насекомых, демонстрирующих признаки вялости, перемещают путем осторожного подталкивания.

Рис. 1: Температурный орган



Результаты и оценка

- Температурные требования животных к окружающей их среде сильно отличаются: они варьируются от температуры ниже 0°C для животных Арктики и Антарктики до температуры около 50°C для животных пустынь и животных горячих источников. В этих пределах многие виды предпочитают один диапазон: избирательную температуру. Температурные требования оказывают сильное влияние на распределение видов. Разные избирательные температуры приводят к географическому разделению близкородственных видов.

- Для того чтобы определить избирательную температуру, из 12 значений, записанных для каждого исследованного животного, выбирают среднее значение. Среднее значение всех исследованных особей вида определяет избирательную температуру этого вида.

- Несмотря на то, что избирательная температура для многих животных определяется наследственностью, на нее могут оказать влияние множество факторов: направление падения света, влажность, физический контакт со стеной, время дня, состояние голодания и т.д. Ориентацию животных на свет (фототаксис) можно предотвратить путем обеспечения

равномерного освещения температурного органа (например, установив его возле окна). Ориентацию на градиент влажности можно исключить посредством влажного температурного органа. Во «влажном» органе относительная влажность варьируется только от 90% до 60%, а в сухом органе – от 80% до 30%. В кольцеобразном температурном органе животные могут свободно проходить через холодную область, поэтому они очень редко впадают в оцепенение. Однако, если используется линейный температурный орган, зачастую наблюдается конгрегация животных в углах холодной области за счет тигмотаксиса, что искажает результаты.

5. Оптомоторная реакция насекомых

P4070100

Понятия, относящиеся к теме

Оптомоторная реакция, временная разрешающая способность, сложный глаз, стробоскопический барабан, образцовая частота, лево- и правосторонние движения мух

Принцип и Задача

- Провести поведенческое физиологическое измерение временной разрешающей способности сложного глаза мухи (без электрофизиологических проводников).
- Определить соотношение правых и левых поворотов, совершенных мухой, прикрепленной к центру стробоскопического барабана. Движения (оптомоторная реакция) указывают на то, сможет ли муха разрешить стробоскопический объект при постоянной скорости.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Стробоскопический барабан	65976.00
1	Поддерживающая основа, регулируемая	02001.00
2	Прямоугольный зажим (перекрестный зажим)	02043.00
2	Поддерживающий стержень, $l = 500$ мм, из нержавеющей стали	02032.00
1	Поддерживающий стержень, $l = 250$ мм, из нержавеющей стали	02031.00
1	Универсальный зажим	37715.00
1	Двигатель с держателем диска, 12 В	11614.00
1	Источник питания 0...12 В, 2 А	13505.93
1	Закрывающиеся бутылочки, 60 мл	33623.03
1	Стеклянная трубка, прямая, $l = 80$ мм	36701.65
1	Резиновая трубка, $d_i = 6$ мм	39282.00
1	Сжатый газ, CO ₂ , 12 л	41772.06
1	Клапан точной регулировки	33499.00
1	Железные провода, 140 мм	45286.00
1	Резиновая пробка, $d = 27/21$ мм, с 1 отверстием	39257.01

Количество	Наименование	Код
1	Ножницы, прямые, заостренные, $l = 110$ мм	64623.00
1	Соединительный шнур, 32 А, $l = 750$ мм, красный	07362.01
1	Соединительный шнур, 32 А, $l = 750$ мм, синий	07362.04
1	Ацетон, хим. чистый, 250 мл	30004.25
1	Коробка для выращивания гусениц	64564.00
	Мухи	
	Кубики сахара	
	10-секундный клей	
	Печатная или копировальная бумага	

Подготовка

- В то время как взрослую особь невозможно поймать, мух можно легко вывести из личинок. Личинки мух можно купить в рыболовных магазинах в любое время года. Личинки необходимо купить за две недели до начала эксперимента и поместить в коробку для выращивания гусениц для окукливания и пробуждения. Если поместить в коробку несколько кубиков сахара и блюдце с водой, то мухи могут жить там в течение нескольких недель.

Рис. 1: Экспериментальная установка



- Очень легкий шар, изготовленный из бумажных полосок, помещают в барабан в качестве беговой поверхности («пола») для мух. Шар изготавливается из четырех треугольных кусочков печатной или копировальной бумаги (Рис. 2). Три треугольных кусочка склеиваются вместе концом к концу, образуя угол 120° .

Установка

- Стробоскопический барабан необходимо закрепить в одном из отверстий поддерживающей основы, а со стороны основания необходимо вставить 500 мм поддерживающие стержни (Рис. 1).

- 250 мм поддерживающий стержень необходимо закрепить во втором отверстии поддерживающей основы. Затем, с помощью прямоугольного зажима к этому поддерживающему стержню необходимо прикрепить двигатель таким образом, чтобы приводной ременной шкив двигателя и основа стробоскопического барабана располагались на одном уровне.

- Приводной ремень необходимо установить и натянуть. Для того чтобы сохранить фиксированное расстояние между двигателем и барабаном, поддерживающие стержни, вставленные со стороны поддерживающей основы, необходимо надежно закрепить с помощью желтых рычагов.

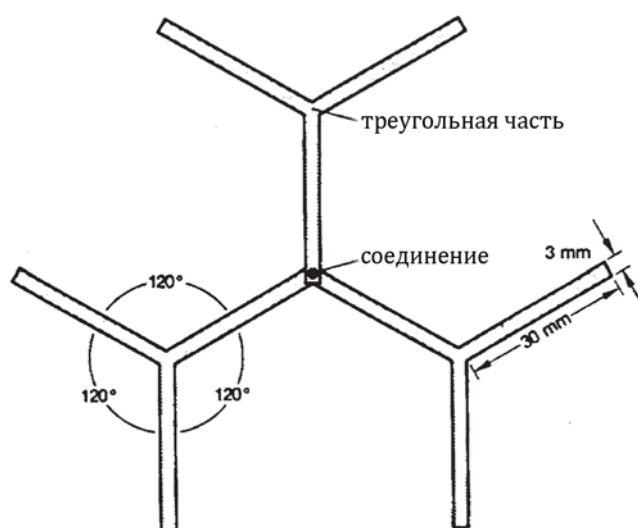
- Двигатель необходимо подключить к выходу постоянного тока источника питания с помощью соединительных шнуров. Источник питания необходимо установить на 0 В/2 А и включить.

Прикрепление мухи к месту:

- Муху анестезируют CO_2 в стеклянной трубке на протяжении минуты: для этого стеклянную трубку закрывают резиновым колпачком, а CO_2 подается через отверстие, немного приподнимая колпачок для того, чтобы воздух мог выходить (Рис. 3).

- Заднюю часть анестезированной мухи обезжиривают небольшим количеством ацетона и приклеивают к железному проводу с помощью капли 10-секундного клея. Муху необходимо прочно удерживать на месте пальцами до тех пор, пока клей полностью не высохнет (1-2 минуты).

Рис. 2: Шарик, изготовленный из бумажных полосок



- Универсальный зажим прикрепляется к стержню в стробоскопическом барабане с помощью прямоугольного зажима (Рис. 4). Железный провод с прикрепленной к нему мухой вклинивают в зажим таким образом, чтобы муха находилась точно в центре барабана.

Ход работы

- Муха сразу же прикрепляется своими лапками к шару и начинает ходить. Муха должна находиться на такой высоте, чтобы шар прокручивался, слегка касаясь дна барабана.

- За мухой наблюдают при выключенном двигателе, а также фиксируют направление, которое она выбирает (правое или левое), для каждого из пересечений шара (по крайней мере, должно быть зафиксировано 20 значений).

- Напряжение регулируется таким образом, чтобы стробоскопический барабан совершал около 25 оборотов в минуту. Выбранное направление фиксируется, по крайней мере, для 20 пересечений.

- Эксперимент повторяют со скоростью около 50, 75 и 100 оборотов в минуту. Более высокие скорости можно легко определить посредством нити для шитья, приклеенной к краю барабана таким образом, чтобы она задевала руку при каждом вращении.

Рис. 3: Анестезирование мухи CO₂



Результаты и Оценка

- Многие насекомые пытаются повторять движения окружающих их объектов не только головой, но и всем телом. Если полосатый стробоскопический рисунок движется слева направо перед головой, то насекомое поворачивает направо. Оптиomotorную реакцию можно использовать для того, чтобы определить скорости, при которых насекомое может воспринимать стробоскопический рисунок. Если стробоскопический барабан неподвижен, количество левосторонних и правосторонних поворотов должно быть равным (случайный выбор движения). При 25 оборотах в минуту влево отношение выбора поворота направо или налево – 20:0, то есть муха все еще хорошо воспринимает стробоскопический рисунок.

Частоту рисунка при этой скорости (= количество полосок, проходящих перед мухой в секунду) можно вычислить по формуле:

$$f[\text{Hz}] = \frac{\text{скорость [об/мин]} \cdot \text{кол-во черных полос барабана}}{60}$$

- Поскольку стробоскопический барабан содержит 180 черных полосок, частота рисунка составляет 75 Гц при 25 оборотах в минуту. При 50 оборотах в минуту (влево) отношение выбора поворота налево или направо - 14:6, а частота рисунка - 150 Гц. При 75 оборотах в минуту (частоте рисунка 225 Гц) муха совершает одинаковое количество левосторонних и правосторонних оборотов. Таким образом, этот результат равен результатам с неподвижным барабаном. Такая частота рисунка уже не воспринимается мухой. Таким образом, временная разрешающая способность глаза мухи составляет около 225 Гц.

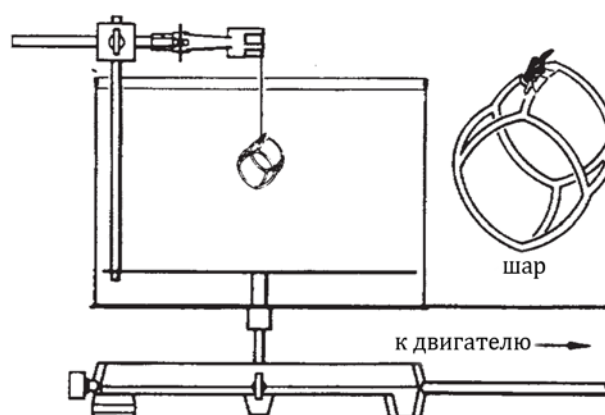


Рис. 4: Прикрепление мухи к месту

- Со 180 черными полосками в окружности барабана, каждая черная полоска (и каждая белая полоска) воспринимается мухой под углом 1°. Этот угол можно изменить путем изменения ширины полосок. Стробоскопические рисунки такого типа можно легко сделать из белой бумаги и черной клейкой ленты.

6. Мера объема дыхания мелких животных

P4090100

Понятия, относящиеся к теме

Поглощение кислорода, мера объема, респирометр, поглощение диоксида углерода, компенсационный сосуд, величина Q_{10}

Принцип работы и Задача

- Измерить поглощение кислорода насекомыми по отношению к температуре окружающей среды и массе тела.
- Мера объема поглощения кислорода животными измеряется посредством спирометра с температурным контролем. Поглощение выдыхаемого углекислого газа с использованием концентрированного раствора гидроксида калия.

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Респирометр, компактная модель	65998.00
1	Погружной термостат, ТС10	08492.93
1	Ванна для термостата, 6 л	08487.02
1	Поддерживающая основа, регулируемая	02001.00
2	Поддерживающий стержень, $l = 250$ мм, из нержавеющей стали	02031.00
1	Прямоугольный зажим (перекрестный зажим)	02043.00
1	Весы SAS 51, 200 г/0,01 г, RS232	45990.93
1	Мерные пипетки, 10 мл	36578.00
1	Пипеттор	36592.00
1	Пинцет, прямой, острый, 120 мм	64607.00
1	Стеклянные бусины, $d = 6$ мм, 850 шт.	36756.25
1	Силиконовая высоковакуумная смазка, 100 г	31863.10
1	Раствор гидроксида калия, 50%, 1 л	30257.70
	Мучные хрущаки или мучные жуки	
	Чернильный раствор	

Установка и Ход работы

- U-образный манометр респирометра (Рис. 2) необходимо наполнить манометрической жидкостью (разбавленным чернильным раствором) на 3 см, используя шприц для подкожных инъекций. Иглу необходимо ввести в U-образную трубку ниже уровня соединительного отверстия в камеру таким образом, чтобы манометрическая жидкость не могла попасть в камеру во время наполнения (силиконовую трубку можно заранее убрать из отверстия). Если присутствуют пузырьки воздуха, их необходимо удалить осторожным нажатием на респирометр.

- Два желоба необходимо удалить из их контейнеров и каждый из них необходимо наполнить 10 мл 50% раствора гидроксида калия. Внимание: гидроксид калия обладает высокой коррозионной стойкостью – используйте грушу для пипеток. Для того чтобы увеличить поглощение углекислого газа, необходимо поместить в желоба с раствором гидроксида калия полоски фильтровальной бумаги.

Рис. 1: Экспериментальная установка



- При перемещении желобов в контейнеры, а также при последующем использовании респирометра, необходимо обеспечить, чтобы перфорированные накладки не были забрызганы раствором гидроксида калия: иначе, подопытные животные сгорят.

- Крепкая игла для подкожных инъекций, с которой соединен 1 мл пластмассовый шприц, через одну из двух резиновых пробок. Шприц наполняется до отметки 1 мл. Стороны двух резиновых пробок слегка смазываются смазкой. Две части силиконовой трубки располагают на соединительном отверстии, оснатив их большим лабораторным зажимом (Рис. 2), но еще не соединив.

- 5 мучных хрущаков взвешивают и помещают в один из двух контейнеров – измерительную камеру – и приблизительно такой же объем стеклянных шариков помещают в другой контейнер – компенсационный сосуд. Измерительная камера является герметичной, благодаря резиновой пробке со вставленным в нее шприцом для подкожных инъекций, а компенсационная камера плотно закрыта другой резиновой пробкой. Затем респирометр осторожно помещают на водяную баню и фиксируют его зажимами и штативами во избежание случайных сдвигов (Рис. 1). Вода должна быть комнатной температуры (значение должно быть записано). После 10-минутной акклиматизации две силиконовые трубки одновременно зажимаются с помощью лабораторного зажима.

Рис. 2: Респирометр



- Теперь респирометр готов к измерениям. В измерительной камере поглощение кислорода в сочетании с поглощением углекислого газа приводит к непрерывному снижению давления. Воздух в компенсационной камере способен расширяться и постепенно оказывает давление на столбец манометра по направлению к измерительной камере.

- Каждые 5 минут на поршень шприца нажимают до тех пор, пока манометр снова не окажется на том же уровне. Объем кислорода, используемый за каждый 5-минутный период, считывается в мл со шкалы шприца и записывается. Спустя час измерения прекращаются, и контейнеры вентилируются путем осторожного открытия лабораторного зажима. Только после этого резиновые пробки можно убрать и животных можно вытащить из измерительной камеры.

- После, по крайней мере, одночасового перерыва эксперимент повторяется с повышением температуры водяной бани на 10°C и с использованием тех же самых 5 мучных хрущаков. Эксперимент также можно повторить и с другими мелкими животными (например, с мучными жуками).

Результаты и Оценка

- Измерение процессов дыхания, то есть определение поглощения кислорода или высвобождения углекислого газа, можно провести как манометрически, так и волюметрически. В манометрическом методе изменения давления измеряются при постоянных объемах, например, по методу Варбурга. Несмотря на то что к волюметрическому методу стоит относиться с осторожностью, изменения в объеме измеряются при постоянном давлении. В респирометре процессы дыхания измеряются волюметрически. Колебания давления воздуха выравняются с помощью компенсационной камеры, а различия в объеме избегают путем использования контейнеров того же объема с аналогичным содержимым (животными, стеклянными бусинами, раствором гидроксида калия).

- Для того чтобы определить поглощение кислорода для каждой температуры и для каждого вида принимается среднее значение 12 объемных измерений. Средние значения преобразуют в мл кислорода в час и г массы тела. Поглощение кислорода на г массы тела для мелких животных всегда выше, чем для более крупных. Поглощение кислорода животными, однако, также зависит от его движений, питания, пола, возраста, гормональных влияний, света и, в частности, от температуры. В физиологическом температурном интервале поглощение кислорода хладнокровными организмами обычно увеличивается, при увеличении температуры на 10°C, на коэффициент 2 или 3 ($Q_{10} = 2$ или 3).

БИОХИМИЯ

7. Титрование различных аминокислот с помощью прибора Cobra4

P4120160

Понятия, относящиеся к теме

Сильные и слабые кислоты, сильные и слабые основания, величина pK_a , величина pK_b , точка эквивалентности, точка полуэквивалентности и изоэлектрическая точка

Принцип работы

В этом эксперименте аминокислоты глицин, пролин, фенилаланин и серин исследуют путем pH титрования. После окисления соляной кислотой и последующего титрования 1-молярным раствором гидроксида натрия карбонильные группы и аминогруппы аминокислот ионизируются, поэтому они превращаются в цвиттер-ион в первой точке эквивалентности и в моноанион соответствующей аминокислоты во второй точке эквивалентности. В результате, аминокислоты, которые сильно отличаются по своей структуре, становятся соизмеримыми. Кроме того, это дает возможность осмыслить процесс титрования на молекулярном уровне и выявить общие черты.



Рис. 1: Экспериментальная установка

Оборудование

Количество	Наименование	Код
1	Беспроводной управляющий прибор Cobra4	12600-00
2	Прибор Cobra4 с беспроводной связью	12601-00
1	Капельница	12636-00
1	Прибор Cobra4 с химическим сенсорным датчиком, pH, двухтемпературный NiCr-Ni	12630-00
1	pH электрод, пластиковый, заполненный гелем, с разъемом BNC	46265-15
1	Программное обеспечение «Измерение Cobra4»	14550-61
2	Держатель для прибора Cobra4 с поддерживающим стержнем	12680-00
1	Магнитная мешалка, мини, пластиковая, темно синяя	47334-93
1	Бюретка, 50 мл, градуированная 0,1 мл	47151-01
1	Зажим для бюретки с направляющим роликом	37720-01
1	Штатив, 210 мм × 130 мм, h = 500 мм	37692-00
1	Стержень магнитной мешалки, 30 мм, цилиндрический	46299-02
2	Перекрестный зажим	37697-00
1	Стакан, 100 мл	46053-00
1	Набор, включающий в себя прецизионные весы и программное обеспечение Sartorius, 230 V, 4210 г/0,001 г	49223-88
1	Микроложка	33393-00
1	Стекло для часов	34570-00
1	Воронка	34458-00
4	Мерная колба, 50 мл	36547-00
1	Градуированная пипетка, 5 мл	36599-00
1	Пипеттор	47127-01
11	Промывалка, пластиковая, 500 мл	33931-00

Количество	Наименование	Код
1	Глицин (гликокол), 100 г	31341-10
1	Буферный раствор, рН 4.01, 1000 мл	46270-12
1	Буферный раствор, рН 10.01, 1000 мл	46272-12
1	Раствор гидроксида натрия, 1.0 м, 1000 мл	48329-70
1	Соляная кислота, 1.0 моль/л, 1000 мл	48454-70
1	Дистиллированная вода, 5 л	31246-81

Дополнительное оборудование

Количество	Наименование	Код
	Персональный компьютер с версией программного обеспечения Windows® XP или более новой	
	Фенилаланин	
	Серин	
	Пролин	
	Вода	

Информация по технике безопасности

Всегда носите подходящие защитные перчатки, очки и одежду при работе с химикатами. В приложении Вый найдете более подробную информацию, касающуюся различных химикатов.



Задачи

1. Записать кривые титрования различных аминокислот и дать объяснение отдельным секциям.
2. Выявить различия и сходства между аминокислотами.

Установка и Подготовка

- Установите эксперимент как показано на Рисунке 1. Это значит, что капельницу, а также сенсорный датчик рН необходимо подключить к компьютеру через прибор с беспроводной связью и управляющий прибор. Необходимо поместить стакан на магнитную мешалку и расположить оборудование таким образом, чтобы сенсорный датчик рН, а также кончик бюретки были направлены в стакан через капельницу.

- Подготовьте 50 мл окисленного аминокислотного раствора ($C_{HCL} = C_{\text{аминокислоты}} = 0,1$ моль/л). Для того чтобы выполнить это, необходимо последовательно взвесить 0,378 г глицина, 0,826 г фенилаланина, 0,576 г пролина и 0,525 г серина. Затем необходимо поместить каждую аминокислоту в отдельную мерную колбу через воронку.

- Необходимо добавить 50 мл 1-молярной соляной кислоты в мерные колбы и наполнить их до отметки 50 мл.

- Аминокислоты должны полностью раствориться.

- Поместите стержень магнитной мешалки в стакан (100 мл), добавьте туда содержимое одной из мерных колб, поместите стакан на магнитную мешалку и включите ее.

- Заполните бюретку 20 мл 1-молярным раствором гидроксида натрия через воронку. Перед тем как это выполнить, проверьте, закрыт ли запорный кран бюретки.

Ход работы

- Включите персональный компьютер.
- Соедините беспроводной управляющий прибор Cobra4 с USB выходом персонального компьютера.
- Запустите программное обеспечение «измерение» на персональном компьютере.
- Соедините прибор Cobra4 с химическим сенсорным датчиком с прибором Cobra4 с беспроводной связью и подключите их к рН электроду.

Подсказка: В качестве прибора с химическим сенсорным датчиком можно использовать прибор с сенсорным датчиком рН.

- Соедините капельницу со вторым прибором с беспроводной связью.
- Включите оба прибора с беспроводной связью и дождитесь, когда программа распознает измерительный сенсор. Выберите «Неизвестный объем титрования» через капельницу (см. Рис. 2).
- Программа автоматически создаст виртуальный канал для определения объема.

- Перед тем как начать эксперимент, температурные разъемы прибора Cobra4 с химическим сенсорным датчиком необходимо выключить. Для того чтобы выполнить это, выберите «Температура Т1», а затем «Температура Т2» в «Навигаторе» и переключите их в «неактивный» режим убрав галочку с активного поля (см. Рис. 3).

- Запустите процесс записи измеряемых данных в «измерение» ●. Затем, начните титрование, осторожно открыв запорный кран бюретки. Скорость падения должны быть низкой, максимум одна капля в секунду.
- После окончания титрования остановите процесс записи измеряемых данных (■).
- Введите данные о количестве использованного гидроксида натрия в появившееся окно и подтвердите значение.

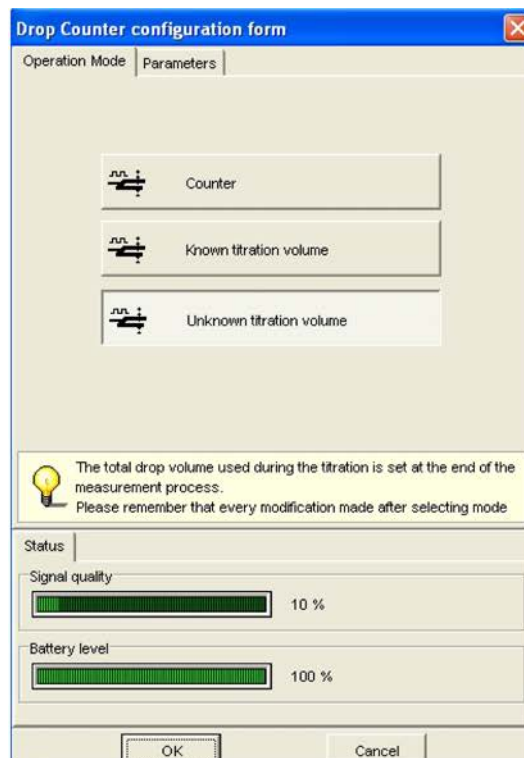


Рис. 2: Обзор капельницы, определяющей объем титрования

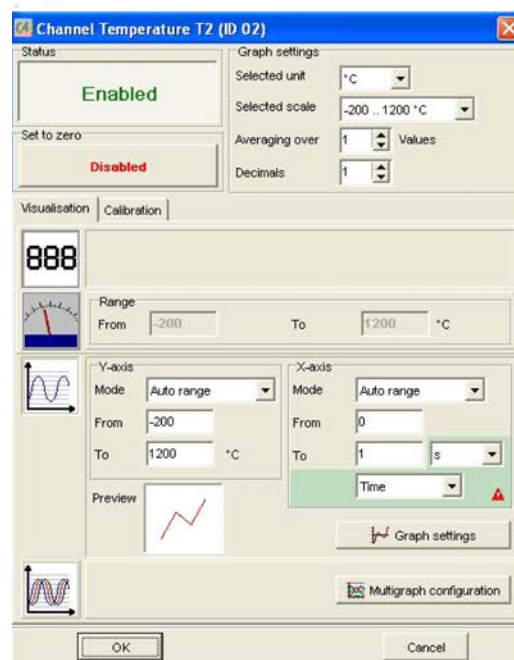


Рис. 3: Окно канала измерения температуры

- После отображения графика необходимо немного подождать, пока программа завершит расчет данных, и ось у будет адаптирована соответствующим образом (нажмите на график).

- Значение рН можно графически отобразить в виде функции объема в «измерении» (скопируйте данные из расчетной таблицы → в «измерение» → Измерение → Импорт значений измерения...).

- Дважды щелкните на график, чтобы изменить оси.

Наблюдения и Результаты

На Рис. 5 изображен график титрования глицина. Кривые для пролина, серина и фенилаланина были записаны одинаково. Их полный расчет можно увидеть на Рис. 10, 11, 12 и 13.

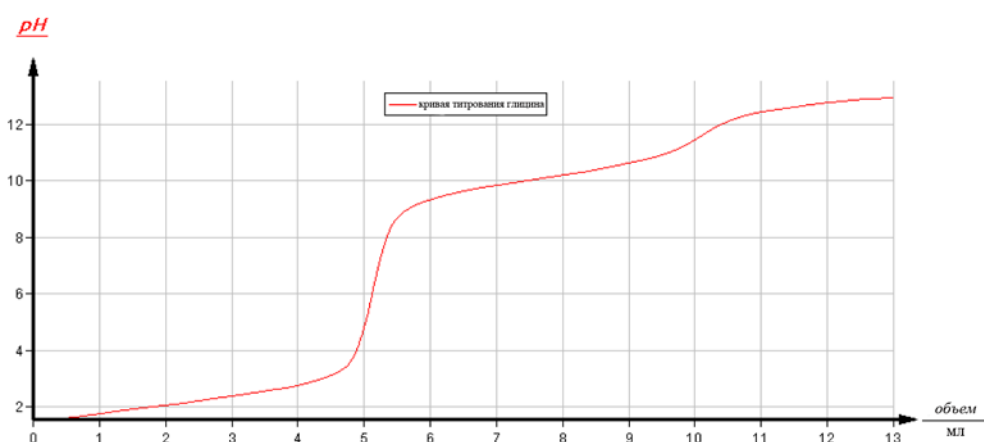


Рис. 4: Кривая титрования глицина

Оценка

На кривой должны быть отмечены следующие точки:

- 1-ая величина pK_a
- 1-ая точка эквивалентности (1-ая ТЭ)
- 2-ая величина pK_a
- 2-ая точка эквивалентности (2-ая ТЭ)

Для того чтобы выполнить это, щелкните на клавишу для определения точки эквивалентности на панели инструментов (см. на стрелку на Рис. 5). Затем, выберите все опции и закройте окно (Рис. 5).

Следующий раздел включает в себя объяснение кривой титрования с двумя точками эквивалентности на примере глицина.

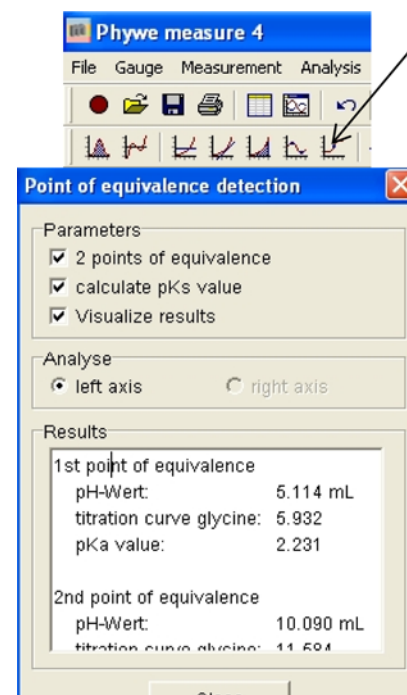


Рис. 5: Сверху: Клавиша для расчета точки эквивалентности
Снизу: Таблица для расчета точки эквивалентности



Рис. 6: Схематическая диаграмма кривой титрования с двумя ТЭ

В начале измерения аминокислота присутствует в кислотной среде. Из-за избытка протонов образуется катион аминокислоты (см. Рис. 7, область а).

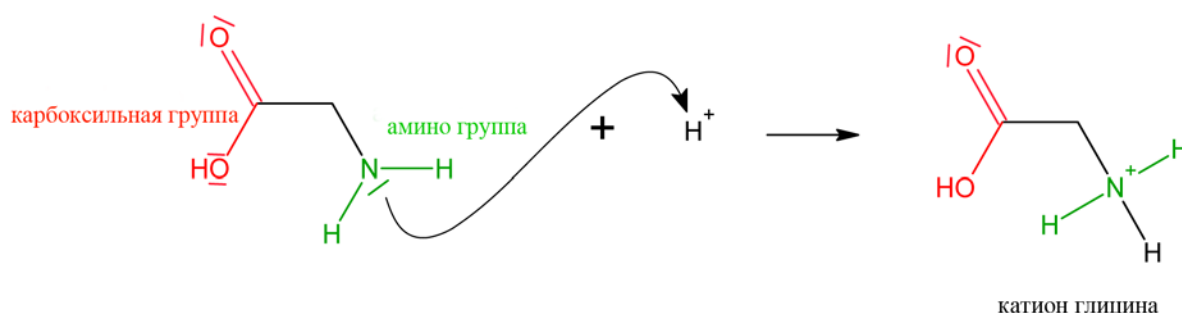


Рис. 7: Аминокислота в начале измерения

При добавлении раствора гидроксида натрия число гидроксид-ионов увеличивается, тем самым приводя к образованию цвиттер-ионов аминокислоты. В первой точке эквивалентности все молекулы аминокислоты присутствует в виде цвиттер-ионов (см. Рис. 7, область 1-ой ТЭ).

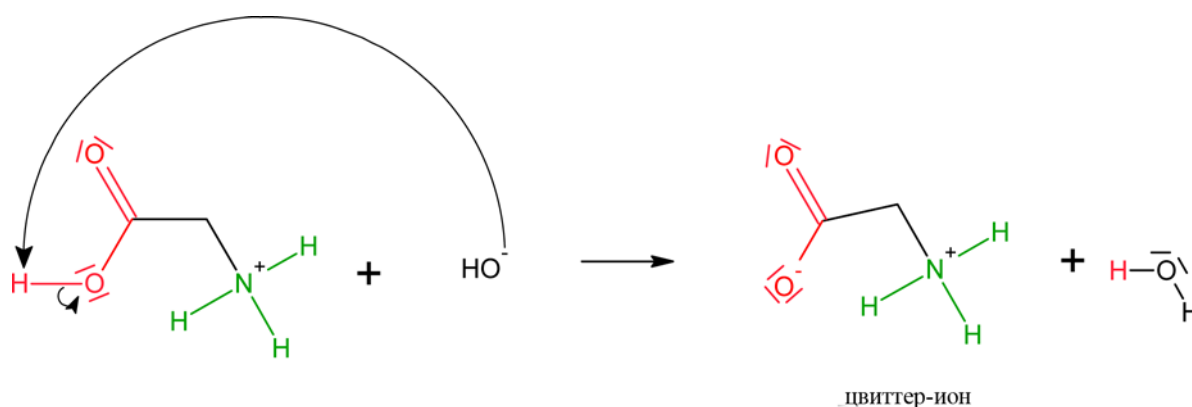


Рис. 8: В первой точке эквивалентности молекула аминокислоты присутствует в виде цвиттер-иона

После первой точки эквивалентности наблюдается избыток гидроксид-ионов, который способствует тому, чтобы цвиттер-ион высвободил протон, тем самым образовав воду. В результате образуется глицинат-моноанион (см. Рис. 7, область b).

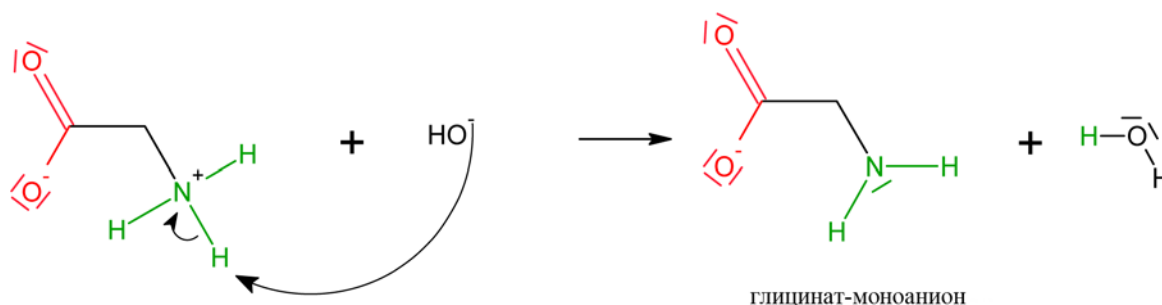


Рис. 9: После первой точки эквивалентности молекула аминокислоты присутствует в виде моноаниона

Во второй точке эквивалентности все молекулы аминокислоты присутствуют в виде глицинат-моноанионов. С этой точки значение pH увеличивается в связи с продолжающимся добавлением гидроксид-ионов (см. Рис. 7, область c).

В точке эквивалентности кислотно-щелочного титрования присутствуют количества эквивалентных веществ кислоты и основания, которые участвуют в титровании.

Изоэлектрическая точка титрования аминокислот достигается при значении pH, которое появляется, когда количество кислотных групп с отрицательным зарядом соответствует количеству кислотных групп с положительным зарядом. В этой точке суммарный заряд молекул нейтрален.

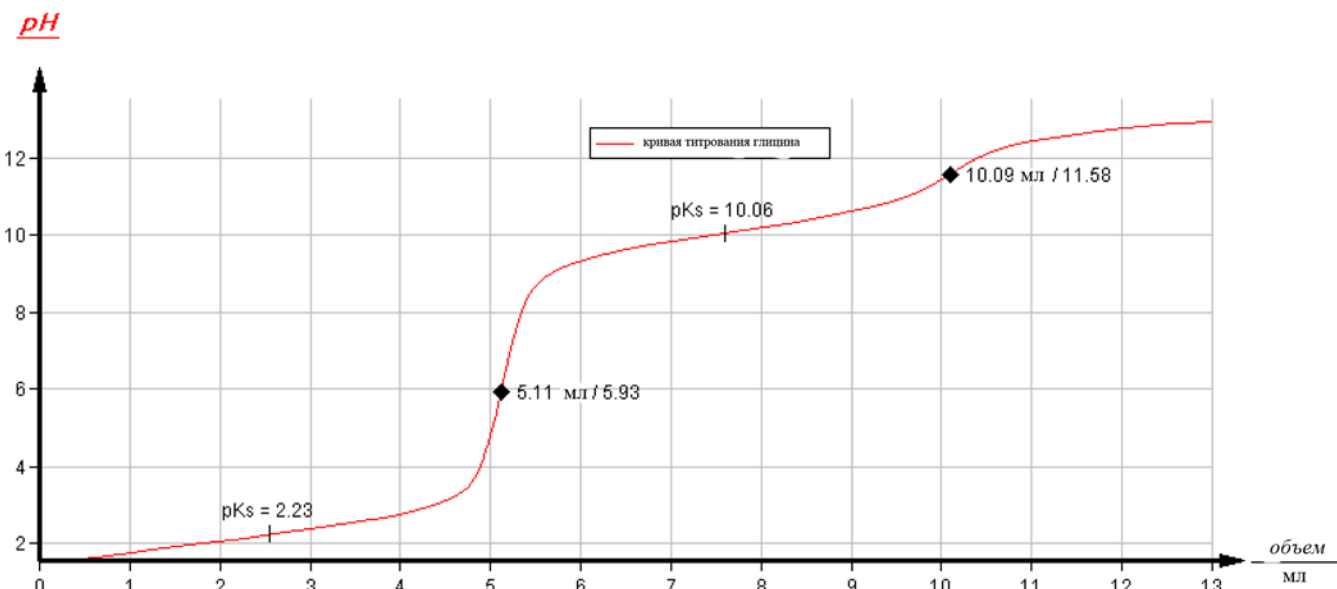


Рис. 10: Кривая титрования глицина с данными для значений pKa и точками эквивалентности

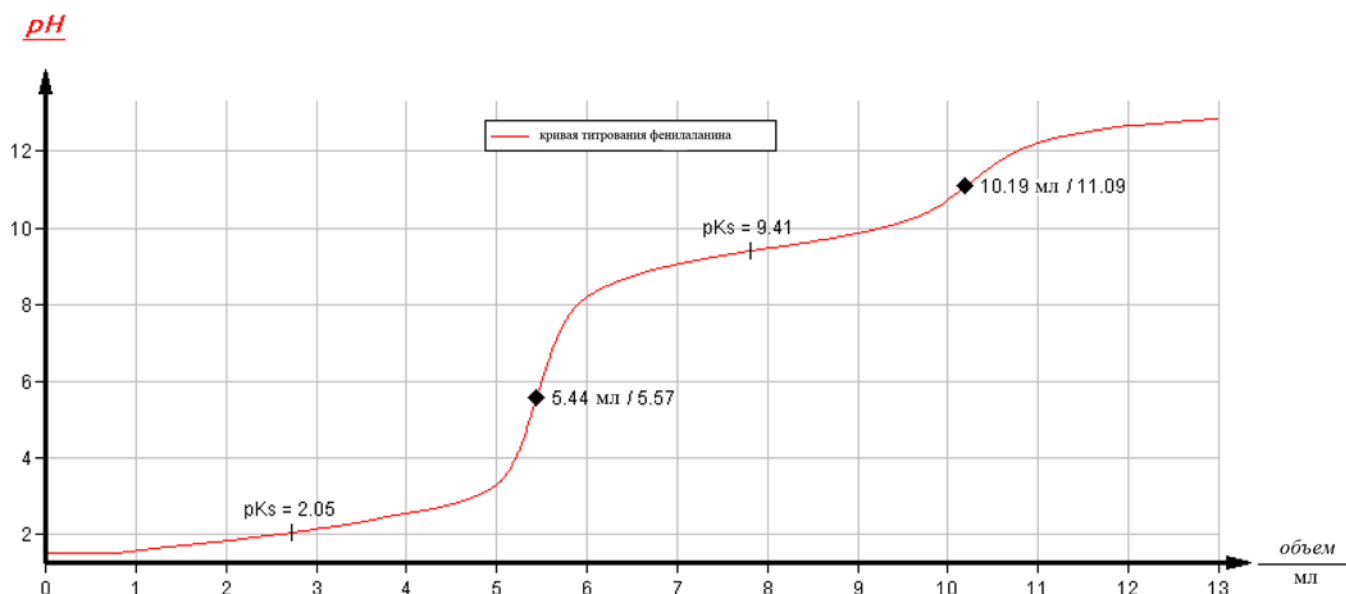


Рис. 11: Кривая титрования фенилаланина с данными для значений рКа и точками эквивалентности

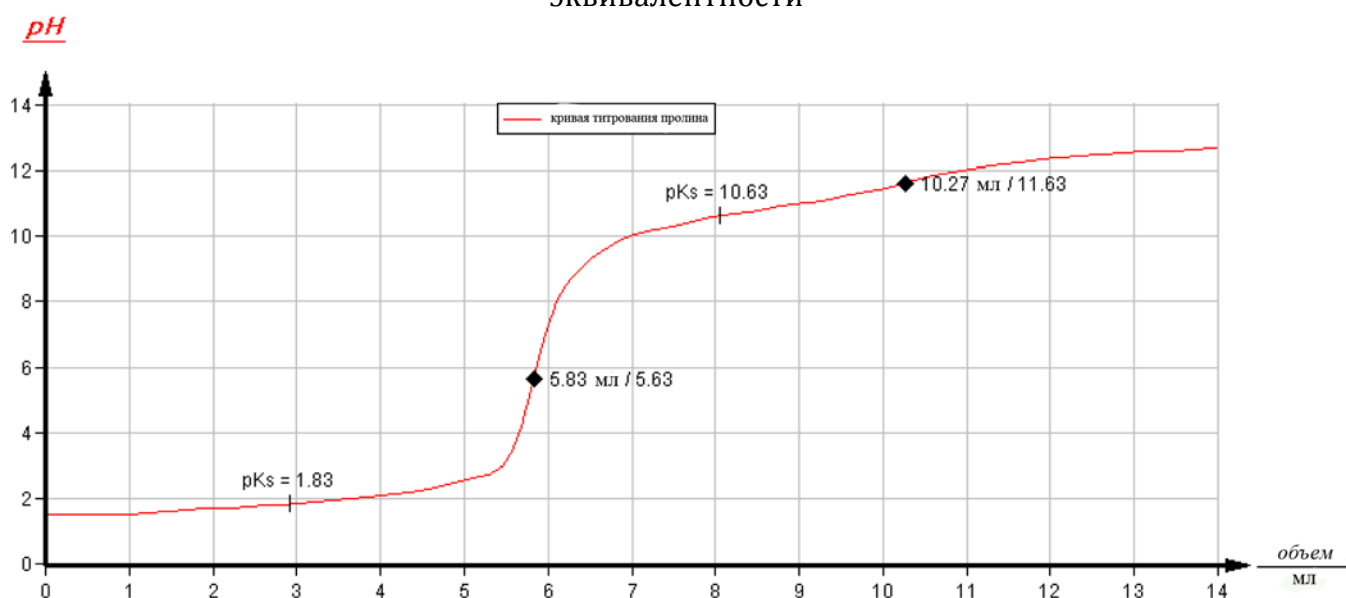


Рис. 11: Кривая титрования пролина с данными для значений рКа и точками эквивалентности

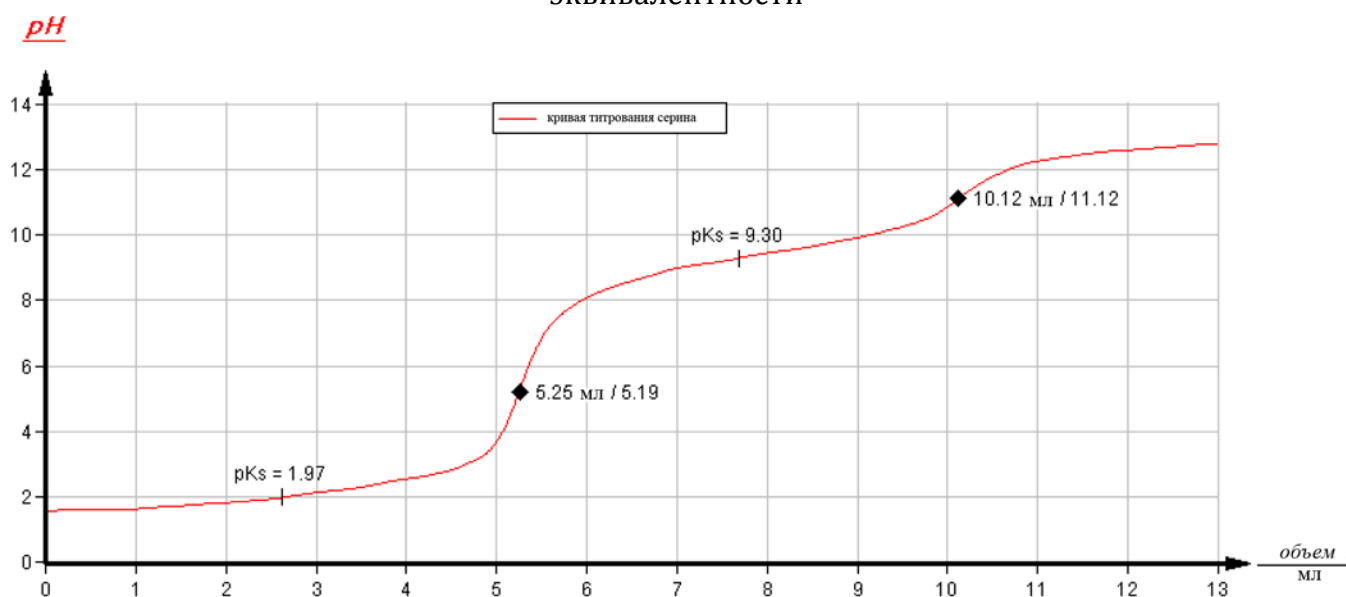


Рис. 11: Кривая титрования серина с данными для значений рКа и точками эквивалентности

Приложение

Значок опасности, сигнальное слово	Информация об опасности	Информация по технике безопасности
Вода		
-	-	-
Глицин		
-	-	-
Фенилаланин		
-	-	-
Серин		
-	-	-
Пролин		
-	-	-
Соляная кислота		
 <p>Опасность</p>	<p>H314: Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. H335: Может вызывать раздражение дыхательных путей.</p>	<p>R261: Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распылённом состоянии. R280: Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица. R305+R351+R338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. R310: Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к доктору/врачу.</p>
Раствор гидроксида натрия		
 <p>Опасность</p>	<p>H314: Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.</p>	<p>R280: Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица. R305+R351+R338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. R310: Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к доктору/врачу.</p>

ДЛЯ ЗАМЕТОК

КОНТАКТЫ

Разработчик методических рекомендаций –

компания «Нобель Технологии»

Адрес: 127273 Россия, г. Москва, ул. Олонецкая, д.23

**По всем вопросам, связанным с проведением экспериментов и оборудованием,
просьба обращаться по электронной почте:**

experiment@nobeltechno.com