



O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O'RTA MAXSUS
TA'LIM VAZIRLIGI

ISLOM KARIMOV NOMIDAGI TOSHKENTDAVLAT
TEXNIKA UNIVERSITETI

"MUXANDISLIK TEXNOLOGIYALARI" FAKULTETI

Abdullayeva G.T., Toshtemirova M.J., Xojjiyeva S.N., Soatov A.M.



fanidan amaliy mashg'ulotlarni bajarish uchun

USLUBIY KO'RSATMA

Toshkent – 2022



O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O'RTAMAXSUS TA'LIM
VAZIRLIGI
ISLOM KARIMOV NOMIDAGI TOSHKENTDAVLATTEXNIKA
UNIVERSITETI

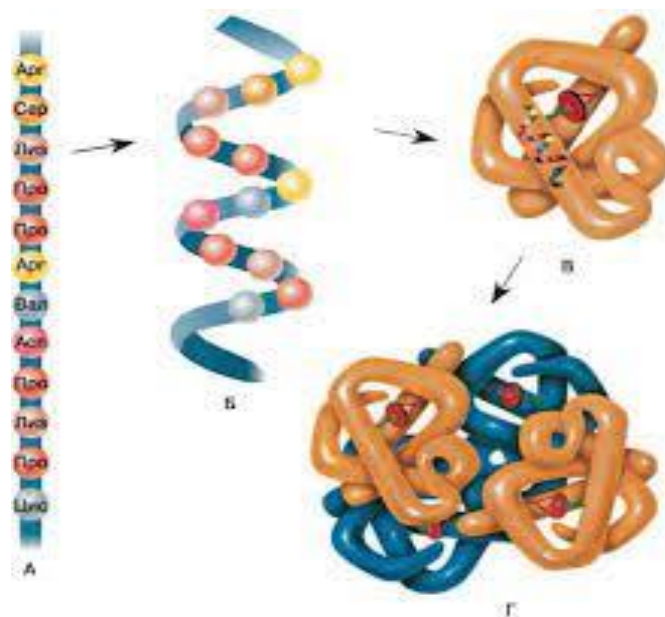
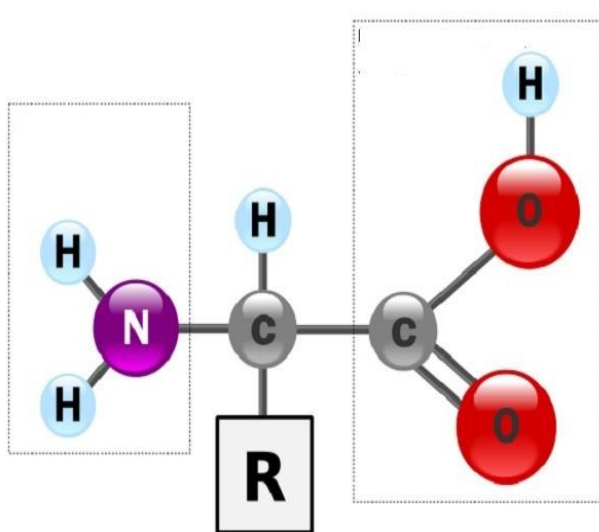
“MUXANDISLIK TEXNOLOGIYALARI” FAKULTETI

«BIOTEXNOLOGIYA» kafedrası

OQSILLAR MUHANDISLIGI

fanidan amaliy mashg'ulotlarni bajarish uchun

USLUBIY KO'RSATMALAR



Toshkent – 2022

KIRISH

Hozirgi vaqtda oqsil muhandisligining eng mashhur qo'llanilishi "ekologik toza" sanoat jarayonlarini ishlab chiqish uchun fermentlarning katalitik xususiyatlarini o'zgartirishdir. Sanoat dasturlariga qo'shimcha ravishda, oqsil muhandisligi tibbiyot ishlanmalarida o'zining munosib o'rnini topdi. Tadqiqotchilar viruslar va mutant o'simtalarni keltirib chiqaruvchi genlar bilan bog'lanib, ularni zararsiz holga keltiradigan oqsillarni sintez qilishmoqda; yuqori samarali vaksinalar yaratish va ko'pincha farmatsevtika preparatlari uchun maqsad bo'lgan hujayra yuzasi retseptorlari oqsillarini o'rganish. Oziq-ovqat mahsulotlarini yaxshilash bo'yicha olimlar o'simlik oziq-ovqatlarini, shuningdek, jelleştirici moddalarni yoki quyushtiruvchi moddalarni saqlaydigan oqsillarning sifatini yaxshilash uchun protein muhandisligidan foydalanadilar.

Oqsillar muhandisligini qo'llashning yana bir sohasi kimyoviy va biologik hujumlar uchun ishlatilishi mumkin bo'lgan moddalar va mikroorganizmlarni zararsizlantirishi mumkin bo'lgan oqsillarni yaratishdir. Masalan, gidrolaza fermentlari asab gazlarini ham, qishloq xo'jaligi pestitsidlarini ham zararsizlantirishi mumkin. Shu bilan birga, fermentlarni ishlab chiqarish, saqlash va ishlatish atrof-muhit va inson salomatligi uchun xavfli emas. O'zgartirilgan oqsilni olish uchun kombinatoriyal kimyo usullari qo'llaniladi va yo'naltirilgan mutagenез - aminokislotalar ketma-ketligida ma'lum o'zgarishlarga olib keladigan kodlovchi DNK ketma-ketliklarida o'ziga xos o'zgarishlarni kiritish. Istalgan xossalarga ega bo'lgan oqsilni samarali loyihalash uchun oqsilning fazoviy tuzilishini shakllantirish qonuniyatlarini bilish, uning fizik-kimyoviy xususiyatlari va funktsiyalari bog'liqligini bilish kerak, ya'ni oqsilning birlamchi tuzilishi qanday ekanligini bilish kerak. , uning har bir aminokislota qoldig'i oqsilning xususiyatlari va funktsiyalariga ta'sir qiladi. Afsuski, ko'pchilik oqsillar uchun uchinchi darajali tuzilma noma'lum, kerakli xususiyatlarga ega bo'lgan oqsilni olish uchun qaysi aminokislotalar yoki aminokislotalar ketma-ketligini o'zgartirish kerakligi har doim ham ma'lum emas. Allaqachon, kompyuter tahlilidan foydalanadigan olimlar aminokislotalar qoldiqlari ketma-ketligi asosida ko'plab oqsillarning xususiyatlarini taxmin qilishlari mumkin. Bunday tahlil kerakli oqsillarni yaratish tartibini sezilarli darajada soddalashtiradi. Shu bilan birga, kerakli xususiyatlarga ega modifikatsiyalangan oqsilni olish uchun ular asosan boshqa yo'l bilan boradilar: ular bir nechta mutant genlarni oladi va ulardan birining kerakli xususiyatlarga ega bo'lgan protein mahsulotini topadi.

Fanni oqitishdan maqsad oqsilarning kimyoviy tuzilishini o'rganish uchun ularni individual xolda qanday qilib biologik ob'ektlardan ajratib olish, ularni biologik faolligini aniqlash uslublari va oqsillar muhandisligi metodlari yordamida qanday qilib sanoat miqiyosida qollsh imkoniyatlari xaqida talabalarga aniq bilim berish, xamda biotexnologik yondoshishlar asosida turli maxsulotlat olishni zamonaviy texnologiyasini yaratish bo'yicha bilim, ko'nikma va malakani shakllantirishdir.

Fanning vazifasi- talabalarga zamonaviy biotrxnologiyaning asosi bo'lgan «oqsillar kimyosi» soxasida keyingi paytlarda shiddatli rivojlanayotgan zamonaviy fizik-kimyoviy usullarni tushuntirish, ulardan foydalanish usullarini o'rgatish, xamda ko'pgina usullarni takomillashtirish ko'nikmalarni shakllantirish, fanni hozirgi zamonda tutgan o'rni va fan yutuqlari bilan talabalarni tanishtirishdan iborat.

1-AMALIY MASHG'ULOT

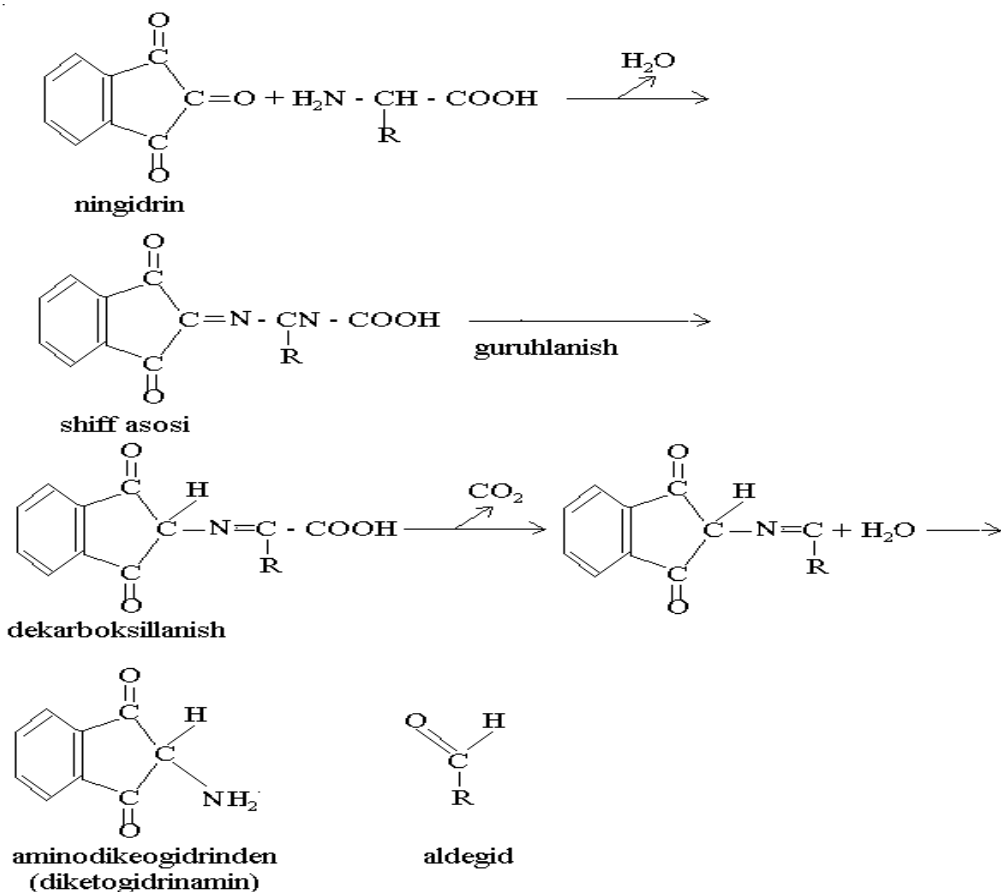
OQSIL MOLEKULASINING AMINOKISLOTA TARKIBINI ANIQLASH USULLARI

α -AMINOKISLOTLARGA O'TKAZILADIGAN NINGIDRIN REAKSIYASI

Ushbu reaksiya aminokislotalarning α -holatida turgan aminoguruhlariga xosdir.

Reaksiyaning asoslanishi. Ningidrin ta'sirida oksidlangan α -aminokislota dezaminlanadi, dekarboksillanadi. Natijada CO_2 , ammiak, aldegid hosil bo'ladi. Oksidlangan ningidrin qaytarilgan ningidrinning ikkinchi molekulasi bilan ammiak ishtirokida birikib binafsha-ko'k rangli kondensatsiyalangan mahsulotni hosil qiladi.

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

Reaktivlar: 0,1% li ningidrinning spirtli eritmasi.

Kerakli anjomlar: probirka va shtativlar, pipetkalar, spirt lampasi.

Bajariladigan ish tartibi. Probirkadagi 4-5 tomchi oqsil eritmasiga 3-4 tomchi ningidrin eritmasidan solib, 1-2 daqiqa qizdiriladi. Ko'kimtir-binafsha yoki binafsha rang hosil bo'ladi.

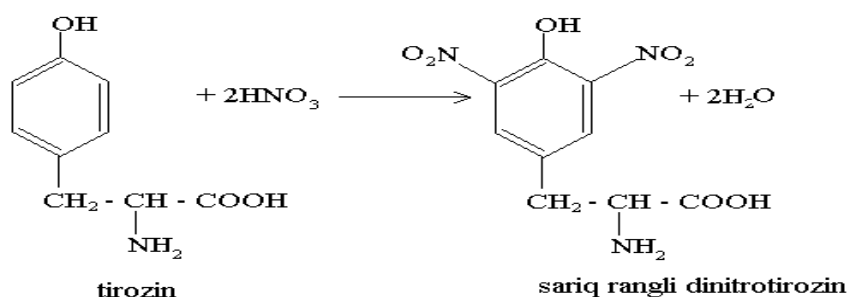
2-AMALIY MASHG'ULOT

SIKLIK AMINOKISLOTALARGA O'TKAZILADIGAN KSANTOPROTEIN REAKSIYASI

Ushbu reaksiya oqsil eritmasida siklik aminokislotalar, fenilalanin, tirozin, gistidin va tpirtof an borligini isbotlaydi.

Reaksiyaning asoslanishi. Oqsil eritmasiga konsentrlangan nitrat kislota qo'shilganda benzol xalqaning nitrallanishi natijasida sariq rang hosil bo'ladi. Eritmaga ishqor qo'shilganda esa, u sarg'ish- pushti rangga o'tadi (sariq rangli nitrobirikma hosil bo'ladi).

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Tekshiriluvchi material. Oqsil eritmasi.

Reaktivlar: konsentrlangan nitrat kislota, natriy gidroksidning 20% li eritmasi.

Kerakli anjomlar: probirkalar, pipetkalar, shtativlar, spirt lampasi.

Bajariladigan ish tartibi. 4-5 tomchi oqsil eritmasiga 1-2 tomchi konsentrlangan nitrat kislota solib, ehtiyotkorlik bilan qizdiriladi. Suyuqlik dinitrotirozin hosil bo'lganligi sababli sariq tusga kiradi. Eritma ustiga 2-3 tomchi natriy gidroksid eritmasidan solinganda sarg'ish-pushti rang hosil bo'lgani kuzatiladi, chunki dinitrotirozinning natriyli tuzi hosil bo'ladi.

3-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

OQSIL GIDROLIZATI – AMINOKISLOTALAR ARALASHMASINI XROMATOGRAFIYA USULI BILAN AJRATISH

Gidrolizat tarkibidagi aminokislotalar aralashmasini ajratish va ayrim aminokislotalarning sifat va miqdorini aniqlashda qog'ozda o'tkaziladigan taqsimlovchi xromatografiya usuli keng qo'llaniladi. Bu usul M.C.Цвет ning 1903 yilda taklif qilgan xromatografiya analizining o'zgartirilgan ko'rinishidir.

Aminokislotalarni ajratish ularni ikkita aralashmaydigan eritmada (biri suv, ikkinchisi suv bilan to'yintirilgan organik eritma) erish xususiyatini aniqlash orqali amalga oshiriladi. Hozirgi vaqtda xromatografiya usulining quyidagi xillari mavjud: adsorbsion usul aminokislotalarning turli adsorbentlarda adsorbsiyalanishiga bog'liq; ion almashtiruvchi xromatografiya usuli aminokislotalarning zaryadiga qarab kationit yoki anionitlardan foydalaniladi. Afin xromatografiya – xususiy bog'lanish holatiga ega bo'lgan fermentlar, immunoglobulinlar, retseptor va gormonlardan foydalanib tegishli birikmalar ajratiladi.

Aminokislotalar aralashmasini qog'oz xromatografiya usuli bilan ajratish. Ushbu usul mahsus tayyorlangan xromatografiya – filtr qog'ozida o'tkaziladi. Namlangan kameraga joylashtirilgan xromatografiya qog'ozini 20-22% suvni ushlab qolish xususiyatiga ega. Demak, suv harakatlanmaydigan faza, chunki u qog'ozga shimilgan, harakatlanuvchi faza sifatida organik erituvchilardan foydalaniladi. Ularga suv bilan to'yintirilgan izopropil, izobutil, butil spirtlari, fenol va boshqalar kiradi. Xromatografiya qog'oziga bir tochi aminokislota aralashmasidan tomiziladi, qog'ozning ikkinchi uchi tegishli organik erituvchiga tushiriladi. Erituvchi qog'oz bo'lakchasi bo'ylab shimila boshlaydi va erigan aminokislota o'zi bilan birga yo'naltiradi. Aminokislotalarning qog'oz bo'lakchasidagi harakatlanish tezligi uning eruvchanligiga bog'liq. Aminokislota suvda qancha yaxshi erisa, organik erituvchida shuncha yomon eriydi va organik erituvchiga nisbatan harakatlanish tezligi sust bo'ladi. Shu yo'l bilan aminokislotalar turli masofada taqsimlanadi.

Aminokislotalarni xromatografiya qog'ozida harakatlanishiga qarab; yuqoriga, pastga va doira bo'ylab harakatlanuvchi xromatografiya turlari tafovut qilinadi.

Aminokislotalarning xromatografiya qog'ozida taqsimlanish masofalari α -aminokislotalar uchun o'tkaziladigan ningidrin reaksiyasi yordaida aniqlanadi. Aralashmadagi muayyan aminokislota aniqlash uchun xromatografiya qog'oziga guvoh aminokislotalar tomiziladi va shu aminokislotalarning masofasiga ko'ra tegishli aminokislota taqsimlanish koeffitsienti R_f ga ko'ra aniqlanishi mumkin.

$R_f = a/b$. Bunda α -aminokislotalarning tomizilgan joydan o'tgan masofasi, b – eritmaning o'tgan masofasi. Masofalar mm da o'lchanadi.

Koeffitsient R_f har qanday aminokislota uchun tajriba o'tkazilayotgan sharoitda xususiy kattalikdir.

Tekshiriluvchi material: gidrolizlangan aminokislota aralashmasi.

Reaktivlar: tirozinning 0,4% li eritmasi, glutamin kislotaning 0,6% li eritmasi, leysinining 0,5% li eritmasi, ningidrinning atsetondagi 0,2% li eritmasi va yuqoridagi aminokislotalar aralashmasi, erituvchi sistemalari 15:15:10 nisbatda olingan butil spirti, sirka kislota va suv aralashmasi.

Kerakli anjomlar: xromatografiya filtr qog'oz, Petri kosachasi, xromatogrammalarni ilish uchun moslama, purkagich, 105°C li quritgich shkaf, qaychi, skalpellar, shisha tomizgichlar, qalin nina.

Bajariladigan ish tartibi. Xromatografiya usuli bilan aminokislotalarni ajratish uchun ishlatiladigan kameralar 6-rasmda keltirilgan (yuqoriga, pastga va aylana harakatlanadigan aminokislotalar xromatografiyasi).

1. Xromatografiya filtr qog'ozidan 11x11 sm li to'rtburchaklar yasaladi. To'rtburchak oddiy qora qalam bilan to'rt qismga bo'linadi. Chiziqlar kesishgan nuqtadan radiusi 10 mm bo'lgan aylana chiziladi. To'rtburchakning tomonlari tartib raqamlari bilan belgilanadi. Shundan so'ng xromatografiya qog'ozini Petri kosachasiga (7-rasmdagi kabi) o'rnatiladi. Uning chetlari Petri kosachasining ustida bo'lishi kerak.

2. Har qaysi bo'linmaga ingichka tomizgich yordamida sinama aminokislota va ularning aralashmasi ehtiyotlik bilan tomiziladi (8-rasm). Erituvchilarning shimilishi uchun xromatografiya qog'ozining o'rtasidagi teshikchaga filtr ustunchasi o'rnatiladi. Xromatografiya kameraga shu teshikcha orqali qalin nina bilan 10-15ml erituvchi solinadi. Idishning tubi erituvchi bilan to'ldirilgan bo'lishi kerak. Kamera qopqoq bilan berkitiladi. Filtr orqali erituvchi sekin-asta xromatografiya qog'ozining yuqorisiga qarab yo'naladi. Erituvchi xromatogramma chegarasiga yaqinlashganda jarayon tugatiladi, erituvchi yetgan chegara qalam bilan belgilanadi. Shundan keyin xromatogramma maxsus moslamaga joylashtirilib, 100-120°C li quritilgich shkafda quritiladi, shunda ajratilgan aminokislotalar qog'ozga o'rnatiladi. Quritish jarayoni 5-10 daqiqa, ya'ni erituvchining hidi atrofga tarqalguncha davom ettiriladi. Quritilgan xromatogramma aminokislotalarni aniqlash uchun ningidrin eritmasi purkaladi va yana quritiladi. Natijada aminokislotalar o'rnanish joyda bog' hosil bo'ladi (8-rasm).

3. Har qaysi aminokislotalarning « R_f » si topiladi va sinama aminokislota bilan aralashmadagi aminokislota solishtiriladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Xromatografiya usulining asoslanishini, turini hamda olingan natijalarni daftarga yozib, tegishli xulosa chiqaring. Aminokislotalarni aniqlashning ahamiyatini eslab qoling.

4-АМАЛИЙ МАШҲУЛОТ

OQSILLARGA HOS SIFAT REAKSIYALAR

OQSIL MIQDORINI BIURET USULI BILAN ANIQLASH

Usulning asosi. Barcha oqsillar ishqoriy muhitda mis (II) sulfat eritmasi bilan binafsha rangli birikma hosil qiladi. Eritmaning rangi oqsil miqdoriga to'g'ri proporsional. Bo'yalgan eritma kolorimetrlanadi, topilgan eritma zichligiga ko'ra avvaldan tayyorlangan o'lchov egri chizig'idan oqsil miqdori topiladi.

Tekshiriluvchi material: 0,5%; 1,0%; 1,5% li va konsentratsiyasi noma'lum bo'lgan oqsil eritmasi.

Reaktivlar: Biuret reaktivi (tayyorlanishi 284-betda).

Kerakli anjomlar: Probirkalar, shtativlar, byuretkalar. Fotoelektrokolorimetr (FEK), qalinligi 1 sm bo'lgan kyuvetalar.

Bajariladigan ish tartibi. To'rtta quruq probirka olib uning birinchisiga 0,5% li, ikkinchisiga 1,0% li, uchinchisiga 1,5% li oqsil eritmasi solinadi. Ushbu eritmalar o'lchov egri chizig'ini tayyorlash uchun kerak bo'ladi. To'rtinchi probirkaga miqdori noma'lum bo'lgan oqsil eritmasidan solinadi. Maqsad ana shu probirkadagi oqsil miqdorini aniqlash hisoblanadi.

2. Har qaysi probirkaga 4 ml dan biuret reaktivi quyiladi, yaxshilab aralashtirilgach, xona haroratida 20 daqiqaga qoldiriladi. Shunda eritma asta-sekin rangga kiradi. Rangli eritmaning zichligi yashil nur filtri qarshisida (FEK ning 540 nm to'lqin uzunligida) 1 sm qalinlikdagi kyuvetada o'lchanadi. Nazorat sifatida biuret reaktividan foydalaniladi.

3. Birinchi uchta probirkadan olingan natija bo'yicha o'lchov egri chizig'i chiziladi. Ordinata o'qiga optik zichlik natijalari, absissa o'qiga esa konsentratsiyasi ma'lum bo'lgan doimiy eritma natijalari keltiriladi.

Miqdori noma'lum bo'lgan oqsil eritmasi zichligini bilgan holda o'lchov egri chizig'idan foydalanib, izlangan oqsil miqdori topiladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Usulning asosini, o'lchov egri chizig'ini va topilgan oqsil miqdorini daftaringizga yozib, tegishli xulosa chiqaring.

OQSIL MIQDORINI LOURI USULI BILAN ANIQLASH

Ushbu usul bilan juda kam miqdordagi oqsilni aniqlash mumkin.

Usulning asosi. Usul ko‘k rangga bo‘yalgan mahsulotlarning hosil bo‘lishiga asoslangan. Oqsil ishqoriy sharoitda mis ionlari bilan biuret reaksiyasi va molibdenfosfat tuzlarini, volframfosfat tuzlari bilan qaytarilib ko‘k rangni hosil qiladi. Rangning och-to‘qligi oqsil miqdoriga bog‘liq.

Tekshiriluvchi material: oqsilning 1% li va 50,100 marta suyultirilgan eritmalari.

Reaktivlar: «S» va «E» reaktivlari.

Kerakli anjomlar: probirka va shtativlar, 1 ml li o‘lchov pipetkasi, byuretkalar, FEK, 1 sm qalinlikdagi kyuvetalar.

Bajariladigan ish tartibi. Bir qator probirkalarga jadvalga muvofiq oqsil eritmalari va tegishli reaktivlar solinadi.

1-jadval

Probirkalarning tartibi	Oqsil eritmasi	Suv	E reaktivi	S reaktivi	Optik zichlik
1	-	1 ml	5 ml	0,5 ml	
2	-	1 ml	5 ml	0,5 ml	
3	0,15	0,85 ml	5 ml	0,5 ml	
4	0,2	0,8 ml	5 ml	0,5 ml	
5	0,3	0,7 ml	5 ml	0,5 ml	
6	0,5	0,5 ml	5 ml	0,5 ml	

Eritma solingan probirkalar yaxshilab aralashtiriladi va xona haroratida 30 daqiqa qoldiriladi. Probirkadagi eritmalar oqsil miqdoriga bog‘liq holda bo‘yaladi. Probirkadagi eritmalar vaqt o‘tgandan so‘ng (670 nm to‘lqin uzunligida) qizil nur filtrida, 1 sm qalinlikdagi kyuvetada fotoelektrokolorimetrlanadi yoki 660 nm to‘lqin uzunligida spektrofotometrlanadi. 3-6- probirkalarga oqsil miqdori bo‘yicha o‘lchov egri chizig‘i chiziladi va undan foydalanib tekshirilayotgan oqsil miqdori topiladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Usulning asosi, o‘lchov egri chizig‘i va noma‘lum oqsil miqdori daftarga yoziladi, tegishli xulosa chiqariladi.

5-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

ОҚСИЛ ВА ПЕПТИДЛАРНИ ТОЗАЛИК ДАРАЖАСИНИ ТАҲЛИЛ ҚИЛИШ ЙОЛЛАРИ

Hujayra tarkibidagi oqsilni ajratib olish va tozalash quyidagi bosqichlarni o‘z ichiga oladi:

1. hujayra devorini buzish, hujayra struktura elementlarini ajratib olish va ulardan oqsilni sollyubilizatsiyalash, ya‘ni oqsilni eritmaga o‘tkazish;

2. tegishli oqsilni boshqa oqsillardan ajratish yoki qisman tozalash (cho'ktirish, tuzlash).

3. oqsilni gel — fil'tratsiya, ion almashinuv yoki adsorbtsion xromotografiya hamda gel — elektroforez va boshqa usullar yordamida to'liq tozalash.

HUJAYRA OQSILINI AJRATISH

Hujayra oqsilini ajratib olish uchun dastlab hujayra bir butunligini ta'minlab turuvchi hujayra devorini buzish lozim. Bu jarayonni amalga oshirish uchun kerakli uslub va sharoit ob'ektning xususiyatidan kelib chiqib tanlanadi. Masalan: xayvon organlari, o'simlik barglari qaychi va pichoq yordamida kesib maydalanadi (yoki go'sht qiymalagichdan chiqariladi) va maxsus gomogenizator yordamida bir xil massa — gomogenat holiga keltiriladi. Bakteriya va boshqa mikroorganizmlar biomassasidan gomogenat hosil qilishda kvarts yoki shisha qum, maxsus inert moddalardan tayyorlangan mayda sharchalar bilan xovonchada ezish, ultratovush ta'sir ettirish, press yoki tegirmondan o'tkazish kabi usullardan foydalaniladi.

Mikroorganizm hujayrasining mustahkam devorini buzishda gidrolitik fermentlar keng qo'llaniladi. Masalan: lizotsim hujayra devorini hosil qiluvchi peptidoglikanni parchalaydi, bunda hujayra protoplastiga ziyon etmaydi, hujayraning bir butunligi saqlanib qoladi. «Devorsiz» hujayrani distillangan suvga solib hujayra oqsilini eritmaga o'tkazish mumkin. Distillangan suv hujayraning yarim o'tkazgich membranasi orqali ichkariga kirib, u erdagi osmotik bosimni oshiradi, natijada hujayra yoriladi. Hujayraning komponentlari bilan bir qatorda tsitoplazmatik oqsillar ham eritmaga o'tadi. To'qimani (hujayrani) gomogenlash, oqsilni ekstraktsiya qilish, ajratish va tozalash vaqtida temperatura, eritma muhitining rN ko'rsatkichi katga ahamiyatta ega. Chunki oqsillar labill moddalar bo'lib xona temperaturasida qisman denaturatsiyaga uchrashi, fermentlar esa o'z aktivligini yo'qotishi mumkin. Shu sababli barcha jarayonlar past temperaturada (2°S dan +4°S gacha) olib boriladi.

Eritma muhiti oqsilning xususiyatiga ko'ra tanlanadi. Asosan rN —7 bo'lgan bufer eritmalar qo'llaniladi, chunki ko'pchilik fermentlar o'ta ishqoriy, hamda nordon muhitlarda o'z aktivligini yo'qotadi. Ajratib olish va tozalash vaqtida ferment stabilligini oshirish uchun bufer eritmaga EDTA, merkaptotanol, saharoza kabi stabillovchi moddalar qo'shish mumkin.

Hujayra devori buzilib, oqsil eritmaga o'tkazilgach, gomogenat tsentrifugalanadi. Bunda hujayra qobiqlari cho'kadi va eritmada erigan moddalar, shu jumladan oqsillar ham supernatantga o'tadi. Cho'kma 1—2 marta bufer eritma bilan yuvib tsentrifugalanadi va supernatant avvalgilariga qo'shiladi. Keyingi tozalash ishlarida tiniq holdagi supernatant qo'llaniladi, cho'kma esa tashlab yuboriladi.

OQSILLARNI QISMAN TOZALASH

Ajratib olingan supernatant tarkibida xususiyatlari o'rganilayotgan oqsildan tashqari yana ko'plab boshqa oqsillar ham mavjud. Ulardan tegishli oqsilni ajratib olishda oqsillarning eruvchanlik xususiyatidan foydalaniladi. Ko'pchilik oqsillarning eruvchanligi muhitning rN ko'rsatkichi, ion kuchi, og'ir metall ionlari va organik erituvchilarning ta'siriga bog'liq bo'lib, har bir oqsil uchun o'ziga xosdir. Qisman tozalash davomida tegishli oqsil eritmada qoldirilib, «keraksizlari» cho'kmaga tushiriladi yoki aksincha tegishli oqsil cho'kmaga tushirilib, tsentrafuga yordamida ajratib olinib, supernatant tashlab yuborilishi mumkin.

Oqsilni cho'ktirish uchun quyidagi usullar qo'llaniladi: termik ishlov, eritma rNni o'zgartirish, og'ir metal ionlari, organik erituvchi va tuzlar yordamida cho'ktirish.

Termik ishlov berish usulidan faqat termostabil oqsillarni ajratib olishda foydalaniladi. Eritmaning rN muhitini o'zgartirish usuli bilan cho'ktirish oqsilning izoelektirik nuqtasini hisobga olgan xolda olib boriladi. Kislota yoki ishqorni tomchilatib qo'shish natijasida muhitning rNi o'zgartiriladi va oqsilning izoelektrik nuqtasiga mos kelganda cho'kma hosil bo'ladi. Cho'kma tsentrifugada ajratib olinadi, eritmada qolgan nokerak oqsillar tashlab yuboriladi.

Oqsillarni cho'ktirishda og'ir metall ionlaridan simob, qo'rg'oshin, mis, kumush ishlatiladi. Bu xolda oqsil denaturatsiyaga uchraydi va murakkab kompleks hosil qilib cho'kmaga tushadi. Bunday cho'ktirishda tez qayta ishlov berish hal qiluvchi rol o'ynaydi. Chunki yuqoridagi ionlarning uzoq vaqt ta'sir etishi qaytmas denaturatsiyaga olib kelib, fermentlarning inaktivatsiyasiga sabab bo'lishi mumkin.

Organik erituvchilardan — metanol, etanol, atseton oqsil molekulasining suvli qavatini tortib oladi (degidratlash). Natijada oqsillar birikib cho'kmaga tushadi. Xona haroratidagi organik erituvchilar oqsilning qaytmas denaturatsiyasiga sabab bo'lishi mumkin. SHu sababli organik erituvchilarni — 15° —20°S gacha sovutib eritmani aralashtirib turgan holda asta —sekin qo'shiladi.

Ko'pchilik hollarda oqsilni tozalash uchun bir necha usul ketma —ket qo'llaniladi. Oqsillarni cho'ktirishda eng ko'p qo'llaniladigan usullardan biri neytral tuzlar yordamida tuzlash hisoblanadi. Bu usul bilan cho'ktirishda ko'pincha ishqoriy — er metallarining tuzlaridan foydalaniladi.

6-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

ZAMONAVIY SPEKTROFOTOMETRIK USULLAR YORDAMIDA OQSIL VA PEPTIDLARNI TUZILISHINI ORGANISH USULLARI OQSIL MIQDORINI SPEKTROFOTOMETRIK USUL BILAN ANIQLASH

Oqsil tarkibiga kiruvchi aminokislotalardan triptofan, tirozin, fenilalanin ultrabinafsha nurlarni (kamroq darajada) yutish qobiliyatiga ega. 280 nm toʻlqin uzunligidagi oqsil eritmalarining zichligi yuqoridagi aminokislotalar miqdoriga toʻgʻri proporsional. Ushbu usul oqsil aralashmasining turli miqdorini oʻlchashda yaxshi natija beradi.

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

Reaktivlar: triptofan, tirozin va oqsil eritmaları.

Kerakli anjomlar: probirka va shtativlar, oʻlchovli pipetkalar spektrofotometr.

Bajariladigan ish tartibi. Rangsiz va tiniq triptofan, tirozin va oqsil eritmaları navbati bilan 280 nm toʻlqin uzunligidagi va 1 sm qalinlikdagi kyuvetada spektrofotometrdan oʻtkaziladi, soʻngra eritmalarining optik zichligi topiladi. Topilgan zichlik boʻyicha oldindan tayyorlangan oʻlchov egri chizigʻidan foydalanib tegishli miqdorlar aniqlanadi. Oqsil miqdori Adams nomogrammasidan topilishi mumkin.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Spektrofotometrik usulning asosini, olingan natijalarni daftaringizga yozib, xulosa chiqaring.

Quyidagi savollarga javob bering.

1. Oqsil miqdorini qanday usullar bilan aniqlash mumkin?
2. Biuret, Louri, spektrofotometrik usullar qanday reaksiyalarga asoslangan. Ushbu usullarning qaysi biri orqali oqsilning eng kam miqdorini oʻlchashi mumkin?
3. Biologik suyuqlikdagi oqsil miqdori 15 mg/l ni tashkil qilsa, qanday usuldan foydalanish maʼqulroq boʻladi?

7-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

FERMENTLAR, GORMONLAR VA BOSHQA BIOLOGIK FAOL OQSILLARNI FUNKSIYALARINI SHRGANISH USULLARI

BUQOQ BEZI YOKI QORA TALOQ TOʻQIMASIDAN DEZOKSIRIBONUKLEOPROTEINNI AJRATISH

Dezoksiribonukleoproteinni buqoq bezi toʻqimasidan ajratib olish uning ishqoriy va tuzli eritmalarda yaxshi erib, suvda erimasligi va shuning uchun ishqoriy eritmalarini neytrallaganda yoki tuzli eritmalarini suyultirilganda DNP

choʻkmaga tushishiga bogʻliq. Dezoksiribonukleoprotein (DNP) tarkibidagi DNK ni dezoksiribozani ochadigan sifat reaksiya orqali topish mumkin. Buning uchun DNP kislota difenilamin reaktivi bilan qizdiriladi. Natijada DNP gidrolizlanib, dezoksiriboza ajraladi va difenil reaktivi bilan koʻk rang hosil qiladi. DNP tarkibidagi oqsil esa biuret reaksiyasi yordamida ochiladi.

Tekshiriluvchi material: buqoq bezi yoki qora taloq toʻqimasi.

Reaktivlar: natriy xloridning 5% li eritmasi, natriy gidroksidning 0,4 va 10% li eritmalari, mis (II) sulfatning 1% li eritmasi, difenilamin reaktivi distillangan suv, shisha kukuni.

Kerakli anjomlar: probirkalar, shtativlar, chinni hovonchalar, voronkalar, shisha tayoqchalar, 100-150 ml li kimyoviy stakan, doka filtrlar, suv hammomi, tarozi, qadoq toshlari. 25 va 100 ml li oʻlchov silindrlar.

Bajariladigan ish tartibi. DNP ni ajratish. Buqoq bezi yoki qora taloqdan 0,5 g olib 100 mg shisha kukun qoʻshiladi va 15 ml 5% li natriy xlorid eritmasidan ohistalik bilan chinni hovonchaga solib ishqalanadi. Bir xil holatga keltirilgan aralashma doka filtdan oʻtkaziladi. Soʻngra stakanga shisha tayoqchasi bilan asta-sekin aralashtirilgan holda 80-90 ml filtdan oʻtkazilgan suyuqlik solinadi. Suvda eritmaydigan DNP choʻkmaga tushadi, uning choʻkma-ipchalari shisha tayoqchaga oʻraladi va toza probirkaga shisha tayoqcha orqali asta oʻtkaziladi.

DNP ipchalari 1-2 ml 0,4% li natriy gidroksid eritmasi bilan eritiladi (DNP ipchalarini toʻliq erishini kuzating).

2. DNK ni aniqlash. 5-10 tomchi DNP eritmasiga ikki marta koʻp hajmda difenilamin reaktivi solinadi va probirka 5-10 daqiqaga qaynab turgan suv hammomiga quyiladi. Eritma sekin-asta koʻk rangga kiradi, chunki difenilamin dezoksiriboza bilan reaksiyaga kirishadi.

3. DNP tarkibidagi oqsilni aniqlash. 5-10 tomchi DNP eritmasiga 10 tomchi 10% li natriy gidroksid eritmasi va 1 tomchi 1% li mis sulfat eritmasi solib biuret reaksiyasi oʻtkaziladi. Koʻkimir-binafsha rang hosil boʻlishi oqsil borligini isbotlaydi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. DNP ajratish usulini, DNP ning tarkibiy qismi va aniqlash reaksiyalari natijasini daftaringizga yozing.

DNK MIQDORINI KALORIMETRIK USULI BILAN ANIQLASH

Usulning asosi. DNK tarkibidagi dezoksiriboza difenilamin bilan koʻk rang hosil qiladi. Rangning zichligi DNK miqdoriga toʻgʻri proporsionalligidan, fotoelektrokolorimetrdan foydalaniladi.

Tekshiriluvchi material: DNK ning suvli eritmasi.

Reaktivlar: difenilamin reaktivi distillangan suv.

Kerakli anjomlar: probirka va shtativlar, 1-2 ml li o'lchov pipetkalari, FEK, 0,5 sm qalinlikdagi kyuvetalar.

Bajariladigan ish tartibi. Bitta tekshiruv va bitta nazorat probirkasi tayyorlanadi. Birinchisiga DNK ning suvli eritmasidan 1 ml, ikkinchisiga 1 ml distillangan suv solinadi. Har ikkala probirkaga 2 ml dan difenilalanin reaktivi solib, 10 daqiqa suv hammomida ushlab turiladi. Bir ozdan so'ng probirkalardagi suyuqliklar sovutiladi va FEK ning qizil nur filtrida nazorat suyuqligi qarshisida ko'riladi. Tekshiriluvchi DNK ning optik zichligini topgach, o'lchov egri chizig'idan uning miqdori aniqlanadi.

O'lchov ergi chizig'ini tayyorlash. 3 ta probirkaga konsentratsiyasi turlicha bo'lgan (50, 100, 200 mkg/ml) DNK eritmasidan 1 ml va difenilamin reaktividan 2 ml solib, 10 daqiqa qaynab turgan suv hammomida qizdiriladi. Eritma sovutilgach yuqoridagidek fotoelektrokolorimetrlanadi. Topilgan optik zichlik va DNK miqdoridan o'lchov egri chizig'i tuziladi. Absissa o'qiga DNK miqdori, ordinata o'qiga optik zichliklar keltiriladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Daftaringizga o'lchov egri chizig'ini chizing. Usulning asosini va topilgan DNK miqdorini daftaringizga yozing.

KOLORIMETRIK USUL BILAN RNK MIQDORINI ANIQLASH

Usulning asosi. RNK tarkibidagi pentoza ortsin reaktivi bilan rangli birikma hosil qiladi. Rangning optik zichligi kolorimetrdagi o'lchanadi va o'lchov egri chizig'idan RNK miqdori topiladi.

Tekshiriluvchi material: RNK ning suvli eritmasi.

Reaktivlar: ortsin reaktivi (tayyorlanishi 509-betda) distillangan suv.

Kerakli anjomlar: probirkalar, shtativlar, pipetkalar, FEK, 0,5 sm qalinlikdagi kyuveta.

Bajariladigan ish tartibi. 1. Tekshiruv tajriba probirkasiga 1 ml RNK eritmasi va 2 ml ortsin reaktivi solinadi. Nazorat probirkasiga esa 1 ml distillangan suv va 2 ml ortsin reaktivi solinadi. Ikkala probirka suv hammomida 20 daqiqa tutib turiladi. Bir ozdan so'ng eritmalar sovutilib, FEK ning qizil nur filtrida nazorat probirkasi qarshisida optik zichlik topiladi. RNK ning miqdori o'lchov egri chizig'idan aniqlanadi.

2. O'lchov egri chizig'ini tayyorlash. 3 ta probirkaga 1 ml dan 50, 100, 200 mkg/ml RNK eritmasi suv hammomida qizdiriladi. 20 daqiqa o'tgach, eritmalar sovutilib, FEK da ularning optik zichligi aniqlanadi. Absissa o'qiga RNK ning miqdori, ordinata o'qiga optik zichlik keltirilib, o'lchov egri chizig'i tuziladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Daftaringizga usulning asosini, o'lchov egri chizig'ini va aniqlangan RNK miqdorini yozing.

FOSFOPROTEIDLAR

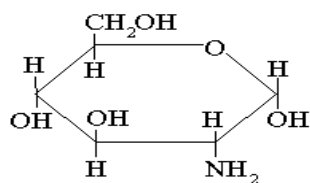
Murakkab oqsillar – fosfoproteidlar tarkibida fosfor kislotasi qoldig'i (0,5-0,9%) mavjud. Ular oqsil molekulasiga serin va treonin aminokislotalarining gidroksil guruhi orqali birikadi.

Fosfoproteidlar vakiliga sut kazieni. Tuxum oqsili – vitelin, baliq tuxumi oqsili – ixtulin va ayrim fermentlar – fosforilaza, fosfoglyukomutaza, pepsin va boshqalar kiradi. Fosfoproteidlar embrion taraqqiyoti va organizm uchun zarur oziqa mahsuloti hisoblanadi. Sut kazieni tarkibida barcha o'rnini almashtirib bo'lmaydigan aminokislotalar va suyak to'qimalarining o'sishi va rivojlanishi uchun zarur bo'lgan fosfor va kalsiy bor, ular to'la sifatli oqsillar qatoriga kiradi.

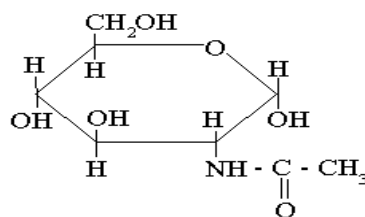
Kazein oqsilini sutdan ajratish va tarkibiy qismlarini aniqlash (2-ishda keltirilgan) bilan siz oqsillarni biologik suyuqliklardan ajratish bo'limida tanishgansiz.

GLIKOPROTEIDLAR

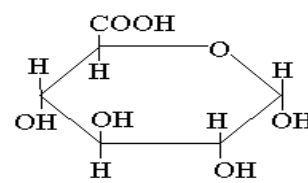
Glikoproteidlar – oqsil va oqsil bo'lmagan neytral va nordon glikozaminglikanlardan tashkil topgan murakkab oqsil hisoblanadi. Karbonsuv tarkibiga geksozalar, geksozaminlar (glyukozamin, galaktozamin, mannozamin), glyukuron, sial kislotalar, sirka, sulfat, neytramin kislotasi va L-fruktozalar kiradi.



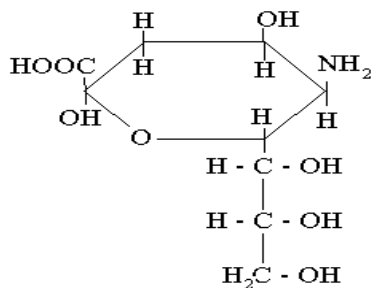
D-glyukozamin



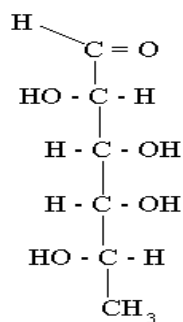
atsetil-N-glyukozamin



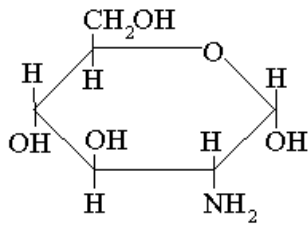
glyukuron kislotasi



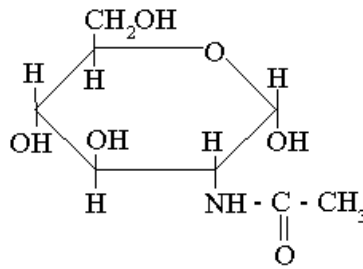
neyramin kislotasi



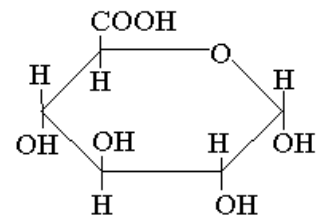
L-fruktoza



D-glyukozamin



atsetil-N-glyukozamin



glyukuron kislota

Glikoproteidlar tarkibida 85-95% gacha uglevodlar bo'lganda ular uglevod xossasini namoyon qiladi va aksincha, 85-95% oqsil bo'lganda oqsil tabiatiga ega bo'ladilar.

Uglevod tabiatli glikoproteidlar glyukozaminglikanlar deyiladi. Shunday nordon glyukozaminglikanlarga gialuron, xondriatinsulfatlar va geparin kiradi. Neytral glikozaminlar tarkibiga neytral shakarlar (galaktoza, mannoza, L-fruktozalar) va sial kislota kiradi.

Gialuron kislota biriktiruvchi to'qima. Ko'z qorachig'i, sariq tana, kindik tizimchasi, yurak klapanlari tarkibiga kiradi. Gialuron kislota glyukuron, atsetil glyukozamin va disaxaridlarning polimeridir. Ularning nisbiy molekulyar massasi milliondan ortiq. Xondriotin sulfat kislota tog'ay va biriktiruvchi to'qimalar, geparin esa jigar va o'pka to'qimalari tarkibiga kiradi.

Neytral glyukozaminglikanlar so'lak, me'da shirasi, bachadon o'simtalari, qon plazmasi, qon guruhini aniqlovchi moddalar, gormonlar, fermentlar (seruloplazmin, transferin, xolinesteraza) tarkibida bo'ladi. Glyukozaminglikanlarni organizm to'qimalaridagi suyuqliklar tarkibida erkin holda uchratish mumkin.

Glikoproteidlar organizmda tayanch - himoya vazifasini bajaradi. Ular hujayralararo va to'qimalararo moddalar tarkibiga kirib qovushtiruvchi ta'sir ko'rsatadi, bo'g'imlarni bog'lovchi vosita hisoblanadi.

SO'LAK TARKIBIDAGI MUTSINNI AJRATISH

Tuxum oqsili va mutsin tarkibidagi uglevodlarni Molish reaksiyasi yordamida aniqlash mumkin.

Tekshiriluvchi material: tuxum oqsilining 10% li eritmasi, so'lak.

Reaktivlar: sirka kislotaning konsentrlangan eritmasi, sulfat kislotaning konsentrlangan eritmasi, timolning 1% li spirtli eritmasi.

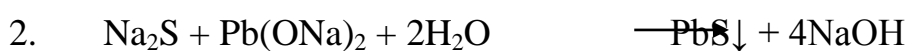
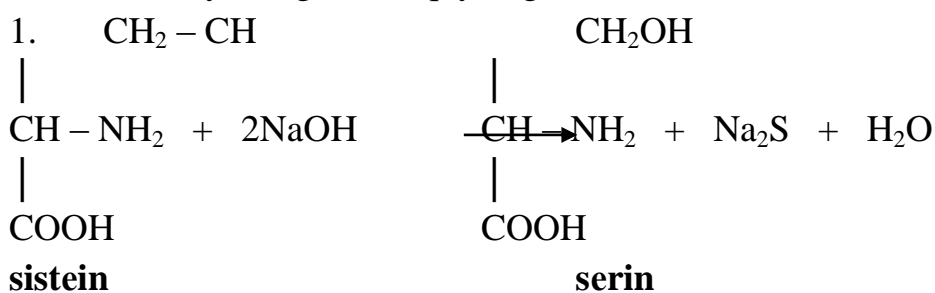
KUCHSIZ BOG‘LANGAN OLTINGUGURT TUTUVCHI AMINOKISLOTALARGA O‘TKAZILADIGAN REAKSIYA FOLI REAKSIYASI

Sistein va sistin aminokislotalarida oltingugurt juda kuchsiz bog‘langan bo‘lib, ularni ishqor yordamida ajratib olish mumkin.

Reaksiyaning asoslanishi. Ishqoriy gidroliz natijasida ajralgan oltingugurt qo‘rg‘oshin bilan birikib, qora rangli qo‘rg‘oshin sulfid tuzini hosil qiladi. Bu tuz eritmada cho‘kma holatda bo‘ladi.

Ushbu reaksiya sistin almashinuvi buzilganda aniqlanadi.

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Qora rangli cho‘kma

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

Reaktivlar: Foli reaktivi.

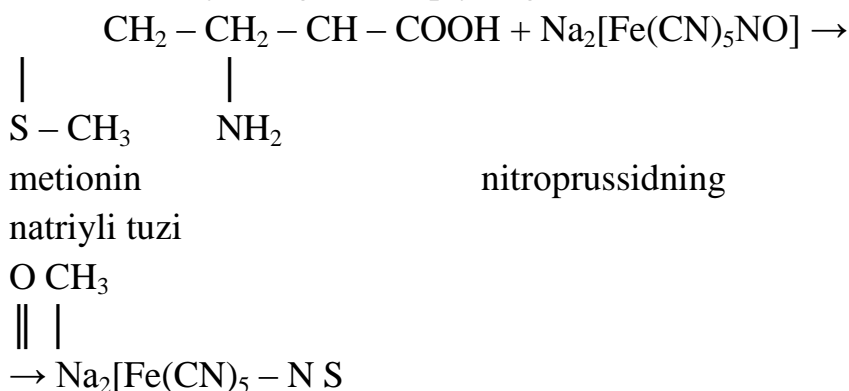
Kerakli anjoslar: probirkalar, pipetkalar, shtativlar va spirt lampasi.

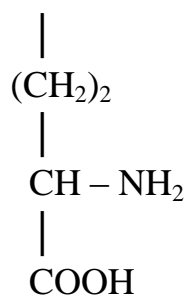
Bajariladigan ish tartibi. 5 tomchi oqsil eritmasiga shuncha miqdorda Foli reaktivi solib qizdiriladi va 1-2 daqiqaga qoldiriladi. Shunda qoramtir qo‘rg‘oshin sulfid cho‘kmasi hosil bo‘ladi.

METIONINGA O‘TKAZILADIGAN NITROPRUSSID REAKSIYASI

Reaksiyaning asoslanishi. Metionin ishqoriy sharoitda natriy nitroprussid bilan qizil rangli kompleks birikma hosil qiladi.

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:





kondensatsiyalangan birikma

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

Reaktivlar: natriy gidroksidning 20% li eritmasi, natriy nitroprussidning 5% li eritmasi.

Kerakli anjomlar: probirkalar, pipetkalar, shtativlar va spirt lampasi.

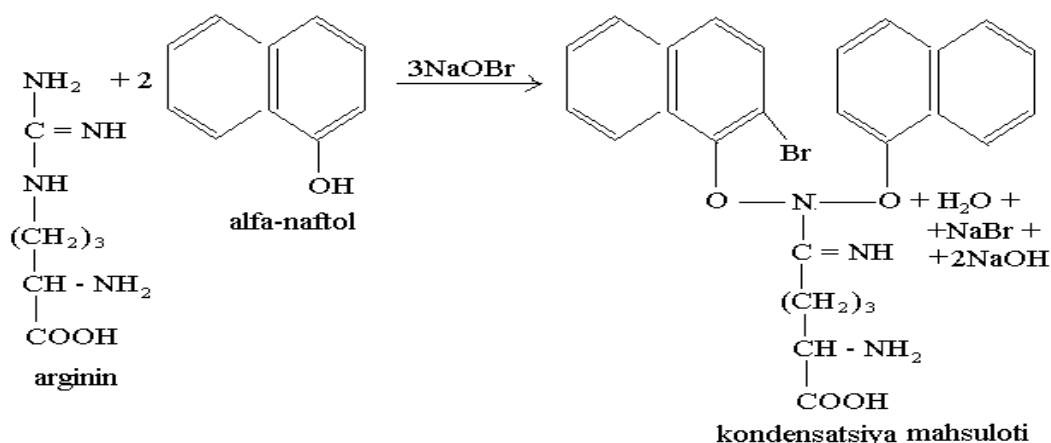
Bajariladgan ish tartibi. 5 tomchi oqsil eritmasiga 4-5 tomchi natriy gidroksidning 20% li eritmasidan solib bir necha daqiqa qizdiriladi. Eritma sovutiladi va unga 2-3 tomchi natriy nitroprussid eritmasi tomiziladi. Suyuqlik qizil tusga kiradi.

Olingan natija 8-jadvalga yoziladi.

ARGININGA O'TKAZILADIGAN SAKAGUTI REAKSIYASI

Reaksiyaning asoslanishi. Argininning guanidin guruhi α -naftol ishtirokida ishqoriy muhitda gipobromid bilan oksidlanib, pushti-qizg'ish rangli kondensatsiyalangan mahsulot hosil qiladi.

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi yoki 0,01% li arginin eritmasi.

Reaktivlar: natriy gidroksidning 10% li eritmasi, α -naftolning 0,2% li spirtli eritmasi, natriy gipobromidning 2% li eritmasi, mochevina eritmasi.

Kerakli anjomlar: Probirkalar, pipetkalar, shtativlar va spirt lampasi.

Bajariladigan ish tartibi. Probirkalarning biriga oqsil eritmasidan 10 tomchi, ikkinchisiga 0,01% li arginin eritmasidan 10 tomchi solib ularning har qaysisiga 10% li natriy gidroksid eritmasidan 10 tomchi va α -naftolning 2% li spirtli eritmasidan solinadi va yaxshilab aralashtiriladi. So'ng ularga natriy gipobromid eritmasidan solinadi. Eritmaga 40% li siydikchil eritmasidan 5 tomchi solinganda pushti-qizg'ish rang hosil bo'lishi tezlashadi. Eritma pushti-qizg'ish tusga kiradi.

Amaliymashg'ulotlar bo'yicha quyidagi mavzular tavsiya etiladi

1. Oqsil molekulasining aminokislota tarkibini aniqlash usullari.
2. Biologik materiallardan oqsil va peptidlarni toza holda ajratib olish usullari.
3. Oqsil va peptidlarning aminokislota ketme ketligini aniqlash usullari.
4. Oqsillarga hos sifat reaksiyalar.
5. Oqsil va peptidlarni tozalik darajasini tahlil qilish yollari.
6. Zamonaviy spektrofotometrik usullar yordamida oqsil va peptidlarni tuzilishini organish usullari.
7. Fermentlar, gormonlar va boshqa biologik faol oqsillarni funksiyalarini shrganish usullari.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR.

Asosiy adabiyotlar

1. C. Branden, J. Tooze. «Introduction to protein Structure», 2-nd edition, Garland Publishing, 1999.
2. Овченников Ю.А. «Биоорганическая химия», М. Просвещение, 1984.
3. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. T.: Tafakkur bo'stoni. 2013.-223b
4. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик -Т.: Таълим, 2009. -528 б.
5. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Т1. Генная и белковая инженерия. –М. Наука, 2004, 525 стр.

6. Igamnazarov R.P., Abdullayeva M.M. «Biokimyodan laboratoriya mashg'ulotlari». -Toshkent. Universitet. 2015

Qo'shimcha adabiyotlar

1. Гидранович Б.И., Гидранович А.Б. «Биохимия» Учебное пособие. Минск. ТетраСистемс. 2014. –с.528.
2. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Д. Молекулярная биология клетки. Изд, Мир., 1986. –с.224
3. Намраев Sh.A va b. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. 1-qism Darslik. T.: Tafakkur bo`stoni. 2014. -224 b.
4. T/ Creighton. «Proteins»? , 2-nd edition: «Structures and molecular properties» Freeman and Company, NY, 1993.
5. G.Karp. «Cell and Molecular biology», 2-nd edition, John Willey @Sons Ins., 1999

Axborot manbaalari

1. www.ziyonet.uz
2. www.bio.ru
3. www.biotex.ru
4. www.promega.com
5. www.molbio.ru
6. www.ziyonet.uz

MUNDARIJA

	KIRISH	3
1	OQSIL MOLEKULASINING AMINOKISLOTA TARKIBINI ANIQLASH USULLARI	4
2	SIKLIK AMINOKISLOTALARGA O‘TKAZILADIGAN KSANTOPROTEIN REAKSIYASI	5
3	OQSIL GIDROLIZATI – AMINOKISLOTALAR ARALASHMASINI XROMATOGRAFIYA USULI BILAN AJRATISH	6
4	OQSILLARGA HOS SIFAT REAKSIYALAR OQSIL MIQDORINI BIURET USULI BILAN ANIQLASH	8
5	OQSIL VA PEPTIDLARNI TOZALIK DARAJASINI TAHLIL QILISH YOLLARI	10
6	ZAMONAVIY SPEKTROFOTOMETRIK USULLAR YORDAMIDA OQSIL VA PEPTIDLARNI TUZILISHINI ORGANISH USULLARI	12
7	FERMENTLAR, GORMONLAR VA BOSHQA BIOLOGIK FAOL OQSILLARNI FUNKSIYALARINI SHRGANISH USULLARI	13
8	FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR.	20