

Praktická cvičení z chemie a biologie pro středoškolské studenty

LUDMILA ZAJONCOVÁ A VLADIMÍR VINTER

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta

Olomouc 2013

Oponenti: Mgr. Lada Macháčová
Mgr. Lenka Metlíková



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv
a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

1. vydání

© Ludmila Zajoncová, Vladimír Vinter, 2013

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2013

ISBN 978-80-244-3650-0

Obsah

Předmluva	5
-----------------	---

Bezpečnost práce v laboratořích Přírodovědecké fakulty UP Olomouc.....	7
--	---

CHEMICKÁ ČÁST

Praktická cvičení z chemie 1.....	11
-----------------------------------	----

1 Odměřování v chemii	11
1.1 Váhy a vážení	11
1.2 Odměřování roztoků	11
1.3 Experimentální část	13
2 Spektrofotometrie.....	14
2.1 Teoretický úvod.....	14
2.2 Experimentální část	16
3 Tenkovrstevná chromatografie	17
3.1 Teoretický úvod.....	17
3.2 Experimentální část	18
4 Enzymologie.....	20
4.1 Teoretická část	20
4.2 Experimentální část	21

Praktická cvičení z chemie 2.....	23
-----------------------------------	----

1 Stanovení lipofilních listových barviv pomocí adsorpční chromatografie	23
1.1 Teoretická část	23
1.2 Experimentální část	24
2 Stanovení proteinů	25
2.1 Teoretická část	25
2.2 Experimentální část	25
3 Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku a stanovení proteinů v homogenátu.....	27
3.1 Teoretická část	27
3.2 Experimentální část	27
4 Stanovení pH roztoků	27
4.1 Teoretický úvod.....	27
4.2 Experimentální část	28

Praktická cvičení z chemie 3	31
1 Odměřování v chemii	31
2 Izolace DNA z vepřové sleziny a důkaz DNA	31
2.1 Teoretický úvod	31
2.2 Experimentální část	33
3 Nativní elektroforéza izoenzymů peroxidasy	34
3.1 Teoretický úvod	34
3.2 Experimentální část	35
4 Metoda odhalování otisků prstů pomocí ninhydrinu	36
4.1 Teoretický úvod	36
4.2 Experimentální část	37
5 Důkaz krevních stop na místě činu pomocí luminolu	38
5.1 Teoretický úvod	38
5.2 Experimentální část	38

BIOLOGICKÁ ČÁST

Praktická cvičení z biologie 1 – Zkoumáme stavbu rostlin	43
1 Pozorujeme fytolity v rostlinných pletivech	43
1.1 Teoretický úvod	43
1.2 Postup práce	45
2 Pozorujeme stomata v listové epidermis	46
2.1 Teoretický úvod	46
2.2 Doporučené náměty (úkoly)	49
3 Jak rozlíšíme dřevo jehličnanů a listnáčů	53
3.1 Teoretický úvod	53
3.2 Postup	54
4 Určujeme borovice podle anatomické stavby jehlic	55
4.1 Teoretický úvod	55
4.2 Postup	56
Praktická cvičení z biologie 2 – Zkoumáme rostliny v okolí školy	58
1 Rostliny jako indikátory znečištění životního prostředí	58
1.1 Teoretický úvod	58
1.2 Postup	58
2 Srovnáváme genetické spirály dřevin	60
2.1 Teoretický úvod	60
2.2 Postup	61
3 Měříme hmotnost stromu	61
3.1 Teoretický úvod	61
3.2. Postup	61

Předmluva

Cílem projektu Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů – Přírodní vědy v 21. století, řešeného v rámci Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost, je podpořit zájem středoškolských studentů o přírodní vědy, především chemii a biologii, a zvýšit kvalitu vzdělávání v těchto oborech. Výstupem je sada experimentů z chemie a biologie na tři různá témata pro soutěže školních kolektivů, kolekce experimentů vhodných pro praktická cvičení středoškolských studentů pořádaná na pracovištích vysoké školy a soubor přednášek, které proběhly během projektu pro středoškolské pedagogy.

V rámci projektu byla vytvořena troje skripta na tři různá témata pro práci přírodovědných kroužků na středních školách, dále skriptum experimentů, které mohou studenti provádět v laboratořích vysoké školy, a miniskriptum přednášek pro středoškolské pedagogy. Skripta jsou určena středoškolským pedagogům pro obohacení experimentální výuky v předmětech chemie a biologie a pro práci přírodovědných kroužků.

Olomouc, 2013

doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
hlavní řešitelka projektu

Bezpečnost práce v laboratořích Přírodovědecké fakulty UP Olomouc

V laboratořích Přírodovědecké fakulty UP Olomouc platí všeobecná pravidla pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.

Všeobecná bezpečnostní pravidla

1. V laboratořích platí zákaz jídla, pití a kouření.
2. Vzhledem k používaným látkám v laboratoři nemohou pracovat těhotné ženy. Případné těhotenství je potřeba hlásit vedoucímu praktického cvičení a cvičení se neúčastnit.
3. Práce s organickými rozpouštědly, se žíravými a toxickými látkami se provádí pouze ve funkčních digestořích.
4. Chemikálie se skladují pouze na místech k tomu určených v souladu s Provozním řádem jednotlivých kateder.
5. Při práci v laboratoři musí pracovníci používat vhodné pracovní pomůcky v závislosti na charakteru prováděných prací. Minimum je pracovní oděv a obuv, vyžaduje-li to charakter práce pak také ochranné brýle, rukavice. V každé laboratoři musí být dále k dispozici ochranný štít a v případě potřeby maska.
6. Vyžaduje-li to charakter práce v laboratoři, musí si všichni pracovníci chránit oči brýlemi (speciálními či dioptrickými). Při práci s vakuem pak používat ochranné brýle nebo štít.
7. Potřísnění kyselinami či bázemi se odstraňuje oplachováním velkým množstvím vody. Pokud se pracuje v laboratoři s bromem, musí být předem připraven 2% roztok thiosíranu sodného, kterým se nejprve zasažené místo opláchne a pak se používá k oplachu voda. Podle charakteru práce v dané laboratoři je pak povinností vedoucího praktického cvičení zajistit před zahájením práce i jiné detoxikační či sanační roztoky.
8. Za obecné dodržování předpisů BOZ, požárních, hygienických předpisů a správné uchovávání chemikálií v laboratoři odpovídá vedoucí praktického cvičení. Ostatní pracovníci a jiné osoby (návštěvy apod.) jsou povinni dodržovat jeho pokyny.

9. Vedoucí praktického cvičení je zodpovědný za veškeré vybavení laboratoře a také za bezpečný provoz a pravidelné kontroly elektrických přístrojů.
10. V případě, že student porušuje bezpečnostní předpisy, je vedoucí praktického cvičení nucen vyloučit studenta z výuky.
11. Povinnost všech pracovníků je hlásit bez prodlení vedoucímu praktického cvičení veškeré závady na zařízení a zejména veškerá drobná poranění, poleptání či nevolnosti a všechny jiné mimořádné události vzniklé během práce v laboratoři. Vedoucí praktického cvičení je povinen zaznamenávat tyto nehody či úrazy do evidovaného sešitu (na sekretariátu katedry či jiného pracoviště PŘF UP Olomouc), v případě nehody vyplnit zvláštní formulář a hlásit nehodu vedoucímu katedry nebo jeho zástupci.
12. Při odchodu z laboratoře, musí být tato v takovém stavu, aby nemohlo dojít k jejímu poškození v době nepřítomnosti pracovníků. To znamená, že každý pracovník je před odchodem povinen ukončit či přerušit své pokusy tak, aby zůstaly v bezpečném stavu a vypnout všechny přístroje, jejichž provozní podmínky to dovolují, a energie, které používal. Vedoucí praktického cvičení je povinen zkontrolovat vypnutí všech elektrických přístrojů a spotřebičů, jejichž provozní podmínky to dovolují, uzavření všech přívodů energií a vody, dále případně uzavřít okna a místnost zavřít.

Výuka studentů

13. Studenti mohou pracovat v laboratořích PŘF UP Olomouc v rámci laboratorních praktických cvičení, kdy za dodržování bezpečnostních zásad odpovídá pověřený vedoucí praktického cvičení.
14. Studenti musí být před zahájením práce prokazatelně proškoleni. Za to odpovídá vedoucí praktického cvičení. Záznamy o proškolení se ukládají na sekretariátech příslušných pracovišť PŘF UP Olomouc.
15. Studenti smí provádět pouze laboratorní experimenty nařízené či schválené vedoucím praktického cvičení, jiné laboratorní pokusy jsou nepřipustné.
16. Vedoucí praktického cvičení může při opakovaném nedodržování bezpečnostních pokynů a pravidel vykázat studenta z laboratoře. Tuto skutečnost pak ohlásí pedagogovi střední školy, který studenty na praktická cvičení doprovází.

CHEMICKÁ ČÁST

Ludmila Zajoncová

Praktická cvičení z chemie 1

1. Odměřování v chemii
2. Spektrofotometrie
3. Tenkovrstevná chromatografie
4. Enzymologie

1 Odměřování v chemii

1.1 Váhy a vážení

Ke stanovení váhového množství látky se používají v chemické laboratoři váhy. Princip vážení je porovnání neznámé hmotnosti předmětu (navažovací lodička, vzorek) se známou hmotností standardu (závaží). Mechanické zařízení je založeno na docílení rovnováhy na páce a má tvar známých miskových vah. Na stejném principu byly dříve konstruovány i analytické váhy (postupné přidávání závaží).

V současné době se již užívají jednomiskové váhy používající promítací stupnice na stínítko. V laboratoři se používají pro přesné navážení látek analytické váhy a pro méně přesné vážení předvážky.

1.2 Odměřování roztoků

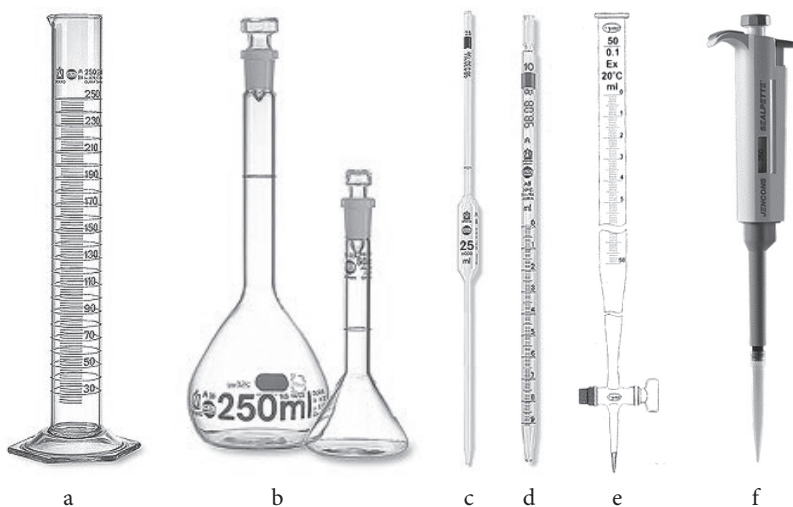
K odměřování objemů kapalin slouží odměrné válce, pipety, byrety a odměrné baňky (Obr. 1).

Odměrné válce (Obr. 1a) se používají jen k přibližnému odměřování kapalin. Na přesnější měření objemů se používají pipety buď pouze pro určitý objem, nebo dělené pipety, a byrety, u nichž je možno kohoutkem regulovat vytékání kapaliny. Při plnění pipet je třeba vždy dbát toho, aby ústí pipety bylo stále ponořeno pod hladinou kapaliny (jinak by se nasál vzduch do pipety). Po nasátí kapaliny nad rysku označující požadovaný objem uzavřeme horní konec pipety ukazovákem – ne palcem. A opatrným uvolňováním prstu po kapkách vypouštíme kapalinu. Při odečítání je nutno mít oko ve stejné úrovni se značkou. Odečítáme vždy spodní okraj menisku. Tyto skleněné pipety, do kterých se nasává tekutina ústy nebo pomocí

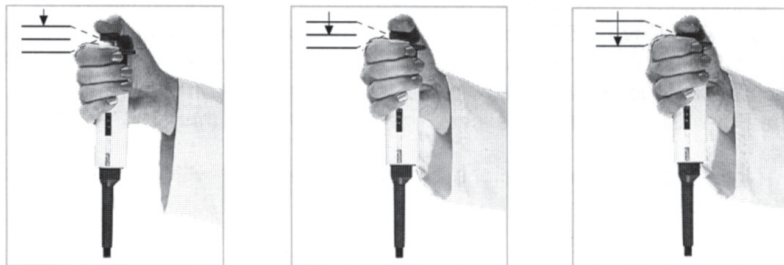
balonku, se dnes už v moderních laboratořích nepoužívají, jsou nahrazeny automatickými pipetami, které mohou být konstruovány na určitý fixní objem nebo jsou nastavitelné v určitém rozsahu objemů.

Automatické pipety jsou vyráběny pro různé rozsahy objemů (5–1 ml, 1000–200 μ l, 200–20 μ l, 20–2 μ l a 2–0,2 μ l). Objem se nastavuje otočením šroubu na stupnici. Nasávání a vypouštění kapaliny přes nasaditelnou špičku je ovládáno pístem, který má tři polohy – klidovou, pro nasávání a pro vypouštění (Obr. 2).

Odměrné baňky (Obr. 1b), stejně jako pyknometry, jsou kalibrovány na dolití – to znamená, že při jejich naplnění obsahují právě požadovaný objem. Hrdlo odměrných baněk je poměrně úzké a je opatřené ryskou. Plní se tak, aby se spodní okraj menisku dotýkal rysky a při plnění musíme mít oko v úrovni rysky. Odměrné baňky se vyrábějí v objemech od 5 ml do 2 l. Odměrné baňky se používají k přípravě roztoků o přesné koncentraci. Byrety, sloužící k odběru kapalin při titracích (Obr. 1e), jsou skleněné trubice opatřené dělicími značkami. Před výtokem je umístěn kohoutek nebo pružná tlačka s hadičkou.



Obr. 1 Pomůcky k měření objemů (a – odměrný válec, b – odměrná baňka, c – skleněná pipeta nedělená, d – skleněná pipeta dělená, e – byreta, f – automatická pipeta) (převzato ze skript Galuszka P. a Luhová L.: Laboratorní technika)



Obr. 2 Práce s automatickou pipetou (převzato ze skript Galuszka P. a Luhová L.: Laboratorní technika)

1.3 Experimentální část

V praktické části cvičení se seznámíte s analytickými váhami a naučíte se vážit na předvážkách. Vaším úkolem bude co nejpresněji napipetovat 10×5 ml (resp. 1 ml) destilované vody do kádinky. Hustotu vody budeme pro jednoduchost považovat rovnu 1 g/ml. Počet gramů bude odpovídat počtu odměřených ml.

Na začátku měření si zvažte prázdnou suchou kádinku (váhu kádinky si zaznamenejte do tabulky). Poté napipetujte 10×5 ml nebo 10×1 ml do kádinky. Poté předvážky vynulujte a zvažte kádinku s napipetovanou vodou. V tabulce odečtete váhu kádinky. Vypočtete chybu stanovení.

Tabulka 1: Pipetování

Hmotnost kádinky (g)	
Hmotnost kádinky a vody (g)	
10×1 ml	10×5 ml
Hmotnost vody (g)	
Chyba stanovení (%)	

2 Spektrofotometrie

2.1 Teoretický úvod

Viditelné záření tvoří malý úsek z oblasti elektromagnetického vlnění v rozmezí vlnových délek 400–700 nm. Přilehlá oblast rozmezí vlnových délek 200–400 nm se nazývá blízká ultrafialová oblast, 700–2000 nm se pak nazývá blízká infračervená oblast. Celá oblast vlnových délek se také nazývá oblastí elektronových spekter.

Přístroje, které měří spektrální veličiny, se nazývají spektrofotometry. Téměř všechny biologicky zajímavé látky kromě sacharidů mají v oblasti UV-VIS (200–700 nm) charakteristické absorpční pásy a jejich koncentrace se tak dá stanovit na základě jejich spektrálních vlastností.

Interakci záření s atomy a molekulami dochází k jeho absorpci, tj. k přijetí kvanta energie, a atom nebo molekula se dostane do excitovaného stavu. Interakce záření s hmotou se sleduje na absorpčním spektru (závislosti množství absorbovaného záření na jeho vlnové délce).

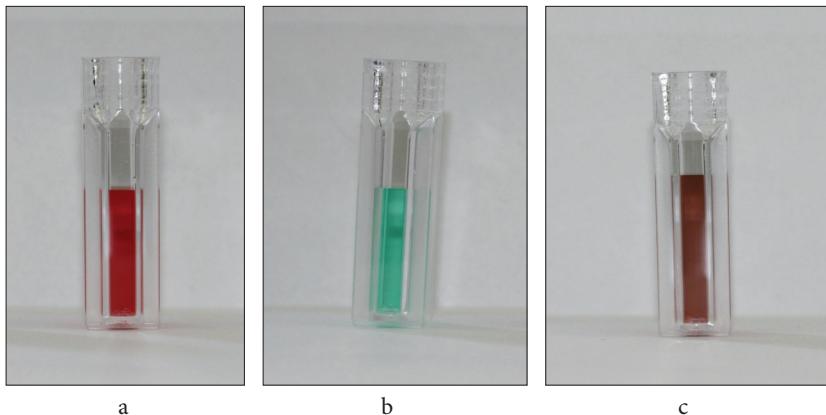
Vztah mezi absorbancí a koncentrací látky vyjadřuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

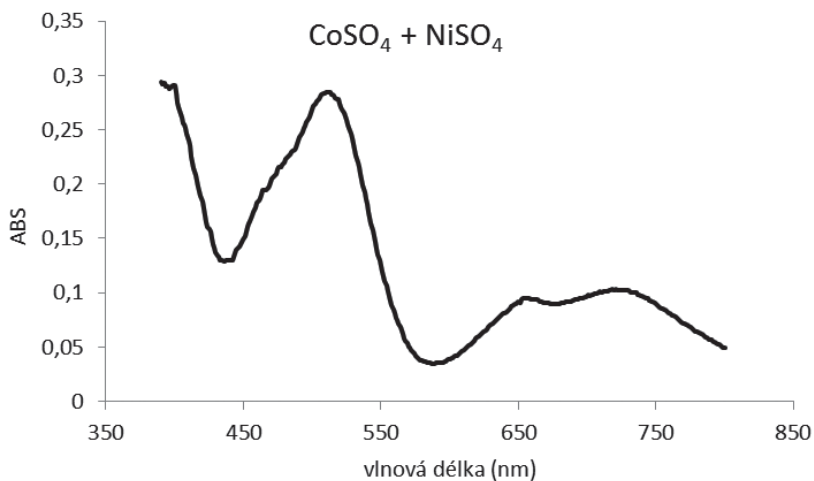
- A** absorbance, bezrozměrná veličina
- l** délka kyvety, ve které se měří (obvykle 1 cm)
- c** koncentrace látky v mol.l⁻¹
- ε** konstanta úměrnosti, molární absorpční koeficient

Při měření koncentrace látek se porovnává intenzita paprsku, který není oslaben absorpcí (referenční), a paprsku, který prošel kyvetou se vzorkem. V laboratořích se běžně používají jednopaprskové přístroje, kdy se nejprve proměří absorbance referenčního vzorku a poté se proměří absorbance vzorku. Moderní spektrofotometry uloží intenzitu záření referenčního vzorku (jinak také slepý vzorek či blank) do paměti přístroje a při proměřování vzorků se pak na display objevují hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků. V praktickém cvičení budeme stanovovat koncentraci nikelnatých iontů v neznámém vzorku. Nikelnaté ionty absorbují světlo při vlnové délce 700 nm, protože barva jejich roztoku je zelená (Obr. 3). Pomocí absorpčních spekter lze zjistit, zda se jedná o jednu látku nebo směs dvou látek.

Příkladem je směs nikelnatých a kobaltnatých iontů, která má dvě absorpční maxima (500 a 700 nm), z nichž jedno patří kobaltnatým iontům a druhé nikelnatým (Obr. 4).



Obr. 3 Roztoky Co^{2+} (a), Ni^{2+} (b) a směs Co^{2+} a Ni^{2+} (c) v spektrofotometrických kyvetách (foto autor)



Obr. 4 Spektrum směsi 0,5 M CoSO_4 a 0,5 M NiSO_4 ve vodě. První vrchol patří CoSO_4 (asi 500 nm) a druhý NiSO_4 (asi 700 nm) (zdroj autor)

2.2 Experimentální část

Úkol: Stanovení koncentrace Ni^{2+} v neznámém vzorku

Laboratorní materiál: kyvety, kádinky, velké zkumavky, pipety.

Chemikálie: 0,5 M síran nikelnatý, 0,5 M chlorid kobaltnatý.

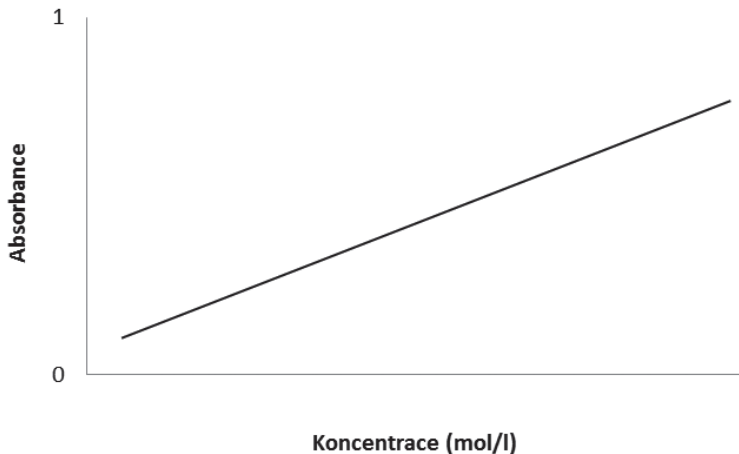
Přístroje: spektrofotometr.

Pracovní postup:

Připravte si sadu 5 roztoků síranu nikelnatého o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 a 0,3 M přesným ředěním zásobního roztoku o koncentraci 0,5 M. Postupujte tak, že do zkumavek napipetujete automatickou pipetou 5 ml vypočtené množství zásobního roztoku 0,5 M síranu nikelnatého podle tabulky 2 a přidejte odpovídající množství vody opět dle tabulky 2. Roztoky promíchejte na vortexu. Poté na spektrofotometru proměříte absorbanci připravených vzorků a zapíšete do tabulky 2.

Tabulka 2: Spektrofotometrické stanovení nikelnatých iontů.

Koncentrace Ni^{2+} (mol.l^{-1})	0,5 M NiSO_4 (ml)	H_2O (ml)	A
0,500	–	–	
0,300	6	4	
0,200	4	6	
0,100	2	8	
0,050	1	9	
0,025	0,5	9,5	
NV č.	–	–	



Obr. 5 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace nikelnatých iontů. Na osu x vynášíme koncentrace Ni^{2+} , na osu y naměřené hodnoty absorbance (A). Hodnotu koncentrace odečteme z kalibrační přímky na základě zjištění absorbance tohoto vzorku

Koncentrace neznámého vzorku č. je:

Úkol: Zjistěte závislost absorbance na vlnové délce pro Ni^{2+} a Co^{2+}

Nejprve na spektrofotometru proměříme spektra jednotlivých iontů a poté vytvoříme jejich směs a opět proměříme spektrum. Zakreslete spektrální záznamy pro nikelnaté a kobaltnaté ionty. Poté zakreslete závislost směsi Ni^{2+} a Co^{2+} (směs byla připravena z 1 ml 0,5 M síranu nikelnatého a 1 ml 0,5 M chloridu kobaltnatého).

3 Tenkovrstevná chromatografie

3.1 Teoretický úvod

Adsorpční chromatografie je jedna z nejstarších chromatografických metod. Pevný adsorbent je obtékán vhodným rozpouštědlem, které unáší analyzovanou směs. Na povrchu adsorbentu dochází k dělení. Adsorpci látky na povrchu pevné fáze určuje adsorpční izoterma. Jako adsorbenty se používají látky pórovité struktury. Adsorbenty se dělí na polární (silikagel, oxid hlinitý, hydroxyapatit) a nepolární (aktivní uhlí). Podle způsobu provedení

rozlišujeme sloupcovou chromatografií a tenkovrstevnou chromatografií (TLC).

Pro důkaz alkaloidů a léčiv v moči se využívá tenkovrstevná chromatografie. Léčiva a alkaloidy se extrahují z upravené moči (kyselá či bazická) pomocí etheru. Etherové extrakty se odpaří do sucha na vodní lázni. Sušina se rozpustí v 0,5 ml ethanolu a vzorky se nanášejí na chromatografickou desku. Desky se vyvíjejí v chromatografické komoře nasycené parami vyvíjecí směsi. Když čelo mobilní fáze dosáhne vzdálenosti 2 cm od horního okraje desky, desku vyjmeme a po vysušení postříkáme jednotlivými detekčními činidly (konkrétně v experimentální části níže).

3.2 Experimentální část

Úkol: Detekce alkaloidů a léčiv pomocí tenkovrstevné chromatografie.

Laboratorní materiál: chromatografické desky – plastické fólie silikagel 60 F254 (firma Merck), třecí misky, žluté špičky k automatickým pipetám, tužka, pravítko, chromatografická vana, rozprašovač, mikrozkušavky.

Chemikálie: 96% ethanol, kofein, chinin, léčivo.

Roztoky:

vyvíjecí soustava: ethylacetát/methanol/amoniak (34 : 4 : 2),
detekční činidla:

1. konc. H_2SO_4 /ethanol (1 : 1), činidlo připravovat v ledové lázni, po kapkách přidávat kyselinu do vychlazeného ethanolu,
2. Dragendorffovo činidlo:
roztok I: dusičnan bismutitý (850 mg) se rozpustí v 10 ml kyseliny octové a 40 ml vody,
roztok II: jodid draselný (8 g) se rozpustí ve 20 ml vody.

Oba roztoky se smísí a uchovávají v hnědé láhvi i několik měsíců. Před použitím se 10 ml tohoto zásobního roztoku zředí 20 ml kyseliny octové a 100 ml vody.

Pracovní postup:

Příprava standardů: Léky v tabletové formě rozetřeme v třecí misce na prášek. Preparáty kofeinu a chininu navážíme na analytických vahách přímo do připravených mikrozkušavek a rozpustíme v ethanolu. Pokud je povrch tablety pokryt obalem nebo glazurou, musíme obal odstranit nebo smýt. Odvážíme požadované množství substancí (množství závisí na jednotlivých důkazech a metodách, nejčastěji 10–200 mg). Naváženou substanci rozpustíme v odpovídajícím objemu rozpouštědla (u léků se nejčastěji používá čistý

ethanol). Standardní roztok přeneseme do mikrozkušavky a označíme jej datem přípravy. Skladujeme ve tmě a chladu (0–4 °C).

Pro praktická cvičení připraví standardy vedoucí cvičení předem.

Tenkovrstevná chromatografie

Na připravenou tenkou vrstvu pomocí pravítka a měkké tužky vyznačíme místa startů. Vzdálenost mezi nanášenými vzorky nesmí být menší než 1,5 cm a průměr nanášených skvrn nesmí být větší než 0,5 cm. Pomocí žluté špičky nanese na místa startů 1–4 kapky jednotlivých standardů. V průběhu nanášení skvrny vysušujeme teplým vzduchem z fénu. Nejméně 10 minut před vyvíjením nalijeme do chromatografické komory vyvíjecí směs, a to takový objem, aby hladina byla níže, než místo startu vzorku na chromatografické desce. Komoru uzavřeme sklem. Po nasycení komory parami vyvíjecí směsi vložíme chromatografickou desku do komory a provedeme vzestupné vyvíjení. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne vzdálenosti 2 cm od horního okraje desky, desku z komory vyjmeme a čelo fáze označíme měkkou tužkou. Chromatografickou desku vysušíme volně na vzduchu a postříkáme detekčními činidly. Skvrny pozorujeme pod UV lampou nebo pomocí oka.

Vyhodnocení chromatogramu:

Tužkou si zakreslíme čelo mobilní fáze a obkreslete velikost skvrny. U jednotlivých skvrn vypočítáme hodnotu R_f (tzv. retenční faktor). Retenční faktor udává poměr vzdálenosti středu skvrny látky od startu (V_M) k vzdálenosti čela mobilní fáze (V_R), tj. vzdálenost, kam až doputuje mobilní fáze.

$$R_f = V_M / V_R$$

Chromatogram můžeme překreslit nebo přilepit.

Tabulka 3: Detekce alkaloidů a léčiv pomocí TLC.

Sloučenina	V_M	V_R	R_f
kofein			
chinin			
léčivo			

4 Enzymologie

4.1 Teoretická část

Amylasy se vyskytují u člověka, zvířat, rostlin i mikroorganismů. Využívají se v lihovarnictví, pivovarnictví, pekařství apod. Zdrojem amylas může být naklíčený ječmen (slad). Směs sladových amylas se nazývá diastasa. Amylasy patří do skupiny enzymů hydrolas, které štěpí substráty za účasti vody. Amylasy štěpí polysacharidy jako jsou škrob, glykogen a dextriny. Konečným produktem je disacharid maltóza. U člověka a zvířat se α -amylasa vyskytuje ve slinách a v pankreatu (slinivce břišní). U rostlin se nachází pouze v semenech (např. v ječmeni). Také některé mikroorganismy produkují amylasy (např. *Bacillus subtilis*).

Konečným produktem štěpení škrobu je redukující cukr disacharid maltóza. Přítomnost škrobu lze dokázat reakcí s jódem (Lugolův roztok). Modré zbarvení signalizuje přítomnost škrobu (více jak 30 glukózových jednotek) a světle žluté zbarvení potvrzuje úplné rozštěpení škrobu (4–6 glukózových jednotek).

Dalším enzymem, se kterým budeme v této úloze pracovat, je sacharasa známá také pod názvem invertasa. Sacharasa se nachází např. v pekařských kvasnicích. Katalyzuje hydrolýzu sacharózy na D-glukózu a D-fruktózu. Tato reakce má značný průmyslový význam, neboť směs glukózy a fruktózy je podstatně sladší než ekvivalentní množství sacharózy. Sacharasa je glykoprotein lokalizovaný na vnější straně kvasničné buňky.

Charakteristické vlastnosti obou enzymů si ověříme prakticky v laboratoři: α -amylasa obsažená ve slinách a v mikroorganismech (*Bacillus subtilis*) odbourává škrob za vzniku dextrinů a maltózy. Vůbec však nepůsobí na cukr sacharózu. Naproti tomu sacharasa rychle hydrolyzuje sacharózu, ale je zcela neaktivní vůči škrobu. Účinky obou enzymů lze snadno sledovat Fehlingovou reakcí (důkaz vznikajících redukujících cukrů) nebo reakcí s jódem (škrob dává modré zbarvení).

4.2 Experimentální část

Laboratorní materiál: stojan se zkumavkami, Pasteurovy pipety, váženka, lžička, stříčka s destilovanou vodou, špachtle, hrnec.

Chemikálie: škrob, sacharóza, kvasnice.

Přístroje: termostat, vařič, vortex.

Roztoky: Lugolův roztok, 0,1 M-fosfátový pufr, pH 7,2.

Fehlingovo činidlo:

roztok I: 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 500 ml vody a doplní se do 1 litru vodou

roztok II: 200 g Seignettovy soli (vinan sodnodraselný – $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a 150 g NaOH se rozpustí v menším množství vody a doplní na 1 litr.

Pro praktická cvičení už budou roztoky připraveny.

1% roztok škrobu:

1 g škrobu rozsuspendujeme v 100 ml 0,1 M-fosfátového pufru, pH 7,2 a 5 minut povaříme na vodní lázni.

Pro praktická cvičení už bude roztok připraven.

0,5% sacharóza:

1 g sacharózy rozpustíme v 50 ml destilované vody.

Pro praktická cvičení už bude roztok připraven.

Příprava enzymů:

- 20 mg mikrobiální α -amylasy se rozpustí v 100 ml 0,1 M fosfátového pufru. Pro praktická cvičení už bude roztok připraven.
- 10 ml pitné vody vložíme do úst, ponecháme v ústech po dobu 1 minuty a poté vrátíme do připraveného plastového kelímku. Roztok bude sloužit jako slinná amylasa.
- 0,1 g pekařských kvasnic resuspendujeme ve 20 ml vody (enzym sacharasa).

Pracovní postup:

Podle schématu v tabulce 4 napipetujeme do 7 označených zkumavek po 2 ml substráty (sacharózu a škrob) a přidáme 1 ml enzymových preparátů (α -amylasy, sacharasy). Všechny zkumavky inkubujeme 20 minut při 38 °C v termostatu.

Tabulka 4: Charakterizace enzymů.

Zkumavka č.	Substrát (2 ml)	Enzym-zdroj	Fehlingova r.	Zbarvení jódem
1	1% škrob	amylasa-sliny (1 ml)		
2	1% škrob	amylasa z <i>Bacillus subtilis</i>		
3	1% škrob	sacharasa (1 ml)		
4	2% sacharóza	sacharasa (1 ml)		
5	2% sacharóza	1 ml dest. vody		
6	1% škrob	1 ml dest. vody		
7	pufr	1 ml dest. vody		

Po ukončení inkubace odebereme 1 ml reakční směsi z každé zkumavky do nové čisté zkumavky, kterou si předem označíme stejným číslem. K reakční směsi přidáme 1 ml Fehlingova činidla I a 1 ml Fehlingova činidla II a zkumavky povaříme 5 minut na vroucí vodní lázni. Původní zkumavky doplníme destilovanou vodou 1 cm pod okraj a přidáme kapku Lugolova roztoku (roztok jódu).

Výsledky obou zkoušek zapíšeme do tabulky. Vyhodnotíme z hlediska substrátové specifity enzym obsažený ve slinách, enzym produkovaný mikroorganizmem (*Bacillus subtilis*) a enzym z pekařských kvasnic.

Použitá literatura a informační zdroje

- Galuszka P. a Luhová L. (2003): Laboratorní technika. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.
- Peč P. a kolektiv (2008): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.
- Kolektiv autorů (2012): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.

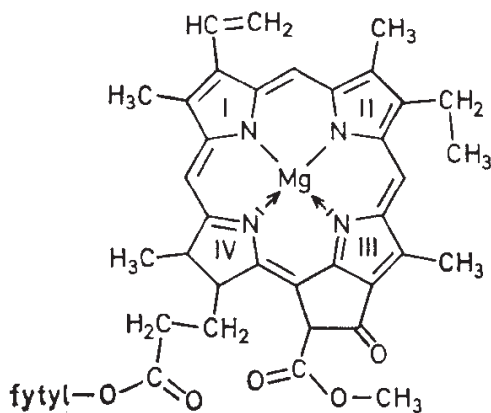
Praktická cvičení z chemie 2

1. Stanovení lipofilních listových barviv pomocí adsorpční chromatografie.
2. Stanovení proteinů.
3. Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku.
4. Stanovení pH.

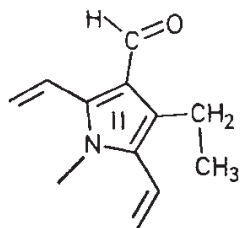
1 Stanovení lipofilních listových barviv pomocí adsorpční chromatografie

1.1 Teoretická část

V listech zelených rostlin se vyskytuje větší počet lipofilních barviv, jejichž charakteristickou vlastností je rozpustnost v tucích a tukových rozpouštědlech. Pro fotosyntézu mají rozhodující význam chlorofyly **a** a **b** a karotenoidy. Jsou značně citlivé vůči vzdušnému kyslíku a na světlo. Rychlého rozdělení listových barviv lze dosáhnout chromatografií na Silufolu.



chlorofyl a



chlorofyl b

Obr. 1 Vzorce chlorofylu **a** a chlorofylu **b** (převzato ze skript Peč P.: Laboratorní cvičení z biochemie)

1.2 Experimentální část

Laboratorní materiál: špičky žluté pro automatické pipety, Silufol, tužka, pravítko, kádinka, krycí sklo.

Roztoky a chemikálie:

vyvíjecí směs: benzín/isopropanol/voda (100 : 10 : 0,25)

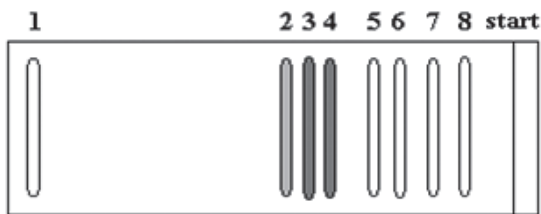
Příprava extraktu (bude k dispozici připravený extrakt):

Odvážíme 2 g listů špenátu (případně 2 g zmrazeného špenátového protlaku), které rozetřeme v třecí misce s malým množstvím mořského písku a uhličitanu vápenatého (na špičku nože) s několika ml acetonu. Směs zfiltrujeme přes malý filtr smočený acetonem do odměrné baňky 25 ml. Dalšími dávkami acetonu převedeme barviva kvantitativně do filtrátu a objem doplníme acetonem po značku.

Asi 10 ml extraktu odpaříme do sucha na vodní lázni a po ochlazení rozpustíme v několika kapkách acetonu.

Pracovní postup:

Zahuštěný extrakt ze špenátu nanese na startovní čáru ve formě řady kapek asi 2 cm od okraje silufolové desky. Desku vložíme do vyvíjecí nádoby (kádinky) s vyvíjecí směsí a přikryjeme krycím sklem. Jakmile čelo soustavy dosáhne horního okraje desky, desku vyjmeme a obyčejnou tužkou nejprve označíme čelo mobilní fáze a poté rychle obtáhneme zóny barviv. Chromatogram zakreslíme, neboť některé skvrny na světle rychle blednou.



Obr. 2: Lokalizace listových barviv po rozdělení na desce Silufolu. Vyvíjecí směs benzín/isopropanol/voda (100 : 10 : 0,25). 1 – β -karoten, 2 – feofytin, 3 – chlorofyl a, 4 – chlorofyl b, 5 – lutein, 6 – lutein-5,6-epoxid, 7 – violaxanthin, 8 – neoxanthin (převzato ze skript Peč P.: Laboratorní cvičení z biochemie)

Výsledek zakreslete.

2 Stanovení proteinů

2.1 Teoretická část

Proteiny ve vzorku lze stanovovat celou řadou metod. Jednak jsou to metody založené na interakci proteinů s ionty mědi (Biuretová metoda, Lowryho metoda nebo Bicinchoninová metoda), pak metody založené na vazbě proteinů s barvivem Coomassie Blue a také metody stanovení proteinů z UV spektra.

Coomassie barvivo (Brilliant Blue G250) se váže na proteinové molekuly při kyselém pH dvěma způsoby. Trifenylnmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu a anion sulfoskupiny se váže na vedlejší řetězce aminokyselin nesoucích kladný náboj (např. arginin a lysin). Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. Tato metoda se označuje jako metoda Bradfordové. Reakce je velmi citlivá u albuminu a řady globulárních proteinů.

2.2 Experimentální část

- 1. úkol:** Sestrojit kalibrační přímku pro stanovení proteinů metodou Bradfordové
- 2. úkol:** Z pomoci kalibrační přímky stanovit koncentraci proteinů v homogenátu (viz úkol v kapitole 3)

Laboratorní materiál: kyvety do spektrofotometru (1 cm), stojan se zkumavkami, pipety, stříčka s destilovanou vodou, kádinky, špachtle.

Roztoky: standardní roztok BSA (hovězí sérový albumin) 25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Činidlo Bradfordové (100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 – 0,01% w/v, 50 ml 95% ethanolu /5% konečná koncentrace/, 100 ml 85% kyseliny fosforečné, doplnit do 1 litru vodou).

Přístroje: spektrofotometr, vortex.

Pracovní postup:

Pomocí standardního roztoku proteinu si připravíme sadu zkumavek obsahujících 1 ml roztoku proteinu o vzrůstající koncentraci proteinu 5–25 μg . Slepý vzorek obsahuje 1 ml vody a 1 ml standardu obsahuje 25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (viz Tabulka 1).

Do každé zkumavky přidáme 2 ml činidla Bradfordové, rychle promícháme na vortexu.

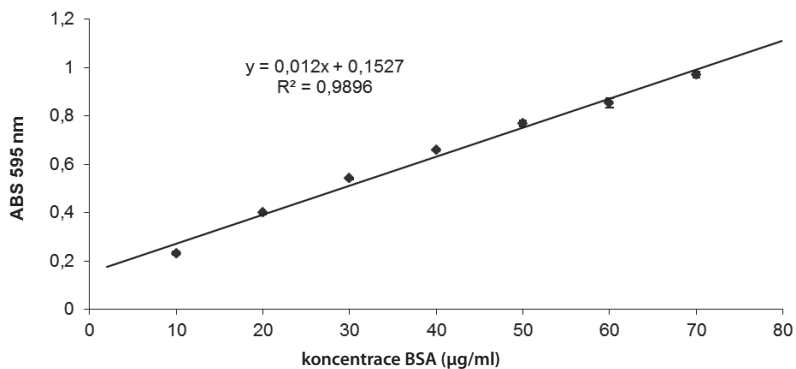
Po 5 minutách měříme absorbanci při 595 nm.

Stejným způsobem změříme obsah proteinů v neznámém vzorku.

Výsledky:

Tabulka 1: Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace BSA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	5	10	15	20	25	NV1	NV1
BSA (μl)	200	400	600	800	1000		
Voda (μl)	800	600	400	200	0		
Absorbance							



Obr. 3 Kalibrační přímka pro stanovení proteinů metodou Bradfordové. Příklad kalibrační přímky

Výpočet koncentrace neznámých vzorků: pomocí hodnot koncentrací standardů a naměřených absorbancí si sestrojíte kalibrační přímku. Příklad kalibrační přímky je uveden na Obr. 3. Pomocí hodnoty absorbance neznámého vzorku odečteme hodnotu koncentrace z kalibrační přímky.

Hodnota koncentrace proteinů v neznámém vzorku je

3 Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku a stanovení proteinů v homogenátu

3.1 Teoretická část

Pro homogenizaci rostlinného materiálu lze zvolit celou řadu metod. Rostliny můžeme homogenizovat (rozmělnit) pomocí přístrojů homogenizátorů obsahujících ostré nože, které rotují velkou rychlostí. Nahradit je může i obyčejný kuchyňský mixér. V laboratoři se často homogenizuje rostlinný materiál v třecí misce za přisypání mořského písku. Elegantní jednoduchý způsob jak materiál zhomogenizovat spočívá v použití tekutého dusíku, který materiál hluboce zmrazí a způsobí jeho rozpad na prach.

3.2 Experimentální část

Laboratorní materiál: třecí miska a tlouček, Pasteurovy pipety, mikrozku-mavky, stojánek na mikrozku-mavky, tekutý dusík.

Rostlinný materiál: listy, květy, stonky rostlinného materiálu.

Roztoky: 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,2.

Přístroje: stolní centrifuga, vortex.

Pracovní postup:

Na předvážkách si odvážíme 0,5 g rostlinného materiálu, který vložíme do třecí misky. Opatrně přilijeme tekutý dusík a pomocí tloučku se snažíme rostlinný materiál rozbít na prach. Poté přidáme 2 ml fosfátového pufru pH 7,2. Vzniklý homogenát přepipetujeme do mikrozku-mavky a pomocí vortexu ještě řádně promícháme. Poté centrifugujeme pomocí stolní centri-fugy 5 minut (mikrozku-mavky v centrifuze musí být vyváženy). Supernatant přepipetujeme do čisté mikrozku-mavky a stanovíme v něm obsah proteinů (neznámý vzorek pro úkol č. 2).

4 Stanovení pH roztoků

4.1 Teoretický úvod

Jedním z kritérií dělení roztoků je jejich rozdělení podle kyselosti. Rozdělujeme je tedy na roztoky kyselé, neutrální a zásadité.

Jednotkou kyselosti je hodnota pH, která je definována jako záporný logaritmus koncentrace oxoniových iontů při teplotě 25 °C.

4.2 Experimentální část

1. úkol: Určení pH připravených roztoků pomocí pH papírku a pomocí přírodního indikátoru

Pomocí pH papírku určete přibližnou hodnotu pH připravených roztoků a запиšte ji do tabulky. Zjistěte zabarvení připravených roztoků po přidání přírodního indikátoru z červeného zelí. Určete hodnotu pH neznámého vzorku.

Laboratorní materiál: skleněné zkumavky, Pasteurovy pipety, pH papírky, skleněná tyčinka, stojan na zkumavky.

Zkoumané roztoky: 0,1 M kyselina chlorovodíková, 8% ocet, 0,1 M kyselina citronová, citronová šťáva, 0,1 M kyselina octová, 0,1 M hydrogenuhličitan sodný, 0,1 M fosforečnan draselný, 0,1 M hydroxid sodný.

Indikátor z červeného zelí: Červené zelí nakrájíme na malé kousky, vložíme do kádinky a zalijeme destilovanou vodou. Směs povaříme asi 15 minut. Po vychladnutí zfiltrujeme směs přes papírový filtr a zakonzervujeme ji bronopolem (25 mg/ l) nebo azidem sodným.

Pracovní postup:

Naneseme kapku zkoumaného roztoku skleněnou tyčinkou na univerzální pH papírek a porovnáme získaný odstín s nabízenou barevnou škálou rozsahu pH (od červenofialové po modrou). Odhadneme hodnotu pH. Výsledky запиšte do tabulky 2. Hodnotu pH změřenou pH metrem opište z popisu kádinky zkoumaného roztoku.

Pomocí Pasteurovy pipety napipetujte 1 ml zkoumaného roztoku do připravených skleněných zkumavek a přikápněte 5 kapek indikátoru z červeného zelí, směs promíchejte na vortexu a vzniklé zabarvení запиšte do tabulky 2. Pomocí obou metod se pokuste zjistit pH neznámého vzorku.

Tabulka 2: Stanovení hodnoty pH pomocí pH papírku a barevného indikátoru z červeného zelí.

Zkoumaný roztok	Hodnota pH pH metr	Hodnota pH pH papírek	Indikátor ČZ (barva)
0,1 M HCl			
8% ocet			
0,1 M kyselina citronová			
citronová šťáva			
0,1 M CH_3COOH			
0,1 M NaHCO_3			
0,1 M K_3PO_4			
0,1 M NaOH			
neznámý vzorek			

2. úkol: Stanovení hodnoty pH neznámých roztoků pomocí pH metru

Tabulka 3: Příprava neznámých roztoků pro měření hodnoty pH.

Zkumavka	0,1 M kyselina citronová (ml)	0,2 M hydrogenfosforečnan sodný (ml)
V	160	40
R	130	70
O	100	100
P	87,5	112,5
S	80	120
K	55	145
Á	35	165
U	12,5	187,5
N	5	195
I	0	200
E ₁	0,1 M HCl	
E ₂	0,1 M NaOH	

0,1 M kyselina citronová: 21,01 g monohydrátu v 1 litru (připravit 1 litr),
0,2 M Na_2HPO_4 : 35,62 g dihydrátu v 1 litru (připravit 2 litry).

Neznámé roztoky byly připraveny podle tabulky 3 (příprava před praktickým cvičením). Změřte kyselost označených vzorků a výsledky запиšte do tabulky 4. Zkoumané vzorky seřadte podle vzrůstající hodnoty pH.

Tabulka 4: Stanovení pH pomocí pH metru

Písmeno	V	P	I	Á	E1	U	E2	O	S	R	K	N
pH												

Zapište písmena po seřazení:

Použitá literatura a informační zdroje

Peč P. a kolektiv (2008): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.

Kolektiv autorů (2012): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.

Praktická cvičení z chemie 3

1. Odměřování v chemii
2. Izolace DNA z vepřové sleziny a důkaz DNA
3. Nativní elektroforéza izoenzymů peroxidasy
4. Metoda odhalování otisků prstů
5. Důkaz přítomnosti krve na místě činu

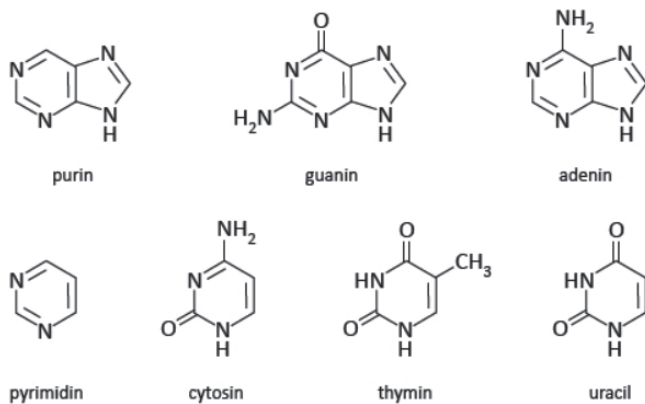
1 Odměřování v chemii

Postupujte podle Odměřování v chemii z Praktických cvičení 1 na str. 7.

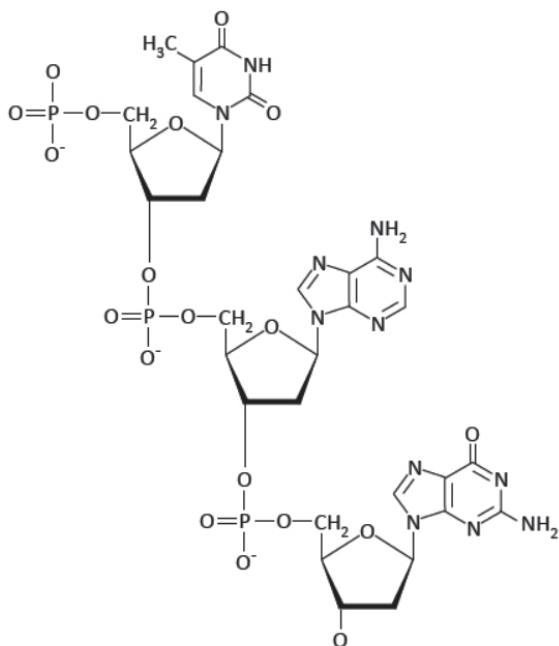
2 Izolace DNA z vepřové sleziny a důkaz DNA

2.1 Teoretický úvod

V roce 1869 byly objeveny nukleové kyseliny jako složky buněčného jádra. Jedná se o vysokomolekulární sloučeniny, které se úplnou hydrolýzou štěpí na heterocyklické organické báze, sacharid (pentózu) a kyselinu fosforečnou. Kyselina deoxyribonukleová (DNA) obsahuje sacharid 2-deoxyribózu a kyselina ribonukleová (RNA) obsahuje ribózu. Stavebními jednotkami nukleových kyselin jsou pyrimidinové a purinové báze. Mezi pyrimidinové báze (Obr. 1) patří cytosin (C), thymin (T) a uracil (U), které *N*-glykosidickou vazbou s ribózou v molekule RNA, nebo 2-deoxyribózou v molekule DNA vytvářejí nukleosidy cytidin, thymidin a uridin. Podobně purinové báze (Obr. 1) adenin (A), guanin (G) a hypoxanthin vytvářejí nukleosidy adenosin, guanosin a inosin. Všechny nukleosidy vytvářejí esterovou vazbou s fosfátem nukleotidy (Obr. 2). Báze typické pro DNA jsou A, T, C, G, v molekule RNA je T nahrazen U. Molekula RNA je výrazně méně stabilní než molekula DNA.



Obr. 1 Purinové a pyrimidinové báze (převzato ze skript Peč P.: Laboratorní cvičení z biochemie)



Obr. 2 Nukleotidy spojené v řetězec (převzato ze skript Peč P.: Laboratorní cvičení z biochemie)

2.2 Experimentální část

1. úkol: Izolace DNA ze sleziny

Laboratorní materiál: mořský písek, křemenná kyveta (1 cm), centrifugační zkumavka, odměrný válec (100 ml), pH papírky, kádinka (1000 ml), skleněná tyčinka, kádinka (100 ml), špachtle, zkumavky (5 a 10 ml), třecí miska s tloučkem, prkýnko, nůž, stojánek na zkumavky, Pasteurova pipeta, lžička, špičky pro automatické pipety, stopky, vepřová slezina.

Chemikálie: diethylether, ethanol, koncentrovaná HCl.

Roztoky: 0,5% NaOH, 1 M NaCl,

Difenylaminové činidlo: do 100 ml 1% roztoku difenylaminu v ledové kyselině octové se přidá 2 × 75 ml koncentrované kyseliny sírové.

Pracovní postup:

Navážku 10 g sleziny nakrájejte a následně v třecí misce rozetřete s trochou mořského písku na jemnou kaši.

Přidejte 100 ml vychlazeného 1 M NaCl postupně po malých dávkách a za stálého roztírání. Homogenizujte 15 min.

Homogenát centrifugujte při $5000 \times g$, 10 min, 4 °C. Mezitím si připravte 600 ml vychlazené destilované vody do 1 l kádinky.

Supernatant převedte do čisté kádinky a z ní ho pomalu v tenkém proudu kontinuálně nalijte do vychlazené destilované vody, poté velmi jemně promíchejte pomocí dřevěné špejle. DNA se sráží ve formě opaleskujících vláken.

Za použití dřevěné špejle navíjejte vlákna DNA a ty přenášejte do malé a velké zkumavky a zbytek uchovejte v kádince pro další experimenty, při 4 °C.

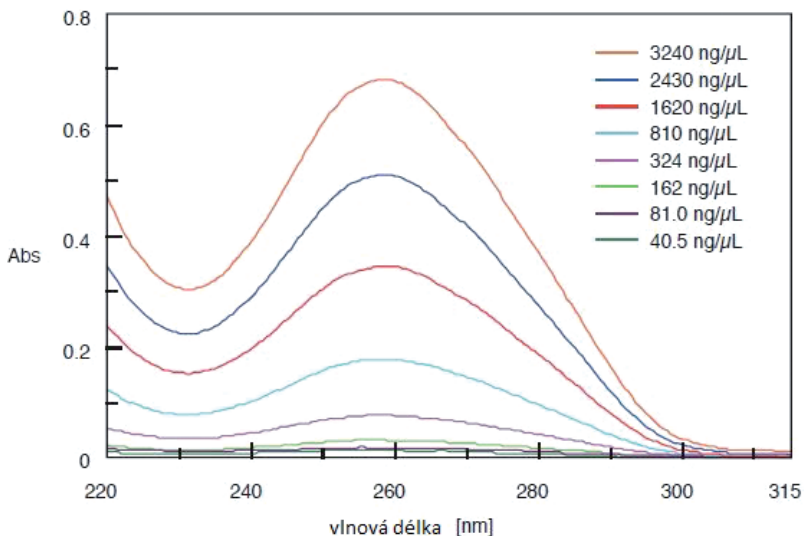
2. úkol: Důkaz DNA difenylaminem

Difenylamin poskytuje s DNA modré zbarvení. Izolovanou DNA rozdělíme na dvě části. Do zkumavek přeneseme první část izolované DNA, přidáme 1 ml 0,5% NaOH a po promíchání a rozpuštění přidáme 1 ml difenylaminového činidla a zahříváme 10–20 min na vroucí vodní lázni. Pozorujeme vývoj zbarvení.

3. úkol: Spektrální stanovení nukleových kyselin

Nukleové kyseliny absorbují záření v ultrafialové oblasti, maximum absorpce je při 260–265 nm (Obr. 3). Při stanovení je nutné dbát na čistotu preparátu, protože ruší přítomnost proteinů a aromatických látek. Pro stanovení se využívá vlnové délky 260 nm. Ke druhému podílu vyzolované

DNA v malé zkumavce přidáme 0,5 ml 0,5% NaOH. Do křemenné kyvety napipetujeme 2 ml 0,5% NaOH a přidáme 20 μL DNA v roztoku NaOH. Měříme absorpční spektra v UV oblasti v rozsahu 200–290 nm. Jako blank slouží 0,5% NaOH.



Obr. 3 Absorbční spektra nukleových kyselin. Jsou uvedena absorbční spektra pro různé koncentrace DNA (upraveno podle: <http://www.jascoinc.com/Images/Product/jasco-uv-vis-spectra-of-calf-thymus-dna-solutions.jpg>)

3 Nativní elektroforéza izoenzymů peroxidasy

3.1 Teoretický úvod

Elektroforetické metody jsou separační techniky, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Migrace iontů v elektrickém poli se využívá pro analytické dělení biologických látek. Částice látek nesoucí náboj rozpuštěné v elektrolytu se pohybují v elektrickém poli rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontů a jeho velikosti a odporu prostředí. Byla vytvořena celá řada elektromigračních technik a jejich modifikací. V praktickém cvičení bude demonstrována nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu zaměřen-

ná na rozdělení izoenzymů peroxidasy, které jsou přítomné v rostlinném materiálu. Izoenzymy katalyzují stejný druh reakce, mohou se však lišit svou strukturou, vazebným místem nebo molekulovou hmotností, lze je proto oddělit různými separačními metodami. Peroxidasy katalyzují redukci peroxidu vodíku za současné oxidace jiné sloučeniny. O peroxidasach je známo, že se vyskytují ve velkém množství izoform. Například peroxidasa z křene obsahuje 14 různých izoform. Peroxidasy byly nalezeny ve všech rostlinných pletivech. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 42–158 kDa.

3.2 Experimentální část

Laboratorní materiál: komůrka pro elektroforézu, připravené polyakrylamidové gely, klíčící rostliny hrachu, listy různých rostlin.

Roztoky a chemikálie:

Extrakční pufr pro nativní elektroforézu (0,1 M Tris-HCl, pH 7): 12,11 g Tris se rozpustí v 600 ml vody, upraví se pH na 7 pomocí HCl a doplní se vodou na 1 l. Uchovává se při 4 °C.

Elektrodový pufr pro nativní elektroforézu: 6,055 g Tris a 28,823 g glycinu se rozpustí v 1 l vody, zkontroluje se pH a doplní se vodou na 2 l. Uchovává se při 4 °C.

60% glycerol: 6 ml glycerolu se smíchá s 4 ml vody. Uchovává se při pokojové teplotě.

0,02% bromfenolová modř: 1 mg bromfenolové modři se rozpustí v 5 ml vody, ke 2 ml roztoku bromfenolové modři se přidá 1 ml 60% glycerolu. Uchovává se při pokojové teplotě.

Barvicí roztok s 4-chlor-1-naftolem: k 4 mg 4-Cl-1-naftolu se přidá 2,5 ml vychlazeného methanolu, 12,5 ml 0,1 M Tris/HCl pufru pH 7,0 a 20 µl 30% H₂O₂.

Přístroje: centrifuga, vortex, zdroj pro elektroforézu.

Pracovní postup:

1. úkol: Příprava vzorků

Na předvážkách odvažte rostlinný materiál, který přenesete do třecí misky, zalijete tekutým dusíkem a materiál rozetřete na prášek. Poté přidáte 0,1 M Tris-HCl pufr, pH 7 (1 ml na 1 g váhy materiálu). Homogenát přeneste do dvou plastových mikrozkušavek a zcentrifugujete (10 minut, na stolní mikrocentrifuze při 3000 g). Rostlinný extrakt přeneste do čisté mikrozkušavky. Vzorek pro elektroforézu se připraví smícháním rostlinného

extraktu s 60% glycerolem v poměru 3 : 1. Před nanášením na gel promíchejte na vortexu.

2. úkol: Elektroforéza vzorků

Vedoucí cvičení připraví aparaturu pro elektroforézu a vaším úkolem bude nanést vzorek do jamek gelu. Do jamek aplikujte maximálně 20 µl vzorku. Nezapomeňte si zapsat pořadí vzorků a objem, který jste do jamky napietovali. Vedoucí cvičení vloží komůrku do elektroforetické vany, naplní ji až po značku elektrodovým pufrem, komůrku uzavře víkem a připojí ji ke zdroji napětí. Nejprve nastaví napětí 100 V, až bromfenolová modř v krajních jamkách doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu zvýší vedoucí cvičení napětí na 180 V. Po doputování zóny bromfenolové modři na úroveň dolního okraje gelu vedoucí cvičení zdroj vypne, odstraní víko a vylije elektrodový pufr do odpadu. Skla uvolní ze stojánku a pomocí plastové špachtle oddělí skla od gelu. Zaostřovací gel odřeže od dělicího gelu. Orientaci gelu označí odkrojením jednoho ze spodních rohů gelu. Gel přenesení do nádoby s cca 15 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7.

Upozornění: Při nanášení vzorků na gel, práci s aparaturou a gely, stejně tak při samotné přípravě gelů je nutné pracovat v ochranných rukavicích. Gely obsahují neurotoxin akrylamid a bis-akrylamid, obě látky mají kumulativní charakter – vážou se v tukové tkáni!

3. úkol: Barvení gelu – detekce izoenzymů peroxidasy

Po 5 minutách na třepačce pufr odstraňte a přidejte barvicí roztok obsahující 4-chloro-1-naftol a peroxid vodíku.

Po 5–20 minutách barvení (podle intenzity vybarvení) odstraňte barvicí roztok a gel několikrát propláchněte destilovanou vodou.

4. úkol: Dokumentace gelu

Gel přeneste na čistou skleněnou podložku, pod kterou podložíte bílý papír. Gel si můžete vyfotit nebo překreslit do pracovních listů.

4 Metoda odhalování otisků prstů pomocí ninhydrinu

4.1 Teoretický úvod

Jedná se o odhalení otisků na různých typech papírů i hrubých tapetách. Stopy mohou být i několik let staré. Ninhydrin je vysoce citlivé činidlo na aminokyseliny, peptidy a proteiny, které se dostanou na papír s otiskem prstu. Během ninhydrinové reakce dojde nejprve k dekarboxylaci aminokyseliny, vzniklý amin pak podléhá oxidační deaminaci. Ninhydrin vystupuje

jako oxidační činidlo a sám se přeměňuje na růžový nebo modrofialový zbarvený produkt (Obr. 4).

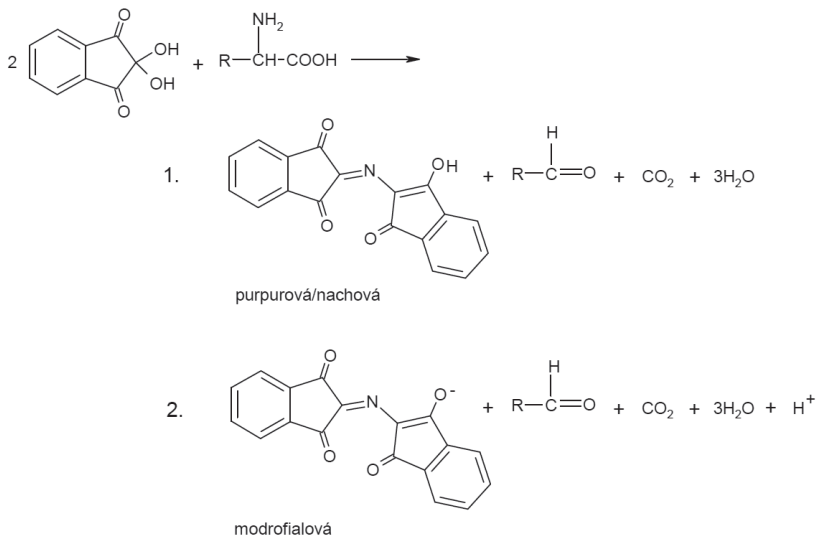
4.2 Experimentální část

Laboratorní materiál: 2 kádinky (100 ml), odměrný válec (50 ml), pipeta 5 ml, skleněná tyčinka, pinzeta, rozprašovač, sušárna (nebo fén), papír, lžička.

Chemikálie a roztoky: 0,2% ninhydrin (0,1 g ninhydrinu, 50 ml ethanolu a 1,5 ml kyseliny octové – 99 %).

Pracovní postup:

Pro otisky prstů je vhodný papír do tiskárny. Veškeré následující operace musí být provedeny v digestoři a s ochrannými rukavicemi. Na papíru vytvořte otisky prstů. Papír přestříkejte ninhydrinovým roztokem a nechte volně usušit. Poté papír zahřejte v sušárně (5–10 minut). Pozorujte vzniklé otisky prstů. Roztok s přídavkem kyseliny octové zvýrazní otisky do purpurové barvy. Pokud se použije roztok bez kyseliny octové, otisky prstů se zbarví do fialové (popř. modré).



Obr. 4 Reakce ninhydrinu (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/>)

5 Důkaz krevních stop na místě činu pomocí luminolu

5.1 Teoretický úvod

Metoda s luminolem odhalí i takové skvrny, které jsou lidským okem neviditelné. Luminol společně s peroxidem vodíku způsobuje chemiluminiscenci (Obr. 5). Během reakce přecházejí molekuly do excitovaného stavu, návratem zpět dochází k vyzáření energie ve formě světla.

5.2 Experimentální část

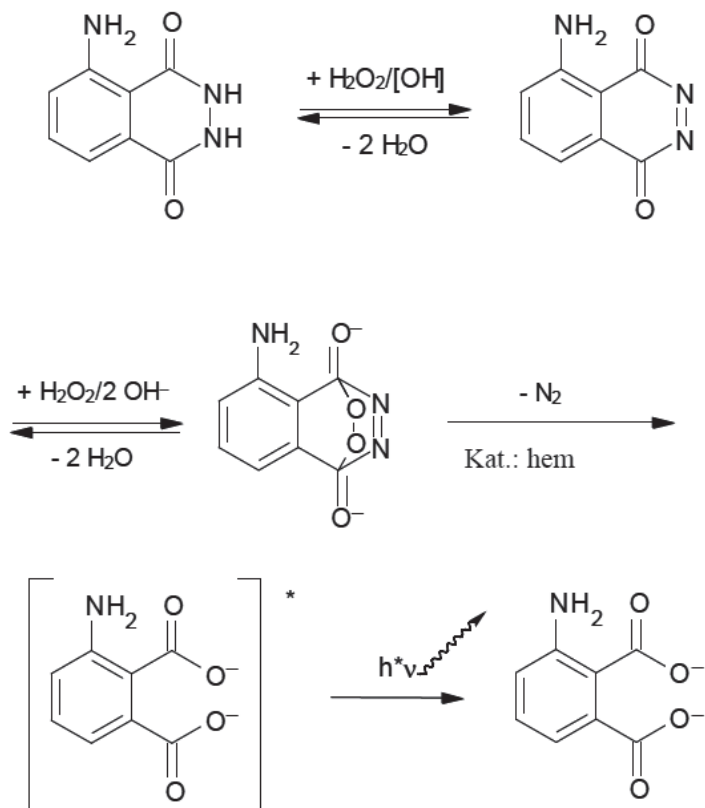
Laboratorní vybavení: kádinka (200 ml), odměrný váleček (100 ml), rozprašovač, zbytky bavlněných látek.

Chemikálie: thiokyanatan železitý, hemoglobin, kečup, vepřová krev.

Roztoky: roztok luminolu (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion): 0,1 g luminolu a 5 g uhličitanu sodného se rozpustí ve 100 ml destilované vody a k tomuto roztoku se přidá 15 ml 33% peroxidu vodíku. Roztok se přelije do rozprašovače.

Pracovní postup:

Na kousek bavlněné látky nakapejte několik kapek vepřové krve, roztok hemoglobinu, kečup, thiokyanatan železitý. Připravený roztok luminolu přelejte do rozprašovače tak, aby nerozpustný zbytek zůstal v kádince. Tkaninu s pravými a falešnými stopami krve přeneste do temné komory, postříkejte ji připraveným roztokem luminolu. Po přestříkání se místa s krví rozsvítí namodralým světlem, falešné skvrny nedávají žádnou reakci.



Obr. 5 Reakce luminolu s krví v přítomnosti peroxidu vodíku (katalyzátorem je hem) (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/>)

Vyhodnocení:

Vepřová krev a hemoglobin dávají namodralé světlo, falešné skvrny (kečup, thiokyanatan železitý) žádnou luminiscenci nezpůsobují.

Použitá literatura a informační zdroje

Peč P. a kolektiv (2008): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.

Kolektiv autorů (2012): Laboratorní cvičení z biochemie. 1. vydání, Vydavatelství UP Olomouc.

<http://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/>.

BIOLOGICKÁ ČÁST

Vladimír Vinter

Praktická cvičení z biologie 1 – Zkoumáme stavbu rostlin

1 Pozorujeme fytolity v rostlinných pletivech

1.1 Teoretický úvod

Fytolity jsou mikroskopické útvary inkrustující buněčné stěny nebo krystalické inkluze nacházející se uvnitř buněk. Nejčastěji se jedná o anorganické látky, krystalické inkluze však mohou vytvářet i některé organické látky.

Fytolity vytvářejí pravděpodobně depo zásobních látek (např. vápníku) využitelných v případě potřeby nebo slouží jako depo odpadních produktů buňky. Silikáty inkrustující buněčné stěny také zpevňují rostlinná pletiva.

Tvar fytolitů, způsob uložení v buňce a chemické složení fytolitů se u různých systematických skupin rostlin liší. Specifického utváření fytolitů a jejich schopnosti dlouhodobě přetrvávat v půdě nebo sedimentech využívá fytolitová analýza. Fytolity se získávají dekompozicí nebo spálením rostlinných zbytků, poté jsou podrobeny mikroskopické analýze.

Využití fytolitové analýzy je mnohostranné (především využití silikátových fytolitů). Využívá se např. při rekonstrukci vegetace příslušného období (nejčastěji starší holocén, pleistocén, ale i starší období), v archeologii při determinaci pěstovaných rostlin (často bývá zkoumán obsah obilných jam, silikátové fytolity trav jsou často činkovitého tvaru nebo nepravidelného tvaru s výběžky), při identifikaci fosilních půd, v některých případech umožňuje fytolitová analýza rozlišit mořské a terestrické sedimenty, může sloužit jako forenzní nástroj v kriminalistice aj.

Zajímavým výsledkem fytolitové analýzy je doložení trávožravého sauropodního dinosaura v Indii z doby před 65–70 milióny lety (svrchní křída). Důkazem je přítomnost silikátových travních fytolitů nalezených v dinosauřím trusu – v tzv. koprolitech.

Analýza fytolitů sedimentů v oblasti San Andrés v Mexiku prokázala pěstování rané formy domestikované kukuřice předchůdci civilizace Olméků již před zhruba 7300 lety (některé nejnovější údaje naznačují ještě vyšší stáří).

Klasifikace fytolitů je značně nejednotná, existuje několik přístupů k systematickému třídění fytolitů. V buňkách mohou fytolity vytvářet:

- krystalický písek: drobné krystaly vyskytující se ve velkém množství;
- styloidy: jednotlivé větší hranolovité krystaly (Obr. 1);
- rafidy: svazky tenkých jehlicovitých zašpičatělých krystalů;
- drůzy: srostlice tvořené více krystaly;
- sféryty (sférokrystaly): radiálně uspořádané jehlicovité krystaly.

Nejrozšířenějším typem fytolitů jsou krystaly šfavelanu vápenatého. Příkladem krystalických inkluzí šfavelanu vápenatého jsou krystalický písek ve stoncích bezů (*Sambucus*), styloidy v buňkách suknice cibule česneků (*Allium*), v listech begónií (kysala, *Begonia*), révy vinné (*Vitis vinifera*), v lýku mnohých dřevin, rafidy ve stoncích podeňky (*Tradescantia*), drůzy v lýku lípy (*Tilia*) aj.

Uhlíčan vápenatý (CaCO_3) vytváří u některých rostlin, např. v buňkách epidermis listu fíkovníku pryžodárného (*Ficus elastica*), hroznovité shluky, tzv. cystolity. Svrchní epidermis listu fíkovníku pryžodárného je třívrstevná. Některé epidermální buňky, tzv. lithocysty, jsou nápadně větší (příklad idioblastu). V nich jsou na tenkých, lopatkovitě rozšířených celulózních stopkách uloženy cystolity. Cystolity lze rozpustit přidáním kapky HCl , uvolní se bubliny CO_2 , celulózní stopka však zůstane zachována.

Kyselina křemičitá ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) inkrustuje buněčné stěny epidermis ve formě pevného silikátového polymeru – např. u přesliček (*Equisetum*), trav (lipnicovité, *Poaceae*), ostřic (*Carex*), buněčné stěny žahavých trichomů kopřiv (*Urtica*). U některých druhů bambusů jsou interceluláry v internodiích stébel vyplněny křemičitými konkrerci známými jako tabašír.

V semenech některých rostlin, např. skočce (*Ricinus*), fazolu (*Phaseolus*), trav aj., se nacházejí buňky obsahující aleuronová zrna. Aleuronová zrna vznikají tak, že prekurzory zásobních bílkovin pronikají z cytoplazmy do vakuoly, kde se mění na základní části zrna. V typické podobě obsahuje aleuronové zrno krystaloidy a globoidy. Krystaloid představuje krystalickou formu bílkovin. Globoid je tvořen fytinem (vápenato-hořečnatá sůl esteru kyseliny hexofosforečné a inositolu), který tvoří zásobárnu mobilního fosforu. Buňky obsahující aleuronová zrna mohou tvořit aleuronovou vrstvu pod osemením, např. u obilnin.

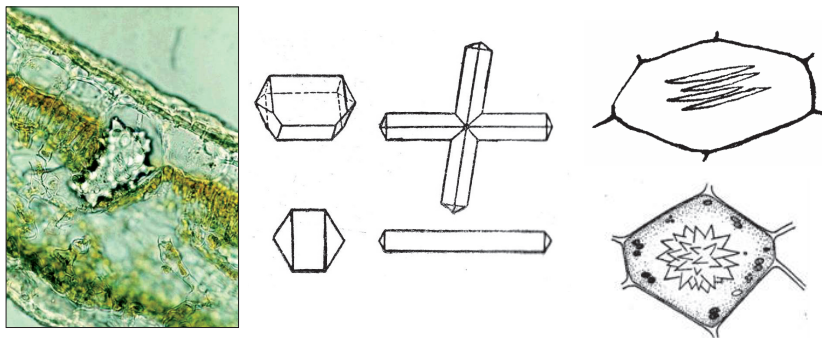
1.2 Postup práce

Sběr materiálu: z vybraných rostlin odebereme kousky větvíček (přibližně v síle tužky) a kousky listů (řapíků i čepelí). Materiál fixujeme v glycerol-alkoholu (3 : 1) a pečlivě popíšeme (druh rostliny, datum a místo sběru). Využíváme i subtropických a tropických rostlin pěstovaných jako pokojové rostliny nebo ve skleníku.

Příprava preparátu: žiletkou zhotovíme několik příčných řezů větvíčkami a listy (listové čepele a řapíky upevníme do podélně rozkrojené bezové duše). Řezy přeneseme na podložní sklíčko do kapky vody nebo glycerolu a přikryjeme krycím sklíčkem. Preparáty nebarvíme.

Pozorování pod mikroskopem: vyhledáme vhodný objekt při malém zvětšení a poté pozorujeme při středním zvětšení. Zhotovíme jednoduchý náčrt, popř. fotodokumentaci. Pokusíme se určit o jaký typ fytolitu se jedná (klasifikace fytolitů).

Na závěr sestavíme přehlednou tabulku srovnání fytolitů studovaných rostlin.



Obr. 1 Příčný řez listem fíkovníku bengálského (*Ficus bengalensis*) s fytolitem. Ve třívrstevné svrchní epidermis se nacházejí zveličelé buňky – lithocysty, v nichž se na celulosních stopkách vytvářejí hroznovité shluky uhličitanu vápenatého – cystolity. Štavelan vápenatý vytváří hranolovité stylويدy, drůzy a protáhlé zašpičatělé rafidy (pérovky).

Použitá literatura a informační zdroje

Vinter V. (2009): Rostliny pod mikroskopem; základy anatomie cévnatých rostlin. 2. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci.

2 Pozorujeme stomata v listové epidermis

2.1 Teoretický úvod

Stomata (průduchy) patří k provětrávacímu systému primárního krycího pletiva (epidermis, pokožka). Zajišťují výměnu plynů a vodních par mezi ovzduším a mezofylem listů. Umožňují příjem oxidu uhličitého potřebného k fotosyntéze a příjem kyslíku potřebného k respiraci. Průduchovými štěrbinami stomat také difunduje vodní pára z listu do ovzduší (stomatární transpirace). Stomatární transpirace uvádí do pohybu transpirační proud a ochlazuje listy. Význam stomat při zajišťování základních životních funkcí rostliny dokládá i skutečnost, že funkční stomata byla zjištěna již u nejstarších suchozemských cévnatých rostlin. Podle umístění stomat na listu mohou být listy:

- **hypostomatické:** stomata se nacházejí především (z 90 %) ve spodní epidermis, ve svrchní epidermis mohou úplně chybět, často u kapradin, dvouděložných bylin a především dřevin;
- **amfistomatické:** stomata jsou ve spodní i svrchní epidermis (přibližně stejný počet), např. kosatec (*Iris*), většina trav aj.;
- **epistomatické:** stomata jsou pouze ve svrchní epidermis, např. natantní listy leknínu (*Nymphaea*) nebo stulíku (*Nuphar*), u některých trav, např. u kostřav (*Festuca*), strdivek (*Melica*), váleček (*Brachypodium*).

Stomata mohou mít různou polohu vzhledem k rovině epidermis:

- **stomata emerzní:** vyčnívají nad úroveň epidermis, často stomata hygrofytů a stomata natantních listů hydrofytů;
- **stomata submerzní, kryptoporní:** stomata ponořená pod úroveň epidermis, často stomata xerofytů;
- **stomata faneroporní:** svěrací buňky stomat jsou v jedné rovině s buňkami epidermis, u většiny rostlin.

Ontogeneticky vznikají stomata v raných fázích histogeneze ze specifických iniciál tuniky (iniciály, jejichž dělením vznikají mateřské buňky svěracích buněk stomat, bývají někdy označovány jako meristemoidy). Pokud je tunika vícevrstevná, vznikají stomata vždy z iniciál svrchní vrstvy tuniky (L1). Iniciály se inekválně dělí (asymetrická mitóza) za vzniku větší epidermální buňky a menší mateřské buňky svěracích buněk. Vlastní průduchová štěrбина je vždy schizogenního původu, tzn. že vzniká rozpuštěním střední lamely.

Anatomicky tvoří stomata dvě svěrací buňky (cellulae claudentes) uzavírající průduchovou štěrbinu (porus stomatalis). Pod průduchovou štěrbinou je v mezofylu substomatární dýchací dutina, u ponořených průduchů i vnější dýchací dutina, často vyplněná voskem, např. u jehličnanů, některých trav, sukulentů aj. U některých xerofytů, např. u oleandru (*Nerium*), vytvářejí buňky vnější dýchací dutiny četné trichomy.

Svěrací buňky mají ledvinovitý, popř. piškotovitý tvar. Jejich koncové části jsou pevně spojeny. V cytoplasmě mají chloroplasty. Celulózní fibrily buněčných stěn svěracích buněk jsou uspořádány kolmo k podélné ose svěrací buňky. Takto uspořádané fibrily umožňují podélné protažení nebo zkrácení buněčné stěny svěrací buňky. V buněčných stěnách svěracích buněk nejsou plazmodesmy, svěrací buňky jsou tak izolovány od symplastického transportního systému. Symplastická izolace umožňuje účinnou regulaci turgoru svěracích buněk.

Z anatomického hlediska lze rozlišit základní typy stomat:

- **stomata typu *Amaryllis*:** svěrací buňky jsou ledvinovitěho tvaru (Obr. 4). Mají břišní stěnu (tj. stěnu obrácenou do průduchové štěrby) nepružnou, vyztuženou dvěma podélnými lištami, někdy zkorkovatělými. Hřbetní stěna většinou vyztužena není a zůstává pružná. Pružnost hřbetní stěny svěracích buněk je podmíněna i tím, že celulózové fibrily buněčné stěny jsou uspořádány kolmo k podélné ose svěrací buňky. Přijímá-li svěrací buňka vodu, stoupá vnitřní tlak buňky (turgor), pružná hřbetní stěna se napíná, svěrací buňky se ohýbají a průduchová štěrba se otevírá. Klesá-li ve svěracích buňkách turgor, svěrací buňky se napřimují a průduchová štěrba se uzavírá. Regulace velikosti průduchové štěrby se tedy děje ohýbáním a napřimováním ledvinovitých svěracích buněk. Svěrací buňky se u tohoto typu pohybují paralelně s povrchem epidermis. Častý typ u jednoděložných, méně často u dvouděložných rostlin;
- **stomata typu *Helleborus*:** ledvinovité svěrací buňky mají nerovnoměrně zesílené břišní stěny a jejich lumen má na příčném řezu přibližně tvar trojúhelníka, jehož strany jsou nestejně dlouhé. Regulace velikosti průduchové štěrby se pak děje pohybem svěracích buněk paralelně, ale i kolmo k povrchu epidermis (princip otevírání dveří). Často u dvouděložných, ale i některých jednoděložných rostlin;
- **stomata pteridofytního typu:** při stoupajícím turgoru se mění tvar příčného řezu svěracími buňkami z oválného na kruhovitý, přičemž se

průřez svěrací buňkou v periklinálním směru zkracuje a průduchová štěrbina se otevírá (periklinální směr je směr rovnoběžný s povrchem orgánu). U tohoto typu je poměrně silná i hřbetní stěna svěrací buňky, např. stomata kapradin;

- **stomata gymnospermiho typu:** v jehlicovitých listech jehličnanů jsou průduchy ponořené, seřazené v řadách. Buněčné stěny svěracích buněk jsou lignifikované, silné. Buňky epidermis a hypodermis obklopující svěrací buňky stomat jsou silnostěnné, nepružné. Proto je pohyb svěracích buněk v jehlicích poměrně omezený. Průduchy se u jehličnanů ucpávají na zimu voskem.
- **stomata typu *Gramineae*:** svěrací buňky jsou piškotovitého tvaru. Buněčná stěna střední zúžené části svěracích buněk je ztloustlá, rozšířené okrajové části jsou tenkostěnné a pružné – při stoupajícím turgoru zvětšují svůj objem a průduchová štěrbina se rozevírá. Na pohybu svěracích buněk se významně podílejí i buňky vedlejší, které vznikají syndetocheilicky. Stomata tohoto typu většinou vytvářejí pravidelné řady. Nacházejí se u trav (*Poaceae*, lipnicovité), ostřic (*Carex*), sítin (*Juncus*), ale i v epidermis listů dubu cesmínového (*Quercus ilex*) nebo v epidermis fylodií (do plochy rozšířené řapíky) akácií (*Acacia*).

Z hlediska systematické botaniky je významná klasifikace stomat podle počtu, uspořádání a tvaru epidermálních buněk obklopujících stomata. V zásadě lze rozlišit dva základní typy stomat a mnoho typů odvozených (viz Obr. 2):

- **stomata izocytická (anomocytická):** epidermální buňky obklopující stomata se neliší od ostatních buněk epidermis. Ontogenetický vývoj je nejčastěji haplocheilický;
- **stomata anizocytická:** epidermální buňky obklopující stomata se liší od ostatních buněk epidermis. Ontogenetický vývoj takového průduchového aparátu bývá nejčastěji syndetocheilický. Dosud bylo popsáno několik desítek typů anizocytických stomat.

K základním kvantitativním znakům stomat patří **délka stomat** (nejčastěji 15–60 μm) a **hustota stomat** (nejčastěji 50–300 stomat/ mm^2). Tyto znaky jsou ovlivněny vnějšími podmínkami prostředí, nejvíce intenzitou radiace, ale do jisté míry také vlhkostními poměry a obsahem živin. U zastíněných

listů (sciofilní listy) jsou stomata delší a méně četná než u slunných listů (heliofilní listy).

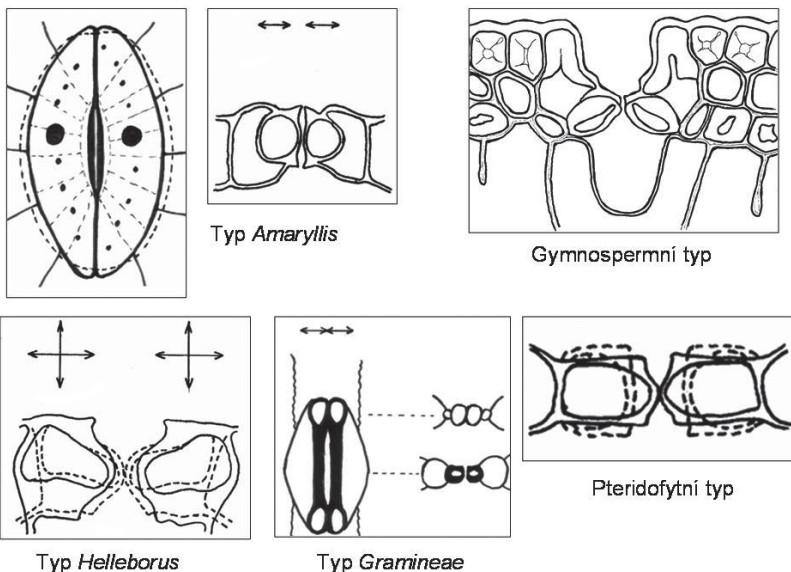
Délka stomat je často v pozitivní korelaci se stupněm ploidie, a proto je využívána jako snadno měřitelný pomocný znak při determinaci cytotypů u druhů vytvářejících polyploidní komplexy. Zjišťování karyotypu nebo měření množství DNA průtokovou cytometrií lze provádět pouze ve vybavené laboratoři, tyto metody jsou, na rozdíl od měření délky stomat, náročné na přístrojové vybavení a vybavení chemikáliemi.

Kvantitativně tvoří průduchové štěrby pouze nepatrnou část listové plochy, přibližně 1 % (v listové epidermis vytvářejí tzv. multiperforátní septum).

2.2 Doporučené náměty (úkoly)

Námět (úkol)	Konkrétní úkoly, popř. otázky k řešení	Postup přípravy preparátů
Klasifikace listů podle umístění stomat	Porovnejte listy: - pokojoyvých rostlin pěstovaných ve třídě (škole, doma); - listy vybraných zástupců dvouděložných rostlin, např. hrách (<i>Pisum</i>), pryskyřník (<i>Ranunculus</i>), hvozdík (<i>Dianthus</i>), jednoděložných rostlin, např. kosatec (<i>Iris</i>), tulipán (<i>Tulipa</i>), srha říznáčka (<i>Dactylis glomerata</i>), pšenice (<i>Triticum</i>), kapradin, např. kapraď samec (<i>Dryopteris filix-mas</i>), osladič obecný (<i>Polypodium vulgare</i>); - listy dřevin v okolí školy. Pokuste se formulovat obecné závěry, např. jaké jsou nejčastější typy listů u listnatých dřevin, trav, kapradin aj.	Otiskový preparát ze svrchní a spodní epidermis listu – list potřeme lakem na nehty a po zaschnutí stáhneme blanku pomocí izolepy a přilepíme na podložní skříčko
Klasifikace stomat podle počtu a tvaru sousedních epidermálních buněk (Obr. 3)	U několika stomat schematicky zakreslete uspořádání sousedních buněk. Pokuste se určit typ stomat (s využitím obrázků). Porovnejte typ stomat u zástupců kapradin, dvouděložných bylin i dřevin, jednoděložných rostlin. Existuje pravidelnost v uspořádání sousedních buněk obklopujících stomata? Je uspořádání a počet sousedních buněk druhově specifické?	Otiskový preparát

Klasifikace stomat podle přítomnosti chloroplastů ve svěracích buňkách	Zjistěte prezenci či absenci chloroplastů ve svěracích buňkách u kapradin a podeňky (<i>Tradescantia</i>). Porovnejte (z hlediska přítomnosti chloroplastů ve svěracích buňkách) stomata světlobytných rostlin (heliofyt), stínobytných rostlin (sciofyt) a vodních rostlin (hydrofyt) rostoucích v okolí školy pěstovaných na školním pozemku nebo v akváriu. Jaký je vliv světla na přítomnost chloroplastů ve svěracích buňkách? Čím se liší stomata kapradin od stomat většiny ostatních rostlin?	Vodní (glycerinový) preparát z malého kousku epidermis
Klasifikace stomat podle anatomické stavby svěracích buněk (Obr. 2)	Zakreslete a porovnejte anatomickou stavbu svěracích buněk (tvar a způsob vyztužení svěracích buněk) na příčných řezech stomat listů zástupců různých systematických skupin. Pokuste se přiřadit pozorovaná stomata k jednotlivým typům (klasifikace podle anatomické stavby). Porovnejte anatomickou stavbu stomat a jejich polohu vzhledem k rovině epidermis u xerofytů (např. oleandru) a hydrofytů (např. stulíku, leknínu). Pokuste se vysvětlit, proč má jehlicovitý list borovice xeromorfní stavbu.	Příčné řezy listovou čepelí zhotovené žiletkou pomocí bezové duše, vodní (glycerinový) preparát, doporučené barvení safraninem. Otiskový preparát



Obr. 2 Klasifikace stomat podle anatomické stavby (kresba autor)

* **Anomocytická (izocytická) stomata:** epidermální buňky obklopující stomata se neliší od ostatních buněk epidermis.



anomocytický typ



anomotetracytický typ

* **Anizocytická stomata:** epidermální buňky obklopující stomata se tvarově liší od ostatních buněk epidermis.



základní
anizocytický
typ



aktinocytický
typ



paracytický
typ



amfanizocytický
typ



cyklocytický
typ



amfiparacytický
typ



diacytický
typ



amficyklocytický
typ



amfidiacytický
typ



brachyparhexacytický –
monopolární typ



koaxillocytický
typ



brachyparhexacytický –
dipolární typ



desmocytický
typ



polocytický
typ



pericytický
typ



kopolocytický
typ



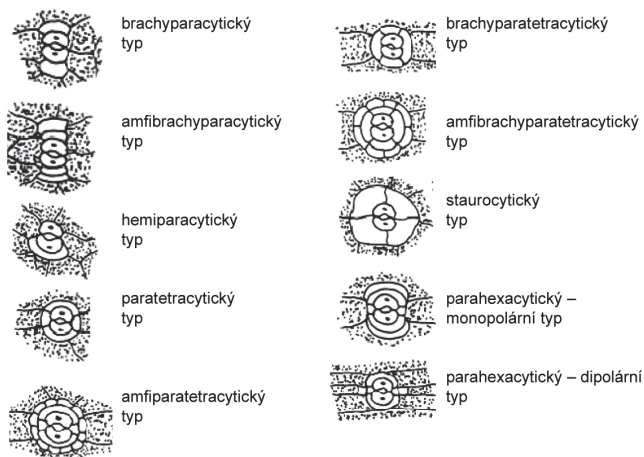
kopericytický
typ



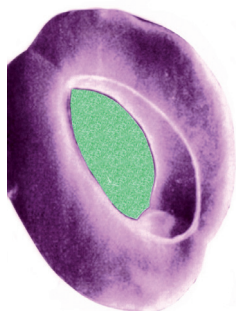
axillocytický
typ



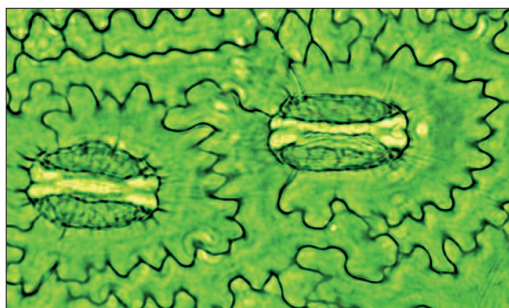
amfipericytický
typ



Obr. 3 Klasifikace stomat podle tvaru, počtu a uspořádání sousedních buněk



Obr. 4 Stoma typu Amaryllis



Obr. 5 Stoma polocytického typu kapradě samce

Použitá literatura a informační zdroje

- Braune W., Leman A., Taubert H. (1967): Pflanzenanatomisches Praktikum. VEB Gustav Fischer – Verlag, Jena.
- Kaussmann B., Schiewer U. (1989): Funktionelle Morphologie und Anatomie der Pflanzen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Nováček F. (1982): Praktikum z rostlinné cytologie a histologie se základy mikroskopické techniky. Rektorát UP v Olomouci.
- Pazourek J. (1975): Pracujeme s mikroskopem. SNTL, Praha.

- Pazourková Z. (1986): Botanická mikrotechnika. Univerzita Karlova, Praha.
- Stace C. A. (1989): Plant Taxonomy and Biosystematics. Edward Arnold, London.
- Vinter V. (2009): Rostliny pod mikroskopem; základy anatomie cévnatých rostlin. 2. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Votrubová O. (2010): Anatomie rostlin. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.

3 Jak rozlišíme dřevo jehličnanů a listnáčů

3.1 Teoretický úvod

Dřevo jehličnanů a listnáčů (= dvouděložných dřevin) je lignifikované sekundární vodivé pletivo (sekundární xylém, deuteroxylém) kmenů a větví stromů a keřů. Strukturou a vlastnostmi dřeva se zabývá xylotomie.

Vodivými elementy dřeva mohou být tracheidy (cévice) nebo pokročilejší tracheje (cévy). Dokonale diferencované tracheidy i tracheje jsou mrtvé, bez buněčného obsahu. Tracheidy jsou protáhlé vřetenovité buňky bez dokonalých perforací v buněčných stěnách. Tracheje jsou protáhlé kapiláry tvořené vertikálně seřazenými tracheálními články. V místě styku tracheálních článků jsou již v buněčných stěnách dokonalé perforace. Stěny tracheid i trachejí deuteroxylému mohou být zesíleny schodovitě, síťovitě, dvůrkatě, vzácně i spirálně. Tracheidy a tracheje vedou vzestupný transpirační proud z kořenů do listů. Deuteroxylém vzniká dostředivým dělením buněk kambia. Přírůstek jarního a letního xylému za sezónu vytváří letokruh (vodivé elementy jarního xylému mají větší průměr a tenčí buněčné stěny než vodivé elementy letního xylému).

Dřevo jehličnanů: má jednoduchou homoxylní stavbu. Vodivé elementy jsou pouze tracheidy s typickými kruhovitými dvůrkatými ztenčeninami, tzv. dvojtečkami (na podélných radiálních stěnách tracheid se jeví jako dvě soustředné kružnice). Tracheidy tvoří přibližně 95 % objemu dřeva. Tracheje a libriformní sklerenchymatická vlákna ve dřevě jehličnanů chybí. Parenchym je málo vyvinutý. Pryskyřičné kanálky jsou schizogenního původu (vznikají rozpuštěním střední lamely a následným rozestoupením buněk), chybí např. ve dřevě jedle (*Abies*), tisu (*Taxus*) nebo jalovce (*Juniperus*).

Dřevo listnáčů: má složitější heteroxylní stavbu. Deuteroxylém listnatých stromů a keřů je tvořen tracheidami, trachejemi, libriformními sklerenchymatickými vlákny, dřevním parenchymem (podélně uspořádaný axiální parenchym) a parenchymem dřeňových paprsků (radiální parenchym).

U listnáčů jsou paprsky vyvinutější než u jehličnanů. Podle distribuce širokých trachejí v letokruhu dělíme dřeva listnáčů na kruhovitě pórovitá dřeva a roztroušeně pórovitá dřeva. Kruhovitě pórovitá dřeva mají velké tracheje pouze v jarním dřevě, takže tvoří na příčném řezu kmenem, popř. větví, nápadný kruhovitý prstenec, hranice mezi jednotlivými letokruhy jsou velmi dobře rozlišitelné. Kruhovitě pórovité dřevo má například dub (*Quercus*) nebo akát (*Robinia*). U roztroušeně pórovitých dřev jsou tracheje přibližně rovnoměrně rozptýleny po celé šířce letokruhu. Hranice mezi jarním a letním dřevem je méně zřetelná. Hranice letokruhů jsou hůře rozlišitelné. Do této skupiny patří převážná většina listnáčů.

3.2 Postup

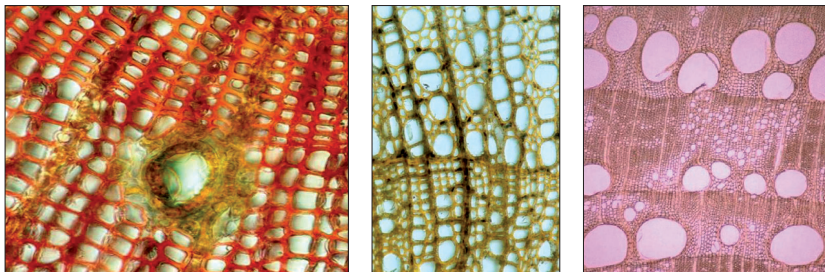
Sběr materiálu: odebíráme vzorky větvíček (krátké špalíky přibližně v síle tužky) různých druhů jehličnanů a listnáčů. Vzorky fixujeme alespoň několik dní v glycerolalkoholu (změkčení dřeva).

Příprava preparátů: žiletkou zhotovíme tenké příčné řezy větvíčkami a připravíme preparát (vodní nebo glycerolový). Ke zvýraznění lignifikovaných stěn tracheid a trachejí můžeme preparát barvit safraninem nebo floroglucinolem a HCl – lignifikované struktury se zbarví intenzivně červeně.

Pozorování pod mikroskopem: na jednotlivých preparátech vybereme nejvhodnější místa k pozorování, zhotovíme jednoduchý náčrt pozorovaného objektu, snažíme se rozlišit struktury identifikující dřevo jehličnanů a listnáčů (tracheidy, tracheje, pryskyřičné kanálky, úzké nebo širší dřeňové paprsky). Pokročilejší studenti se mohou pokusit o determinaci známějších rodů jehličnanů (určování jehličnanů je jednodušší než určování listnáčů). K tomuto účelu je nutné zhotovit i podélné (longitudinální) řezy – radiální (vedený středem) a tangenciální (vedený mimo střed). Určení je možné podle následujícího klíče:

- tracheidy vyztuženy spirálně (patrné na podélných řezech):
 - dřevo s pryskyřičnými kanálky ***Pseudotsuga* (douglaska)**
 - dřevo bez pryskyřičných kanálků ***Taxus* (tis)**
- tracheidy bez spirálních výztuh (patrné na podélných řezech):
 - dřevo bez pryskyřičných kanálků ***Abies* (jedle)**
 - dřevo s pryskyřičnými kanálky:
epitelové buňky vystylající pryskyřičné kanálky velké tenkostěnné ***Pinus* (borovice)**

epitelové buňky vystylající pryskyřičné kanálky drobné, silnostěnné:
parenchym dřevových paprsků bez pryskyřičných inkluzí
(jádro není rozlišeno) **Picea (smrk)**
parenchym dřevových paprsků obsahuje červenožlutou pryskyřici
(jádro výrazné, široké) **Larix (modřín)**



Obr. 1, 2, 3 Příčné řezy homoxylním dřevem borovice (*Pinus*), heteroxylním roztroušeně pórovitým dřevem lípy (*Tilia*) a heteroxylním kruhovitě pórovitým dřevem dubu (*Quercus*) (foto autor)

Použitá literatura a informační zdroje

- Vavřík H. (2002): Anatomická stavba dřeva. http://www-df.mendelu.cz/ldf/ustavy/naukadreva/Projects/stavba_dreva/.
- Vinter V. (2009): Rostliny pod mikroskopem; základy anatomie cévnatých rostlin. 2. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Votrubová O. (2003): Není dřevo jako dřevo. Biologie – chemie – zeměpis, SPN – pedagogické nakladatelství, a. s., nakladatelství učebnic Fortuna, JUDr. F. Talián, Praha. (5). 230–235.

4 Určujeme borovice podle anatomické stavby jehlic

4.1 Teoretický úvod

Jehlice borovic vyrůstají ve svazečcích po 2, 3, 5. Povrch jehlice vykazuje anatomické xeromorfní a heliomorfní adaptace (adaptace snižující transpiraci a omezující vliv radiace) – silná kutikula, sklerenchymatická epidermis a hypodermis, ponořené průduchy ucpávající se voskem, malý transpirační povrch (Obr. 1). Příčinou xeromorfní stavby jehlice je nedokonalé vedení vody tracheidami, potřeba překonání období fyziologického sucha (zmrzlá půda v zimě) a také ochrana před radiací. Pod hypodermis se nachází me-

zofyl tvořený parenchymatickými buňkami s vychlípeninami buněčných stěn směřujícími do nitra buňky (ramenovité buňky). Mezofylem probíhají pryskyřičné kanálky vznikající rozpuštěním střední lamely a rozestoupením buněk (schizogenní původ). Vnější vrstva kanálku je sklerenchymatická, vnitřní parenchymatická vrstva vytváří výstelku (epitel) vylučující pryskyřici. Střední válec obklopuje endodermis, uvnitř se nacházejí kolaterální cévní svazky (jeden nebo dva), transfuzní pletivo a případně i sklerenchymatické pletivo.

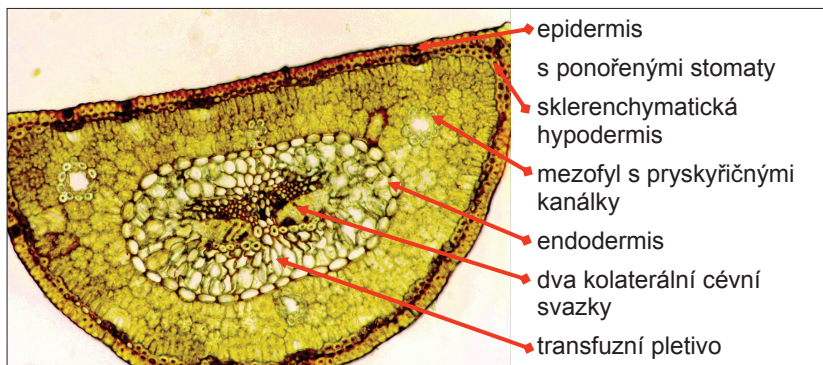
4.2 Postup

Pomocí bezové duše zhotovte vždy několik příčných řezů jehlicemi různých druhů borovic, připravte vodní preparát. S využitím klíče se pokuste vzorky determinovat.

Klíč k určování borovic na základě anatomických znaků na jehlicích:

- | | | | |
|----|---|----|---------------------|
| 1a | Jehlice s 1 cévním svazkem (haploxylní) | 10 | |
| b | Jehlice se 2 cévními svazky (diploxylní) | 2 | |
| 2a | Tvar průřezu jehlicí je kruhová výseč s vnitřním úhlem 120°
(u druhů se 3 jehlicemi) | 3 | |
| b | Tvar průřezu jehlicí je půlkruh (u druhů se 2 jehlicemi) | 5 | |
| 3a | Mezi cévními svazky nejsou sklerenchymatické buňky,
hypodermis 1 – až vícevrstevná | | <i>P. rigida</i> |
| b | Mezi cévními svazky jsou sklerenchymatické buňky,
hypodermis vždy vícevrstevná | 4 | |
| 4a | Buňky vnějších a vnitřních vrstev hypodermis stejné | | <i>P. jeffreyi</i> |
| b | Buňky vnější vrstvy hypodermis s tenčími stěnami
než u vnitřních vrstev hypodermis | | <i>P. ponderosa</i> |
| 5a | Hypodermis vícevrstevná | 6 | |
| b | Hypodermis jednovrstevná | 8 | |
| 6a | Pryskyřičných kanálků v chlorchymu 3–10 | | <i>P. nigra</i> |
| b | Pryskyřičné kanálky v chlorchymu 1–2 | 7 | |
| 7a | Pletivo mezi cévními svazky užší
než šířka cévního svazku | | <i>P. contorta</i> |
| b | Pletivo mezi cévními svazky širší
než šířka cévního svazku | | <i>P. banksiana</i> |
| 8a | Pryskyřičné kanálky uvnitř chlorchymu | | <i>P. nigra</i> |
| b | Pryskyřičné kanálky při hypodermis | 9 | |

- 9a Jehlice na příčném řezu půlelptické, více než dvojnásobně delší než široké, epidermální buňky čtvercové, pryskyřičných kanálků (7–)10–16(–20), mezi cévními svazky mnoho sklerenchymatických buněk *P. sylvestris*
- b Jehlice na příčném řezu půlkruhovitě, nejsou dvojnásobně delší než široké, epidermální buňky obdélníkovité, vyšší než široké, pryskyřičných kanálků 3–5(–7), mezi cévními svazky málo sklerenchymatických buněk, nebo vůbec chybějí *P. mugo* a *P. rotundata*
- 10a Pryskyřičné kanálky nápadně velké, 2–3 uvnitř chlorenchymu *P. cembra*
- b Pryskyřičné kanálky menší, 1–4 při hypodermis *P. strobus* a *P. flexilis*



Obr. 1 Příčný řez jehlicí borovice černé.

Použitá literatura a informační zdroje

Vinter V. (2009): Rostliny pod mikroskopem; základy anatomie cévnatých rostlin. 2. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, 200 p.

Praktická cvičení z biologie 2 – Zkoumáme rostliny v okolí školy

1 Rostliny jako indikátory znečištění životního prostředí

1.1 Teoretický úvod

Bioindikátory jsou organizmy, které svojí přítomností/nepřítomností indikují stav prostředí. Bioindikátorem mohou být cévnaté rostliny, mechorosty, lišejníky, houby, řasy a sinice, suchozemští obratlovci, ryby, hmyz i ostatní bezobratlí.

Bioindikátory lze dělit na:

- hlídky (sentinely) – citlivé organizmy, které do prostředí zavádíme úmyslně, aby ukazovaly jeho okamžité změny;
- detektory – organizmy, které se vyskytují přirozeně a reagují na změny prostředí;
- exploátory (vykořisťovatelé) – organizmy, jejichž přítomnost signalizuje narušení a znečištění prostředí;
- akumulátory hromadiči – organizmy, které přijímají a hromadí chemické látky.

1.2 Postup

Jako bioindikátory vybereme třezalku tečkovanou (*Hypericum perforatum*) a borovici lesní (*Pinus sylvestris*).

Třezalka tečkovaná je velice citlivá k znečištění. Její citlivost se projevuje množstvím a velikostí nekrot (odumřelých tkání) na listech.

- V okolí školy nebo vašeho bydliště vyhledejte rostliny třezalky tečkované.
- Sestírejte listy této rostliny z různých stanovišť.
- U každé sestírané rostliny si poznamenejte lokalitu, kde jste provedli sběr.
- Posuďte rozsah nekrot (procentuální vyjádření nekrot vzhledem k celkové ploše listu) a schematicky rozsah nekrot nakreslete, případně pozorovanou rostlinu vyfotografujte.
- Pokuste se určit příčinu tvorby nekrot na listech třezalky tečkované.

- Rostliny upravte do herbářových položek s řádným označením stanoviště a popisem možného původce nekróz.
- Na základě výše uvedeného popisu jednotlivých typů bioindikátorů přemýšlejte, jaký typ představuje třezalka tečkovaná.
- Zpracujte své výsledky do podoby prezentace a diskutujte své závěry se svými spolužáky.

Stejně jako třezalka tečková i borovice lesní je významným bioindikátorem. Její citlivost ke znečištění se projevuje množstvím a velikostí nekróz na jehlicích.

V okolí školy nebo vašeho bydliště vyhledejte borovice lesní s různým rozsahem nekróz na jejich jehlicích.

- U každého sesbíraného vzorku jehlic si poznamenejte lokalitu, kde jste provedli sběr.
- Posuďte rozsah nekróz (procentuální vyjádření nekróz vzhledem k celkové ploše jehlice) a schematicky rozsah nekróz nakreslete, případně jehlice pozorované borovice lesní vyfotografujte.
- Pokuste se určit příčinu tvorby nekróz na jehlicích borovice lesní.
- Na základě výše uvedeného popisu jednotlivých typů bioindikátorů přemýšlejte, jaký typ představuje borovice lesní.
- Zpracujte své výsledky do podoby prezentace a diskutujte své závěry se svými spolužáky.
- Na základě výsledků promyslete a navrhnete různé možnosti vedoucí ke zlepšení stávající situace znečištění životního prostředí.

Použitá literatura a informační zdroje

<http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1215>.

<http://www.phytopsanitary.org/old/projekty/2004/vvf-12-04.pdf>.

http://arnika.org/soubory/dokumenty/voda/Voda_ziva/Voda_ziva_soutez_skoly/Vysledky_souteze/1etapa_1misto.pdf.

Storch D., Mihulka, S. (2000): Úvod do současné ekologie. 1. vydání. Praha: Portál.
Jelínek J., Zicháček, V. (2007): Biologie pro gymnázia. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc.

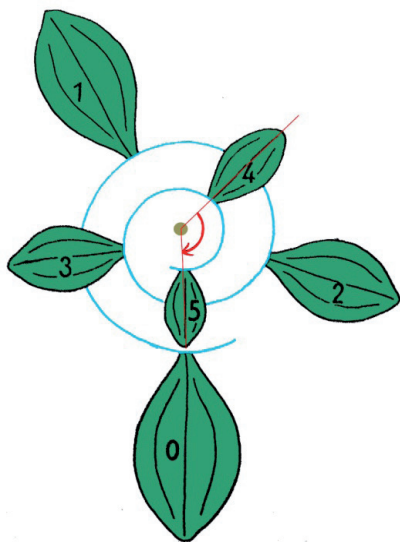
Rosypal S. a kol. (2003): Nový přehled biologie. 1. vydání. Praha: Scientia.

2 Srovnáváme genetické spirály dřevin

2.1 Teoretický úvod

Nejčastější postavení pupenů (listů) u rostlin je střídavé. Střídavě postavené pupeny (listy) po sobě vyrůstající jsou však méně často od sebe vychýleny o úhel 180° . Většinou svírají úhel menší, takže místa (inserce), z nichž na stonku pupeny (listy) vyrůstají, tvoří vzestupnou šroubovici (genetickou spirálu). U některých rostlin se může genetická spirála několikrát otočit kolem stonku, než nalezneme pupen (list), který stojí svisle (v ortostichu) nad pupenem (listem) výchozím. Postavení pupenů (listů) na stonku tedy není náhodné, ale podléhá určitým zákonitostem. Rovina proložená ortostichou a středem stonku se nazývá mediána, dvě sousední mediány svírají divergenční úhel.

$$\text{divergenční úhel} = \frac{a}{b} \cdot 360^\circ$$



Obr. 1 Rozestavení střídavých listů na stonku podle 2/5, tj. 144°

2.2 Postup

V okolí školy vyberte vhodné dřeviny, např. olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), dub letní (*Quercus robur*), buk lesní (*Fagus sylvatica*) aj. Vysledujte genetickou spirálu a vypočtěte divergenční úhel dvou po sobě následujících pupenů u jednotlivých dřevin. Nakreslete postavení jednotlivých pupenů, uspořádaných do genetické spirály při pohledu shora. Vysvětlíte, proč jsou listy na stonku (větví) uspořádané do spirály? Proč je toto postavení listů na stonku (větví) pro rostlinu výhodné?

Použitá literatura a informační zdroje

Slavíková Z. (2002): Morfologie rostlin. Univerzita Karlova, Praha.

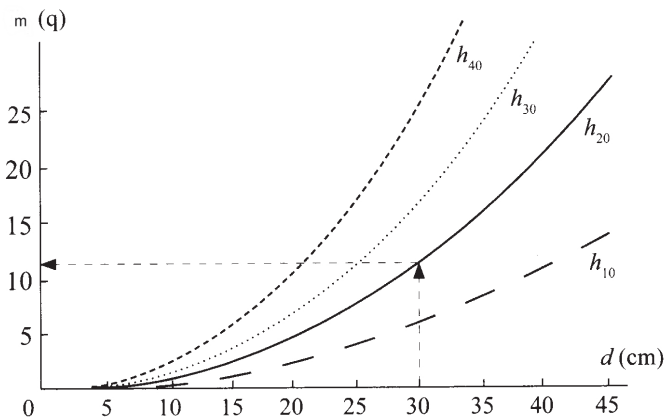
3 Měříme hmotnost stromu

3.1 Teoretický úvod

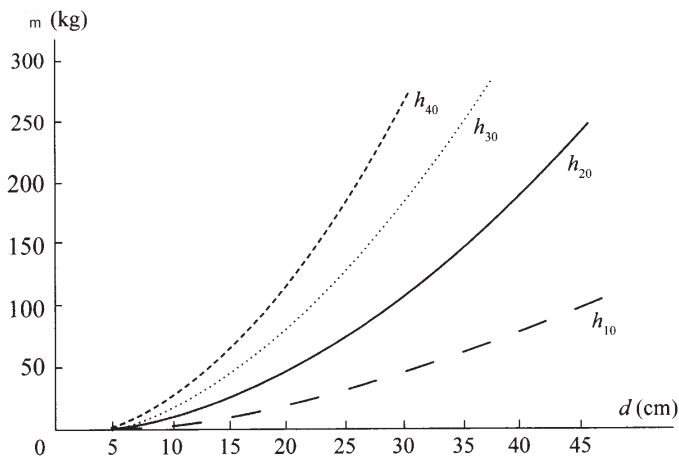
Značnou část fotosyntézou vytvořených organických látek investují stromy do tvorby dřeva kmenů a stromů. Dřevo tvoří podstatnou část hmotnosti stromu, ostatní struktury (lýko, borka, dřevň) jsou u většiny stromů (co se hmotnosti týká) zanedbatelné. Čerstvou hmotnost dřevní hmoty a listů označujeme termínem biomasa. Hmotnost nadzemní části stromu je tedy dána hmotností biomasy kmene, větví a listů.

3.2. Postup

V parku či lese vyberte vhodné stromy k měření, určete druhy stromů. Při zjišťování biomasy stromu nejprve změřte obvod kmene ve výšce 130 cm pomocí provázku a vypočtěte průměr kmene – obvod (cm) / π = průměr kmene (d). Poté vypočítejte přibližnou výšku stromu h (na základě podobností trojúhelníka). Konečný výsledek získáte tak, že odečtete z grafu pro příslušnou hodnotu h a d hmotnost biomasy kmene větví a listů m (q).



Graf 1 Graf k výpočtu biomasy dřeva kmene a větví v závislosti na průměru a výšce kmene. V grafu je zanesen modelový příklad pro strom 20 m vysoký s průměrem kmene 30 cm – z grafu odečtená hmotnost biomasy je přibližně 12 q



Graf 2 Graf k výpočtu celkové biomasy listů stromu v závislosti na průměru a výšce kmene

Použitá literatura a informační zdroje

Stoklasa J. (2006): Klíče a návody k praktickým činnostem v přírodopisu, biologii a ekologii pro ZŠ a SŠ. SPN, Praha.

doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
PaedDr. Ing. Vladimír Vinter, Dr.

Praktická cvičení z chemie a biologie pro středoškolské studenty

Výkonný redaktor prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.
Odpovědná redaktorka Mgr. Hana Pochmanová
Technická redakce VUP
Návrh a grafické zpracování obálky Jiří Jurečka

Vydala a vytiskla Univerzita Palackého v Olomouci
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
www.vydavatelstvi.upol.cz
www.e-shop.upol.cz
vup@upol.cz

1. vydání

Olomouc 2013

ISBN 978-80-244-3650-0

Neprodejná publikace

VUP 2013/489