

KARIMOV ABDURASHID MUSAXONOVICH
RAXMATOVA MALOHAT JUMAYEVNA
TURABOYEV ABDULXAMID ABDUVOHID O'G'L

BIOORGANIK KIMYO
FANIDAN LABORATORIYA
MASHG'ULOTLARI
(uslubiy qo'llanma)

2017 йил

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

NAMANGAN DAVLAT UNIVERSITETI

TABIYY FANLAR FAKULTETI

KIMYO KAFEDRASI

KARIMOV ABDURASHID MUSAXONOVICH,
RAHMATOVA MALOHAT JUMAYEVNA,
TURABOYEV ABDULXAMID ABDUVOHID O'G'LII

BIOORGANIK KIMYO
FANIDAN LABORATORIYA
MASHG'ULOTLARI
(uslubiy qo'llanma)

2017-YIL

A.Karimov, M.Rahmatova, A.Turaboyev, Biorganik kimyo fanidan laboratoriya mashg`ulotlari. (uslubiy qo'llanma). Namangan NamDU nashri. 2017-yil. 88-bet

Taqrizchilar: Sh.V.Abdullayev, R.S.Dehqonov

Bioorganik kimyo "Kimyo" bakalavr yo'nalishi bo'yicha asosiy fundamental fanlardan bo'lib, u nazariy olgan bilimni amaliyotda foydalanishga mo'ljallangan. Qo'llanmadan magistrlar, oliy o'quv yurtlari talabalari, qishloq xo'jaligi, tibbiyot kollejlari hamda akademik litsey o'quvchilari foydalanishi mumkin.

Uslubiy qo'llanma NamDU o'quv uslubiy kengashi tomonidan muhokama qilinib qo'llash uchun tavsija qilingan (№ 2 bayonнома, 9-sentyabr 2017 yil).

K I R I S H

Bioorganik kimyo tirk materiyani tashkil etuvchi birikmalarning sifat turkibi, miqdoriy o'lchash va hayotiy jarayonlardagi o'zgarishlar haqidagi fandir. U organik kimyo, fiziologiya va tibbiyat asosida shakllangan.

Biorganik kimyoning sanoat, tibbiyat, qishloq xo'jaligi kabi sohalar uchun amaliy ahamiyati ham katta bo'lib, u ozuqa oqsillari, uncha zarur aminokislotalar, vitaminlar, antibiotiklar, bakterial og'itlar ishlab-chiqarish hamda toza ferment preparatlar olish imkonini beradigan biotexnologiya va uning mikrobiologik sintez kabi tarmoqlaridan keng miqyosda foydalanish bilan bog'liqdir.

Ushbu amaliy mashg'ulotlarning asosiy maqsadi — talabalarda amaliy ishga ijodiy munosabatni shakllantirish, umumiylashtirish, umumiy bioorganik kimyodan olgan ғilimlarini mustahkamlash bo'lib, unga bajarilishi qiyin bo'lmagan va ko'p vaqt sarflanmaydigan tajribalar kiritilgan.

Aksariyat tajribalar biologik materiallar, oziq ovqat mahsulotlari va dori — darmon preparatlari yordamida bajarilishni e'tiborga olgan holda zarur moddalar bilan ishlash varianti tavsiya etildi. Shu nuqtai nazardan, hamda tejamkorlik maqsadida reaktivlar, aralashmalar, eritmalar va oldingi tajribalarda hosil qilingan moddalardan keyingi ishlarda foydalanish ham ko'zda tutiladi.

OQSILLAR. AMINOKISLOTALAR VA PEPTIDLAR.

Tirik organizmlarda biologik sintez yo'li bilan hosil bo'ladigan, tuzilish jihatidan polipeptidlardan iborat yuqori molekulyar eng mukammal va murakkab moddalar oqsillar deyiladi. Ular ko'pgina noyob xususiyatlarga ega: ularda cheksiz tuzilish, xilma — xilligi, molekula ichra o'zaro ta'sir etish va ta'sir javob berish, katalitik funksiyasi, saylab reaksiya kirishishi va hokazo xususiyatlar mavjud. Oqsillar — xayotning moddiy asosidir. Organizm xo'l massasining 20% gacha, quruq massaning esa 50% gacha S, 6,5 — 7,5%, 4,15— 18% N, 21 — 24% O; 0,3-2,4% gacha S: 2% gacha R; 0,5% gacha mineral moddalar bo'ladi. Oqsillar strukturasining monomer birikmalari aminokislotalardir. Tabiatda mavjud bo'lgan 200 dan ziyod aminokislotalarning 20 — 22 tasi oqsillar tarkibida doimo mavjud bo'ladi. Shuning uchun ular protinogen aminokislotalar deyiladi. Ayrim aminokislotalar oqsillar tarkibida mutazam bo'lmasada, uchrab turadi.

Aminokislotalar peptid bog' yordamida o'zaro birikib polipeptid zanjirlar hosil qiladi. Polipeptid zanjirda ko'p sonli (10—1500) aminokislotalar bo'lishi mumkin, tarkibi jihatidan barcha oqsillar polipeptidlari ham hosil bo'lavermaydi. Oqsillar molekulasida peptid, disulfid, vodorod, ionli, tioefir, qutbsiz kovalent bog'lanishlar bo'lib, ular oqsil molekulasining sgrukturasini belgilaydi.

Oqsillarda birlamchi, ikkilamchi, uchlamchi va to'rtlamchi strukturalar bo'ladi.

Birlamchi struktura oqsil molekulasining eng turg'un va yetakchi strukturasini bo'lib, polipeptid zanjirida o'zaro peptid bog'i bilan bog'langan aminokislotalarning ketma — ketlik tartibini ifodalaydi. Zanjirning ikki uchida qanday funksional gruppa o'zgarishsiz qolganiga ko'ra N —uchi (erkin aminogruppa saqlovchi) va S — uchi (erkin ka'boksil gruppa saqlovchi) aminokislotalar bo'ladi. Ikkilamchi struktura — polipeptid zanjirning vodorod bog'lanish ta'sirida yuzaga chiqqan taxlanish (joylanish) tartibidir. Uning vintsimon simmetriyali a — spirali (Poling va Kyuri tavsiya etgan model) va shrama — taxlami B — struktura shakllari bor. Uchlamchi struktura esa polipeptid zanjirning fazoviy holatini ifodalaydi. Ushbu strukturasiga ko'ra globulyar (ellips, oval, sferik shaklli) va fibrillyar (chuzinchoq, ipsimon shaklli)

oqsil turlari buladi. Pigga polipeptid zanjirli oqsillarda faqat uchlamchi struktura bo'ladi (Mioglobin, lizatsim, pepsin, tripsin, keratin va boshqalar). Uchlamchi strukturaga ega bo'lgan bir necha oqsillar (protemer yoki mul'timer) tarkibiga kirishidan to'rtlamchi struktura shakllanadi.

Tabiatdagi mavjud oqsillar nazariy jihatdan mumkin bo'lgan miqdorning juda kam qismini tashkil etadi, xolos.

Masalan, atigi 12 ta aminokislordan turli ketma — ketlikda 288 turdag'i peptid bog'larini va ular hisobiga 10^{300} ta oqsil molekulasini yaratish imkoniyati bor. Agar shu sondagi molekulalardan atigi bittadan yaratilganda ham Yerning biomassasi 10^{280} t bo'lar edi. Vaholanki, hozir uning biomassasi 10^{27} tonnani tashkil etadi. Demak, tabiatda yangi va yangi, xilma —xil oqsillar yaratish imkonni amalda benixoyadir. Oqsillarning tarkibi va tuzilishi turlicha bo'lgani uchun ularning xususiyatlari ham xilma — xildir. Amfoterlik, bufer elektrolit bo'la olish, tuzlanish, gidratlapish, denaturatsiyalanish, rangli reaksiyalar hosil qila olish, ta'sirotga javob berish, qisqaruvchanlik, tashish, regulatorlik, immunologik, katalitik, retseptorlik, qurilish materiali bo'lish, tayanch-mexanik funksiyani bajarish, rezerv va energetik baza bo'lish, kogentik, zararsizlantirish, gemostatik xislatlar shular jumlasidandir.

Oqsillarning nazariy klassifikatsiyasi yo'q. Fizik —ximiya viy klassifikatsiya oqsillarni ularning elektroximiyaviy xususiyatlariiga ko'ra kislotali, ipqoriy va neytral oqsillar gruppalariga ajratadi. Funksional klassifikatsiya oqsillarni amaliy ahamiyatiga ko'ra quyidagi gruppalarga ajratadi:

- 1) katalitik faol oqsillar, 2) gormon — oqsillar, 3) genom aktivligini boshqaruvchi oqsillar, 4) ximoya oqsillari 5) zahar — oqsillar, 6) transport — oqsillar, 7) membran oqsillar, 8) qisqaruvchan oqsillar, 9) retseptor oqsillari, 10) fermentlarning ingibitorlar bo'lувchi oqsillar, 11) viruslar po'stining oqsillari, 12) boshqa vazifalarni bajaruvchi oqsillar.

Tuzilishiga ko'ra oqsillar quyidagicha klassifikatsiyalanadi; oddiy va murakkab oqsillar. Tarkibi aminokislotalarni polipeptid zanjiridan iborat bo'lgan oddiy oqsillarga albuminlar, globulinlar, gistonlar, prolaminlar, glyutelinlar, protaminlar va skleron roteinlar mansubdir. Murakkab oqsillar ikki komponentli

bo'lib, polipeptid zanjirga birikkan qo'shimcha gruppaga saqlaydi. Ularni metalloproteinlar, glikoproteinlar, lipoproteinlar, xromoproteinlar va fosfoproteinlar kabi gruppalar mavjud.

Oqsillar va aminokislotalarni ajratib olish va ularning eritmasini tayyorlash. Oqsillar tirik materiyaning vakillaripi eng muqim qurilish vakili bo'lgani uchun ularni istalgan biologik ob'ektdan ajratib olish mumkin. Buning uchun to'qimalar maydalanishi, hujayra po'sti yorilishi, oqsil bo'limgan komponentlardan tozalanishi kerak. Suvda yaxshi eriydigap yoki suyultirilgan tuz eritmalarida eriy oladigan oqsillarni o'rghanish qulaydir.

1-TAJRIBA (A).

Tuxum oqsili eritmasini tayyorlash.

I. Ishning maqsadi: Tuxum albumini ajratib olish.

II. Kerakli jihoz va reaktivlar.

Bir yoki bir necha tovuq tuxumi, distillangan suv, NaCl 10% li eritmasi va fil'trat.

A) Ishning borishi: Bir dona tovuq tuxumi olib sarig'i ajratiladi. Tuxum oqiga 10-15 hajm distillangan suv qo'shib yahshilab aralashtiriladi va 2 qavat xo'l doka yoki yuvilgan suv lattadan o'tkaziladi. Fil'trat tuxum albumini suyultirilgan eritmasidan iborat. Suvda erimaydigai globulinlar esa fil'tr yuzasida qoladi.

B) Tovuq tuxumining bir donasini olib, uning sarig'i ajratiladi. Tuxum oqiga NaCl ning 10% li eritmasidai 10—12 hajm qo'shiladi va aralashtiriladi. Bunda albumin va globulinlardan iborat suyultirilgan oqsil eritmasi hosil bo'ladi.

C) Bir necha dona tovuq tuxumining oqi sarig'idan yaxshilab ajratiladi. Bunda olingan tuxum oqi suyultirilgan oqsil sifatida keyingi tajribalarda ishlataladi. I ta tuxumda odatda 30 —35 gr oqi va 18 — 25 gr sarig'i bo'lishini hisobga olish mumkin. 3 dona tuxumdan taxminan 100 ml suyultirilmagan oqsil olish mumkin. Ushbu oqsil eritmasida 88% suv, 1% uglevodlar va 0,5% mineral moddalar bo'lishi ko'zda tutilsa, suyultirilgan oqsil eritmasi tarkibida amalda 10% oqsil bo'ladi. Uning

6% ga yaqini albuminlardir. Suyultirilgan oqsil eritmasidagi albuminlarning kontsentratsiyasi 0,5% ga yaqin bo'ladi.

Aminokislotalarga xos reaksiyalar.

Oqsillarning tarkibiga kiruvchi a-aminokislolar uchun ximiyaviy reaksiyalar mayjud. Bunday reaksiyalar mohiyatga ko'ra umumiy yoki xususiy bo'lish mumkin. Oqsillar tarkibida doimiy uchraydigan 20 dan ziyoda aminokislolar amfoter elektrolitlar bo'lib, tuzilishga ko'ra asiklik (ochiq, zanjirli) va xalqali radikalar saqlovchi gruppalarga bo'linadi. Aminokislotalarning aksariyat reaksiyalar shunday radikalidagi ximiyaviy o'zgarishlar hisobiga sodir bo'ladi. Bunday reaksiyalar ancha izchil va juda spetsifik bo'lib ko'pipcha aminokislotalarni sifat va miqdor jihatdan aniqlashda foydalaniлади.

1- jadval

Nº	Reaksiyaning nomi	Ishlatilgan reaktivlar	Kuzatilgan rang	Ochilgan birikma	Izoh

1-TAJRIBA (B).

I. Oqsillarni tabiiy manbalar (sut, tuxum, qon zardobi) dan ajratib olish

Tuxum albumininini tuz bilan cho'ktirish orqali ajratib olish

Ishning umumiy izoshi. Tuxum oqsilidan bosqichma-bosqich tuz bilan cho'ktirish orqali (oldindan 50%-li to'yintirilishidan tushgan cho'kmani olib tashlab), shamda dializ yo'li bilan albumin qismi ajratiladi.

Jihozlar va reaktivlar. 100 ml o'lchagich silindr, stakan, sentrifuga (vakuum-filtrlagich qurilmasi), SF-26, ammoniy sulfat, bir dona tovuq tuxumi, dializ membranası, dializ uchun kamera (2 l).

Ishning borishi. Tuxum oqsili sarig'idan ajratiladi va o'lchagich silindrga solinadi, so'ngra uning xajmi suv bilan 50 ml gacha etkaziladi va 15,65 g ammoniy sulfat qo'shiladi (asta-sekin aralashtirilib). Xamma tuz bo'laklari erigandan so'ng yarim to'yingan tuz eritmasidan tushgan globulinlar cho'kmasi sentrifuga qilinib (3-5

ming ayl/min.) yoki qalın filtr qog'oz orqali filtrlab ajratiladi. Fil'trat (ustidagi suyuklik) o'lchagich silindrga yig'iladi, xajmi o'lchanib, tuz erishi qulay bo'lishi uchun stakanga o'tkaziladi va eritmada ammoniy sulfat tuzining to'yinish darajasi 70% gacha etkaziladi. Tuzning miqdori quyidagi formula yordamida xisoblanadi:

$$X = \frac{0,515 \cdot V(C_2 - C_1)}{1 - (0,272 - C_2)}$$

bu yerda: X – berilgan to'yinish darajasi uchun olingan tuzning miqdori, grammda; V – oqsil eritmasining xajmi, ml da;

S_1 – tuzning dastlabki to'yinish darajasi (o'nli bo'laklarda 100% = 1,00)

S_2 – berilgan to'yinish darajasi.

Kerakli miqdordagi ammoniy sulfat erigandan so'ng loyqalangan aralashma cho'kma hosil qilish uchun 30-40 min qoldiriladi (tindiriladi). Ovalbumin cho'kmasi globulinlar kabi yig'ib olinadi. Cho'kma (agarda filtrlash ishlatilgan bo'lsa – filtr qogoz cho'kma bilan birga sholda) oz shajmdagi suvda suspenziyalanib, dializ qopchasiga solinadi va tuzni chiqarib yuborish uchun dializ qilinadi. Buning uchun dializ qopchasi iliq suv bilan sho'llanib bir uchi bog'lanadi va voronka yordamida oqsil eritmasi bilan to'ldiriladi. Dializ 4 marta 20 mmol^b pH 7,4 bo'lgan natriy fosfat bufer eritmasida, xar galgi almashish 1 soatdan kam bo'ligan sholda olib boriladi.

Dializning dastlabki 2 soatini suv bilan olib borish mumkin. Dializatdagi ovalbuminning kontsentratsiyasi 260 va 280 nm da yutilishi bo'yichi aniqlanib, nonogrammaga asosan (47 b.) bitta tuxumdagি oqsil miqdori shisoblanadi.

2 – TAJRIBA (A).

Sut oqsili- kazeinni ajratish.

I. Ishdan maqsad: murakkab oqsil fosfoproteid vakili bo'lgan kazeinni ajratish.

Tekshiriluvchi material: sut.

II. Reaktivlar: xlorid kislotaning 1% li eritmasi, distillangan suv, natriy gidrosidning 10% li eritmasi, nitrat kislotaning kontsentrlangan eritmasi, molibden reaktivi, mis(II) — sulfatning 1% li eritmasi.

III. Kerakli anjomlar: 50 ml sig`imli kimyoviy stakan, 50 ml sig`imli silindrler, shisha tayoqcha, voronka, fil`tr qog`ozlari.

Sut tarkibida albumin, globulin va murakkab oqsil —fosfoproteidlar vakili bo`lgan kazein bor. Kazein sug oqsillarining 80% ini tashkil qiladi. Kazein nordon xossaga ega bo`lib, uning izoelektrik nuqtasi pH=6.7 atrofida. Kazein kalsiy tuzlari bilan birikkan bo`lib, erigan holatda bo`ladi. Sut achiganda yoki u nordonlashtirilganda akazein ipir—ipir cho`kmaga tushadi.

1. 50 ml sig`imli kimyoviy stakanga 3 ml sut va 7 ml distillangan suv solinadi. Suyuqliklar aralashtirilib, ustiga 10—15 tomchi 1% li HCl eritmasi solinadi. Kislotada juda ehtiyojkorlik bilan tomchilab solinadi, chunki xlorid kislotaning ortiqcha miqdori kazein cho`kmasini eritib yuboradi. 3 — 5 daqiqa o`tgandan so`ng ipir—ipir cho`kma hosil bo`ladi.

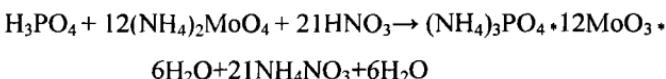
2. Xlorid kislotadan xoli bo`lish uchun stakanga 10 ml distillangan suv solib 5 daqiqa qoldiriladi. So`ngra cho`kma ustidagi suyuqlik osoyishtalik bilan olib tashlanadi. Cho`kmaga - yana bir marta distillangan suv solib, xlorid kislotaning ortiqcha qismi olib tashlanadi. Probirkadagi suyuqlik asta — sekin aralashtiriladi va 5 daqiqa o`tgach aralashma filtr qog`ozdan o`tkaziladi.

3. Kazein tarkibida fosfor borligiga ishonch hosil qilish uchun kazein ishqoriy muhitda parchalanadi. Gidrolizat tarkibidagi fosfor molibden reaktiv yordamida aniqlanadi. Buning uchun filtrdagagi cho`kma qaytar muzlatgichni keng probirkaga olinadi va unga 6 ml 10 % li natriy gidroksid eritmasi solinadi. Probirka qum hammomida bir soat davomida qizdiriladi. Suyuqlik sovitilgandan so`ng kontsentrlangan nitrat kislotada bilan laksus bo`yicha kuchsiz nordon muhitgacha neytrallanadi. Neytrallash jarayonida oqsillarning chala parchalangan yuqori molekulali mahsuloti cho`kmaga tushadi.

4) eritma tindirilgandan so`ng filtrlanadi. So`ngra suyuqlikdan olib oqsilga xos Biuret va fosfor kislotaga xos molibden reaksiyasi o`tkaziladi.

A) 5 tomchi gidrolizatga 1—2 tomchi natriy gidroksidning 10% li eritmasidan va 2 tomchi Anis(II) sulfat tuzining 1% li eritmasidan solinadi. Hosil bo`lgan binafsha rang oqsil borligini isbotlaydi.

B) 10 tomchi molibden reaktiv, 5 tomchi gidrolizat solib bir necha daqqaq qaynatiladi. eritma och sariq rangga bo'yaladi. Aralashma sovitlgach sariq rangli kompleks birikma cho'kmaga tushadi. Bu fosfor kislota borligini isbotlaydi. Ushbu reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Olingen natijalarni rasmiylashtirish. Kazein oqsilining ajratilishining qisqacha shartini, gidrolizat bilan o'tkazilgan rangli reaksiyalarning asoslanishi va uning natijasini daftaringizga yozing.

2 – TAJRIBA (B).

Sigir sutidan kazeinni ajratish

Ishning umumiylizoxi. Sutning pH-ini kazeinning izoelektrik nuqtasigacha (4,5-4,7) etkazib kazein cho'ktiriladi va organik erituvchilar bilan yog'sizlantiriladi.

Jihozlar va reaktivlar. 0,5 l o'lchagich stakan, sentrifuga (vakuum-filtrlagich qurilmasi), pH-metr, suvsiz sirka kislotosi, etil spirti (100 ml), efir (100 ml), pH 8,5 ga teng bo'lgan 500 mol natriy karbonat bufer eritmasi, sut (300 ml).

Ishning borishi. Bu uslub oqsillarning o'z izoelektrik nuqtasidagi eruvchanligining juda kam bo'lishiga asoslangan. Oqsillar kontsentrlangan eritmalaridan o'z izoelektrik nuqtalarida cho'kmaga tushadilar. 300 ml sutni aralashtirib turilgan sholda 0,5 M CH₃COOH qo'shilib (tomchilab) achitiladi. Bunda mushit pH-metr yordamida tekshirib turiladi, pH 4,5 gacha etkaziladi va achitilgan sut cho'kmaga shosil qilishligi uchun 1 soat (xolodil'nikda) qoldiriladi. pH ning 4,5 dan kamaymasligiga xarakat qilish kerak, chunki pH ko'rsatkichi kislotaliroq bo'lsa kazein erib ketadi. Kazein cho'kmasi sentrifugalanib yoki filtrlanib ajratiladi.

Kazein cho'kmasiga teng shajmda spirt qo'shilib aralashtiriladi va spirt filtralanib (sentrifugalanib) ajratiladi. Ushbu jarayon yana bir martaba qaytariladi.

Spirt bilan suvsizlantirilgan kazein cho'kmasini yog'ini ajratish uchun uch martaba 50 ml dan efir bilan ishlanadi. Tamoman yog'sizlantirilgan kazein shavoda quritiladi va pH 8,5 ga teng bo'lgan 100-150 ml 50 mmol' natriy karbonat eritmasida

eritiladi. Kazein eritmasi sentrifugalash yoki filtrash bilan tindiriladi. eritma tiliq bo'lishi kerak. Kazein yuqorida yozilganidek tindirish uchun ikkinchi marotaba cho'ktiriladi. +ayta cho'ktirilgan kazein filtr qog'ozlari orasida sigiladi va quritiladi, iloji boricha quritish oldidan ishlovni yuqorida aytilganidek spirt va efir bilan qaytarish kerak. +uritilgan kazein tortiladi va unumi tajribaga olingan sut miqdoriga nisbatan aniqlanadi.

3-TAJRIBA.

Qon zardobidan albuminni ajratish.

Ishning umumiy izoxi. Hayvon (odam) qoni zardobidan 50% darajada tuz bilan to'yintirish yo'li bilan globulinlar (al'fa, beta, gamma) cho'ktiriladi, so'ngra cho'kma ustidagi suyuqlikdan tuz bilan to'yintirish darajasini 70 % ga yetkazib turib, zardob albumini cho'ktiriladi va dializ yo'li bilan tuzsizlantiriladi.

Jihozlar va reaktivlar. 50 ml o'lchagich silindr, 50 ml li stakan, sentrifuga (vakuum-filtrlagich qurilmasi), SF-26, 10 ml qon zardobi, ammoniy sulfat, dializ membranasi, hajmi 1 l bo'lgan dializ uchun kamera.

Ishning borishi. Hayvon yoki odam qoni zardobini tuz bilan to'yintirilganda tuzning kontsentratsiyasi asta-sekin oshirilishga qarab quyidagi fraksiyalar (qismlar) cho'kishi mumkin:

To'yintirish darjasи, %	Cho'kmaga tushayotgan fraktsiya	Cho'kmadagi oqsil miqdori (umumiy oqsilga nisbatan), %	Eslatma
34	γ -globulinlar	20	
40	α , β , γ -globulinlar	15	
50	α , β -globulinlar, α -mukoproteinlar	14	
62	zarbor albumini	32	kristall xolda
68	albumin, gemokuperin, glikoproteinlar va boshqalar	14	

Qon zardobi albuminini globulinlar yig`indisini ammoniy sulfat tuzi bilan 50 % gacha to`yintirilib oldindan cho`ktirilgandan so`ng ajratiladi. Buning uchun 10 ml qon zardobiga 3,13 g tuz qo'shiladi va globulinlar cho`kmasi filtrlanib yoki sentrifugalanib olib tashlanadi, filtrat (cho`kma ustidagi suyuqlik) yig`ib olinadi. Globulinlar cho`kmasi qayta cho`ktirilib fraktsiyalash uchun foydalaniladi. Zardob filtrati globulinlar olib tashlangandan so`ng o'lchagich silindrga solinib xajmi o'lchanadi va 60 % gacha to`yintirish uchun quruq tuz qo'shiladi. Ma'lum kontsentratsiyagacha kerak bo'lgan tuzning miqdori quyidagi formula bilan aniqlanadi:

$$X = \frac{0,515 \times V \times (C_2 - C_1)}{1 - (0,272 \times C_2)} ;$$

Bu erda:

X – tuzning miqdori, g da; V – eritma xajmi, ml da;

C_1 – boshlangich to`yintirish
darajasi (o'nli bo'laklarda darajasi.
100% = 1,00);

Kerakli miqdordagi tuz erigandan so`ng, suspensiya 30-45 minutgacha cho`kma shosil qilishlik uchun qoldiriladi. Al'bumin cho`kmasi globulinga o'xshab yig`iladi. Cho`kma (agarda filtrlangan bo'lsa – cho`kma filtri bilan) oz miqdordagi suvda eritiladi va suvda dializlanadi (3 marotaba, suvning xajmi 1 l, shar bir navbatni 1-2 soatdan). Dializatdagagi albumin kontsentratsiyasi aniqlanadi, unumi yutilish bo'yicha (280 nm) nomogrammaga asosan topiladi.

4 – TAJRIBA:

Oqsillarni qizdirishga munosabati.

- I. Ishning maqsadi: oqsillarni issiqlik ta'sirida cho`ktirish.
- II. Tekshiriluvchi material: tuxum oqsili.
- III. Reaktivlar: Sirka kislotaning 1% va 10% li eritmasi, natriy gidroksidniig 10% li eritmasi.

Ishning borishi beshta probirkaning har qaysisiga tuxum oqsilining suyultirilgan probirkadagi eritma qaynagupcha qizdiriladi. Oqsilniig termik denaturatsiyasiga sodir bo'ladi va eritma loyqalanadi. Ikkinci probirkani bir tomchi sırka kislota eritmasi qo'shib qizdirilganda oqsilning cho'kishi kuzatiladi. Chunki kuchsiz kislotali muhit albumnning izoelektrik nuqtasi mavjud sharoit bo'lib, oqsillar cho'kishini tezlashtiradi. Uchinchi probirkaga sırka kislotaning 10% li eritmasidan 3 – 4 tomchi qo'shib qizdiriladi. Aralashma qaynab ketsa ham oqsilning cho'kishi kuzatilmaydi. Chunki kuchliroq kislotali muhitda oqsilning musbat zaryadi ortadi va uning cho'kishiga to'sqinlik qiladi. To'rtinchi probirkaga sırka kislotaniig 10% li eritmasidan 3 – 4 tomchi va osh tuzining to'yingan eritmasidan shuncha miqdor qo'shib qizdirilgan cho'kma hosil bo'ladi.

Qizdirilganda cho'kma hosil bo'ladi. Natriy xlorid oqsil zarrachalariniig sirtida qo'sh elektr qavat hosil bolishga va musbat zaryadli oqsil zarrachalarning neytrallanishiga sabab bo'ladi. Oqibatda oqsil zarrachalaridan tarkib topgan kolloid sistemasining turg'unligi o'zgaradi. Beshinchi probirkaga o'yuvchi natriyning 10% li eritmasidan 3 — 4 tomchi qo'shib qizdiriladi. eritma qaynagan vaziyatda ham cho'kma hosil bo'lmaydi. Chunki ishqoriy muhitda oqsil zarrachasi yuzasidagi manfiy zaryad va eritmaning turg'unligi ortadi.

5-TAJRIBA.

Immunoglobulinlarni qon zardobidan ajratish.

Ishning umumiylizoshi. Hayvon (odam) qoni zardobidan 50% to'yinish darajasida ammoniy sulfat bilan cho'ktirish yo'li orqali immunoglobulinlar qismi cho'ktiriladi, ortiqcha tuzni chiqarib yuborish uchun dializ qilinadi va imkoniyat bo'lsa liofillab quritiladi.

Jihozlar va reaktivlar. 50 ml stakanlar – 2 dona, sentrifuga (vakuum-filtrlagich qurilmasi), SF-26, ammoniy sulfat, 10 ml qon zardobi, dializ membranasi, shajmi 1 l bo'lgan dializ uchun kamera.

Ishning borishi. SHayvon va odam qon zardobining immunoglobulinlari oqsillarning geterogen sinfdan iboratdir (IgA , IgM , IgD , IgE , IgG). Ular antitelalar

shisoblanadi – «antigen»lar – organizmda begona molekulalar paydo bo`lganida unga qarshi ishlab chiqariladigan moddalardir.

Antitela o`ziga mos kelgan o`ta moyillik bilan sezib, «uni» bog`lab oladi va antigenni neytrallashga, shamda yo`qotishga moslaydi.

+on zardobi immunoglobulinlarining asosiy massasi IgG dan iborat bo`lib, cho`kmaga 33-50 % darajada ammoniy sulfat tuzi bilan to`yintirilganda tushadi. 10 ml qon zardobiga aralashtirilib turib, asta-sekin 3,13 g ammoniy sulfat tuzi qo`shiladi. Aralashma cho`kma shosil qilishligi uchun 30-40 min qoldiriladi. Globulinlar cho`kmasida 15 minut davomida 3-5 ming ayl/min. sentrifugalanib yoki filtralanib ajratiladi, zardobning dastlabki shajmidagi suv bilan eritiladi va 2 marotaba 1 l suvda (1-2 soatdan), 1 marotaba pH 7,4 bo`lgan 10 mmol' natriy fosfat buferida (1 soat) dializlanadi.

Fraktsiyalarning tozalik darajasini oshirish maqsadida qaytadan cho`ktirish odatdagidek olib boriladi. So`ngida ammoniy sulfat bilan cho`ktirilgan va buferda dializlangan cho`kma imkoniyat bo`lsa liofillangan sholda quritiladi.

Eritmani 260 va 280 nm dagi optik zichligi o`lchanadi va IgG ning kontsentratsiyasi shamda miqdori aniqlanadi. Globulinlar cho`kmasi ajratib olingandan so`ng cho`kma ustidagi suyuqlik yoki filtrat yig`ib olinadi va albumin ajratish uchun ishlatiladi.

Agarda immunoglobulinni elektroforetik marker sifatida ajratish vazifasi ko`yilsa, u sholda, globulinlarning dializlangan fraktsiyasi (50 %-li to`yintirish bilan cho`ktirilgan) 33-34 %-li to`yintirish bilan cho`ktiriladi (2-jadval, 46 b.ga qarang) va dializlash jarayoni yuqorida bayon etilganidek qaytariladi.

6-TAJRIBA.

Ovalbuminning gomogenligini, molekulyar massasini va koagulyatsiyalanish temperaturasini aniqlash.

Ishning umumiy izoxi. Tuxum albumin (ovalbumin) namunasini (OV) ionlangan detergent (natriy dodetsilsulfat DDS-Na) bilan Lemmli disk bufer sistemasi ishtiroyida yoki pH 8,0 bo`lgan 0,1 M natriy-fosfat buferini ishlatib marker oqsillarining elektroforetik yo`nalishiga nisbatan molekulyar massasi (Mr)

aniqlanadi. Koagulyatsiyalanish temperaturasiga mochevinaning (8 M) va DDS-Na (2%) ning ta'siri aniqlanadi.

Jihozlar va reaktivlar. To'rtta naychali elektroforez asbobi, probirka (4 dona) koagulyatsiyalanish temperaturasini aniqlash uchun bir tomoni kavsharlangan shisha naycha ($d = 0,3\text{-}0,4$ sm, $N = 10$ sm), glitserin yoki sulfat kislota, termostat bilan joshozlangan suv shammomi, ovalbumin, odam qoni zardobi albumini (O+ZA), karboangidraza (KA), RNK-aza (RA), lizotsim (L). DDS-Na, mochevina, sirka kislotasi, metanol (40 ml), izo-propanol (50 ml), TXU (25 g), kumassi R-250 ning izo-propanol:sirka kislota: suv = 12:10:78 dagi 0,1%-li eritmasi yoki qoraamid 10 V ning yuqoridagi aralashmadagi 0,5% -li eritmasi.

Ishning borishi. Bu qo'llanmada PAAGda elektroforez usulini osaborning bir xil tarkibli bufer sistemasini qo'llash keltirilgan. Kerak bo'lган hollarda bir xil tarkibli bo'lмаган aralashma (disk-PAAGE) qo'llanilsa, uning borishini Maurer G., (Disk-elektroforez, 1971 y, 95-4-95 b.) kitobidan topish mumkin.

To'rta bir xil shisha naychaga ($d = 0,5$ sm, $N = 10\text{-}12$ sm) monomer aralashmasi quyilmasdan avval, 12%-li aerilamid ($S = 3,3\%$, $T = 12\%$), oxirgi kontsentratsiyasini 0,1 M, pH 8,0 bo'lган natriy fosfat buferi, DDS-Na (0,1% gacha) va polimerlanish initsiatorlari TEMED – aralashmaning shar bir ml-ga 2-4 mkl, 10 mkl 5%-li ammoniy persulfat solinib, monomer aralashmasi bilan to'ldiriladi. Monomer aralashmani qo'pik shosil shildirilmasdan aralashtiriladi. elektroforez naychalarini tagidan polietilen yoki rezina plenka bilan berkitiladi va monomer aralashmasi solinadi. Xamma naychalar bir xil shajmda bo'l shiga erishish kerak (naycha tepasida 0,5-1,0 sm bo'sh joy qoldiriladi), monomer aralashmasi ustiga kolonkaning yuqori qismi tekis bo'l shiga uchun asta-sekin tajminan 0,1 ml suv quyiladi. Polimerlanish xona temperaturasida 20-30 min ichida tugaydi, buni gel' bilan suv oralig'idagi keskin chegara shosil bo'l shidan aniqlash mumkin. PAAG solingan naycha tagidagi plenka olib tashlangandan so'ng, yuqoridagi rezervuarga mashkamlanib, pH 8,0 bo'lган 0,1 M natriy fosfat buferi shamda 0,1%-li DDS-Na quyiladi. Marker oqsili namunasi va OV 5 mg/ml kontsentratsiyada quyidagi

tarkibdagi bufer eritmada eritiladi: 0,1 M gacha Na-fosfat buferi, 2,3%-gacha DDS-Na, 7% gacha glitserin, 0,01% gacha reper bo'yog'i – bromfenol ko'ki.

Marker oqsillining eritmasi yaxshi dissotsiyalanishi uchun 1 minut davomida qaynab turgan suv shammomida isitiladi. SHar bir nechaga 10-20 mkl dan oqsil eritmasi solinadi va platinali elektrodlar yordamida asbob o'zgarmas tok manbaiga ulanadi. elektroforez maromi shar bir naychaga 2 mA, shammasi $2 \times 4 = 8$ mA, yoki gelning 1 sm balandligiga 8 V kuchlanishda 2-3 soat davomida boradi. Shundan so'ng, reper bo'yog'i naychadagi PAAG ning oxiriga etish bilan tok uziladi, gel' meditsina shpritsi yordamida naychadan olinadi va oqsillar 25% TXU; 40%-li metanolda, 10% sirkal kislotasi tutgan aralashmada 30 min davomida cho'ktiriladi. Gellarni bo'yash kumassi eritmasida yoki -oraamidda uo' haroratida 2 soat, davomida (yoki 60 °S da 30 minut) olib boriladi, aralashmadagi ortiqcha bo'yokni izo-propanol:sirkal kislotasi:suv bilan (rangio'chguncha bir necha marotaba) yuviladi. Oqsillarning joylashishi ko'k (binafsha-ko'k) bo'lib chiqadi. elektroforegrammalar ish jurnalga chiziladi, shar bir oqsilining siljimi mm da o'lchanadi, natijasi jadvalga yoziladi:

Oqsil	M	IgM	Siljishi, mm-da	R _f

Oqsil siljishi reper bo'yog'igi nisbatan yoki R_f qo'proq bo'lgan oqsilga solishtirib aniqlanadi. Jadvaldag'i ma'lumotlarga qarab IgM ning R_f ga bog'liqligi grafigi tuziladi va OV ning mg aniqladi.

Elektroforez ketayotgan paytda OV ning termokoagulyatsiya T°-sinani aniqlashga kirishiladi. Buning uchun 3 ta eritma tayyorlanadi (.5mg/ml = 0,5%). Birinchi – suvda yoki fiziologik eritmada, ikkinchi eritma – 2%-li DDS-Na da, uchinchi 8 M mochevinada va tagi kavsharlangan naychaga 0,5 ml dan oqsil eritmasi solib quyilish darajasi aniqlanadi, loyqalanish boshlanishi harorati va zinch qavat shosil bo'lishi harorati belgilanadi.

7-TAJRIBA.

Qon zardobi albuminini (immunoglobulin, ovalbuminini)

DEAE-sellyulozada ionalmashini xromatografiyasi bilan tozalash

Ishning umumiy izoshi. Odam qoni zardobi albuminining (OZA) va tuxum albuminining (TA) tozalanmagan namunasi pH 7 bo'lgan 20 mmol' natriy fosfat buferida DEAE-sellyuloza anionalmashgichda ion almashish xromatografiyasiga qo'yiladi. Al'buminlar kolonkada 0,05; 0,1; 0,3 va 0,6 M NaCl bilan bosqichma-bosqich elyuatsiya qilinib, so'ngra dializ qilinadi va liofillab kuritiladi.

Jihozlar va reaktivlar. Kolonka (2×20 sm), polietilen yoki rezinadan yasalgan $d = 0,1\text{-}0,2$ sm, uzunligi 1-2 m bo'lgan birlashtiruvchi naychalar, DEAE-sellyuloza (sefadeks)-20-40 ml bo'ktirilgan gel', pH 7,4 bo'lgan natriy fosfat buferi, SF-26, 300 ml tagi yassi kolbalar – 4 dona, 1 l kolba – 1 dona, dializ trubkalari, OZA – 200 mg, OV – 200 mg.

Ishning borishi. Kolonka yuviladi va regeneratsiya (qayta tozalangan) qilib o'z sholatiga keltirilgan anion almashgich ishslash uchun tayyorlangan bufer bilan birga to'ldiriladi (namlash usuli bilan, gel'da pufakchalar shosil bo'lishidan xoli sholda) va tutashtiruvchi naychalar yordamida 100 mg oqsil /10 ml gel' shisobida oqsil eritmasi solinadi, kolonkani 5 barobar shajmdagi 20 mmol' natriy fosfat buferi bilan yuviladi. Gel' bilan bog'langan oqsillar ketma-ket 0,05; 0,1; 0,3 va 0,6 M NaCl tutuvchi buferda elyuatsiya qilinadi. elyuatsiya shar bir bufer bilan elyuatning spektrofotometrdagi A_{280} qiymati nolga teng kelguncha olib boriladi. 0,05 M NaCl dagi elyuat tashlab yuboriladi, 0,1; 0,3 va 0,6 M NaCl dagi elyuatlar dializlanib tarkibini ifodalash uchun foydalananiladi. OZA va TA asosan 0,3 M NaCl bilan elyuatsiya qilinadi va 2 marta 1-2 davomida 20 mmol' natriy-fosfatli buferga qarshi va 1 marta suvg'a qarshi dializlanadi. Dializatlar liofillab quritiladi va oqsilni xarakterlash uchun ishlatiladi.

Eslatma. Xromatografik kolonka tayyorlash uchun ko'rgazma: Ion - almashinish, affin va gel, filtratsion xromatografiya uchun standart kolonkalar yo'q bolsa, laboratoriyada tayyorlangan shisha kolonkalardan foydalunish mumkin. Kerakli o'lchamdagagi kolonkaga tagidan birlashtiruvchi naycha ulanib inaytunin 1/4

shajmda ishchi bufer quyiladi va naycha berkitiladi. Kolonkaning voronkali quy qismiga qaynatilgan paxta filtr, uning tepasidan unga mos keladigan filtr qog'oz qo'yiladi va shunday qilib shosil qilingan filtr vaqtincha shisha tayoqcha bilan ushlab turiladi, uncha quyuq bo'limgan gel' suspenziyasini asta sekin qo'zgatib yubormasdan kolonkaga quyiladi. 15-30 minutdan so'ng gel' filtrga cho'kkandan keyin shisha tayoqcha olinadi va kolonkaning pastki naycha qismi ochiladi. Agarda kolonkadagi gelning miqdori kam bo'lsa, suspenziya gel' cho'kishi bilan yana qo'shiladi. Kolonkaning yuqori qismiga (elyuant quyish uchun) probka yordamida rezina yoki polietilen naycha ulanadi. Ish jarayonida gel' ustunining qurib qolishiga yo'l qo'yish mumkin emas.

8 – TAJRIBA (A).

Kazeinning izoelektrik nuqtasini aniqlash.

Tekshiriluvchi material: natriy atsetatning 0,4% li eritmasi, kazeinning 0,2 mol/l li eritmasi.

I. Reaktivlar: sirka kislotaning 0,2 mol/l li eritmasi, distillangan suv.

II. Kerakli anjomlar: probirkalar, shtativlar, o'lchovli pipetkalar, makrobyuretkalar.

Bajariladigan ish tartibi:

Eritma muhitining ma'lum darajasida oqsil molekulasining «+» va zaryadlarining tenglashib «0» ga teng bo'lishi izoelektrik nuqta holatiga aytildi. Bunday holatda zarrachasi elektr maydonida xarakatlana olmaydi, Uning turg'unligi yo'qoladi va u'cho'kmaga oson tushadi. Oqsilning izoelektrik nuqtasini qnilash oqsil eritmasining muayyan pH muhitda loyixalanishi eslashishiga bog'liq. Turli muhitli bufer eritmasini tayyorlash uchun 6 ta quruq probirkaga jadvalda ko'rsatilgan miqdorda tartib bilan eritma qilinadi.

2 Jadval.

Probirkarning raqami	Eritmalarning tarkibi, ml			Aralashmagan pH muhiti	Xiralashishi durusisi
	CH ₃ COOH 0,2 mol/l	H ₂ O	Kazeinning natriy atsetatdagi 0,4% li eritmasi		
1	0,6	0,4	0,2	3,8	
2	0,8	1,2	0,2	4,1	
3	0,4	1,6	0,2	4,4	
4	0,2	1,8	0,2	4,7	
5	0,1	1,9	~0,2	5,0	
6	0,06	1,94	0,2	5,3	

Eritmalar yaxshilab aralashtiriladi. 5—10 daqiqa o'tgach eritmalarning aralashishi kuzatiladi. Kazeinning izoelektrik nuqtasiga to'gri pH qiymatida cho'kma yaqqol ko'rindisi. Olingan natijalarni quyidagi jadvalga muvofiq to'ldiring.

3 — jadval.

I	3,8	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3

Xiralashmagan eritma «—» xiralashgan eritma «+», juda xiralashgan eritma bir nechta «+» ishorasi bilan belgilanadi. Olingan natijalar yuzasidan tegishli xulosalar chiqaring va daftarchangizga yozing.

8 – TAJRIBA (B).

Kazeinning izoelektrik nuqtasini, gomogenligini va molekuliyar massini aniqlash

Ishning umumiy izoxi. elektroforez usuli bilan poliakrilamid gelida (PAAG), DDS-Na ishtirokida gomogenlik va rI aniqlanadi, kazeinning pH ga nisbatan eruvchanligini o'zgarishni kuzatib rI aniqlanadi (eruvchanlik eng kichik bo'lgandagi pH ko'rsatkichi).

Jihozlar va reaktivlar. elektroforez asbobi, probirkalar – 6 dona, shar xil pH-dagi atsetat bufer yigmasi (NaCOOCH₃, CH₃COOH), 2 mg/ml kazeinning fiziologik eritmadagi (6 ml) eritmasi, marker oqsili (OZA (SACH)-68000, KA-30000, OV-43000, RA-13700). 40%-li akrilamid-bisakrilamid eritmasi, pH 8,0 bo'lgan 0,2 M natriy fosfat, 10%-li DDS-Na, 0,1%-li kumassi R-250 yoki 2-propanol:

$\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O} = 12:10:78$ aralashmasidagi 0,5%-li qoraamid 10V, 25% TXU, metanol: $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O} = 40:10:50 - 100 \text{ ml}$.

Ishning borishi. elektroforez asbobining 4 ta shisha naychasi tagidan polietilen yoki rezinka plenkasi bilan berkitilib, vertikal sholatda o'rnatiladi va naychaning 1/5 shajmi bo'sh qolguncha polimerlashtirilgan initsiator solingan (quyishdan oldin qo'shiladi) monomer aralashmasi quyiladi.

Aralashma tarkibi: 40% monomer aralashmasi – 12-%gacha ($C = 3,3\%$, $T = 12\%$)*. pH 8,0 bo'lган 0,2 M natriy fosfat – 0,1 M gacha. 10%-li DDS-Na - 0,1% gacha TEMED – bir ml gel' uchun 2 mkl-gacha. 5% PSA (ammoniy persulfat) - shar bir ml gel' uchun 10 mkl-gacha (to'ldirishdan oldin).

4 ta naychaning shammasiga bir xil shajmda aralashma quyiladi va tekis gel' qavatini shosil qilish uchun tepasidan asta-sekin 0,1-0,2 ml suv qatlami shosil shilinadi. Polimerlanish tugagandan so'ng (gel' bilan suv o'rtasida aniq chegara shosil bo'lganligi aniqlanadi). PAAG solingan naychaning tagidagi plenka olinib, yuqoridagi rezervuarga mashkamlanadi, Rezervuar pH 8,0 bo'lган 0,1 M natriy fosfat, 0,1%-li DDS-Na elektrolit eritmasi bilan to'ldiriladi. Marker oqsilining namunalari shar bir naychaga 20 mkg-dan (20 mkg oqsil eritmasining 1 mg/ml 0,1 M fosfat buferi, 2,3%-gacha DDS-Na, 7% glitserin, 0,01% bromfenol ko'ki) solinadi, shu buferning o'zida kazein (5 mg/ml) shar bir naychaga 10- mkg dan solinadi.

Asbob platina elektrodlari yordamida o'zgarmas tok manbaiga ulanadi. elektroforez tokning kuchi shar naychaga 2 mA (shammasi 2 mA) yoki 8 v/sm (taxminan 100 v) da 2 soat davomida reper bo'yog'i (bromfenol ko'ki) naychaning tagiga etguncha olib boriladi. elektroforez tugagach tok o'chiriladi, gel' naychadan meditsina shritsi yordamida suvni gel' bilan naycha ichki devori oralig'iga yuborish orqali ajratib olinadi. Geldagi oqsillar aloshida-aloshida probirkalarda 30 min davomida 25% TXU; 30 min davomida 10% sirka kislotasi tutgan 40%-li metanolda fiksatsiyalanadi va shundan so'ng kumassi yoki amid qorasi eritmasida (uy haroratida 2-4 soat, 60 °S da 30-40 min) bo'yaladi. Ortiqcha bo'yoqni yuvish ko'p marotaba izo-propanol:sirka kislotasi:suv aralashmasini bilan olib boriladi. Oqsillarning geldagi

joylashishi (turgan joyi) ko'k (binafsha-ko'k) yo'l sholatda, shar bir oqsil oralig'ining (yurgan masofasining) uzunligi gel' chegarasidan (mm da) o'lchanadi, natijasi 4-jadvalga yoziladi:

Oqsil	M	IgM	Oqsilning yurgan masofasi, mm	R _f

Oqsil yurgan masofasi (R_f) rener bo'yog'ining masofasiga nisbatan yoki oqsilning yuqoriga surilishi bilan (bu sholda RA) aniqlanadi. Jadvaldagagi ma'lumotlar bo'yicha IgM ni R_f ga nisbatan grafigi chiziladi va kazein komponentlarining M aniqladi.

Elektroforez qo'yilgandan so'ng kazeinning pI ni aniqlashga kirishladi. Buning uchun 6 ta robirkaga 1 ml dan fiziologik eritmadiagi kazeinning 2 mg/ml kontsentratsiyali eritmasi qo'yiladi va shar bir probirkaga 1 ml dan atsetat buferi (shar xil pH 3,5 dan 6 gacha) qo'shiladi. Probirkadagi aralashma aralashtiriladi va 30 minut sovuqxonada qoldiriladi. SHundan so'ng natija kuzatiladi. Barqaror cho'kma shosil qilgan pH ga teng bo'lgan probirka belgilanadi.

*T – geldagi akrilamid va bisakrilamidning umumiy kontsentratsiyasi, S – bisakrilamidning aralashmadagi nisbiy miqdori.

9 – TAJRIBA.

Oqsillarni og'ir metall tuzlari ta'sirida cho'ktirish.

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: mis(II) sulfat tuzining 1% li eritmasi, qo'rgoshin atsetat tuzining 5—10% li eritmasi.

II. Kerakli anjomlar: probirka va shtativlar, shisha tayoqchalar, tomizgichlar.

Bajariladigan ish tartibi:

Oz miqdordagi og'ir metall tuzlari ta'sirida oqsillar cho'kmaga tushadi. Rux, mis, kumush, simob va boshqa og'ir metallar bilan o'zaro ta'sirlashgan oqsil ularni adsorbtsiyalaydi va ular bilan tuzsimon kompleks birikma tuzlarini hosil qiladi. Bu tuzlarning ortiqcha miqdori hosil bo'lgan cho'kmani oqsil zarrachasida musbat

zaryad hosil bo`lgani uchun eritib yuboradi. Ammo bu cho`kma suvda erimaydi. Og`ir metall tuzlari bilan zaxarlangan bemorlarni davolashda oqsilning og`ir metall tuzlari bilan suvda erimaydigan kompleks birkmalarini hosil qilish xususiyatidan foydalaniladi. Zaxarlangan bemorga ko`p miqdorda oqsil beriladi va hosil bo`lgan kompleks birikma parchalanib surilishga ulgurmasdan tezda organizmdan chiqariladi.

1) oqsillarni mis sulfat bilan cho`ktirish 5 tomchi tuxum oqsili eritmasiga oxistalik bilan 1—2 tomchi mis sulfatning 1% li eritmasi solinadi. Bunda och xavo rang cho`kma hosil bo`ladi, cho`kma suvda erimaydi. Boshqa probirkaga yuqoridaqidek reaktiv solinadi, hosil bo`lgan cho`kma ustiga yana 5- 10 tomchi mis sulfat eritmasi solinadi. Ortiqcha miqdordagi eritma cho`kmani eritib yuboradi.

2) Oqsillarni qo`rg`oshin atsetat bilan cho`ktirish 5 tomchi oqsil eritmasiga 2 tomchi 5% li qo`rg`oshin atsetat eritmasi solinadi. Hosil bo`lgan cho`kma suvda erimaydi. Ammo ortiqcha miqdordagi cho`ktiruvchi eritmada oson eriydi.

10 – TAJRIBA.

Oqsillarni kontsentrlangan mineral kislotalar ta`sirida cho`ktirish.

Tekshiruvchi material: oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: kontsentrlangan nitrat va sulfat kislota.

II. Kerakli anjomlar: probirkali shtativlar va pipetkalar.

Bajariladigan ish tartibi. Oqsillar konsentrlangan mineral kislotalar ta`sirida qaytmas denaturatsiya holatiga o`tadi. Oqsilting cho`kmaga tushishi oqsil zarrachalariniq suv qobig`i yemirilishi bilan bog`liq. Barcha kislotalarning ortiqcha miqdori cho`kmani eritadi. Ortofosfat kislota oqsilni cho`kmaga tushirmaydi. Oqsillarni nitrat kislota bilan cho`kmaga tushirilishi tibbiyotda keng qo`llaniladi.

1. Nitrat kislota bilan oqsillarni cho`ktirish. 5 tomchi kontsentrlangan nitrat kislotaliga probirkani 45° burchakka og`dirgan holda 5 tomchi oqsil eritmasi ohistalik bilan tomiziladi. Suyuqliklar bir – biri bilan aralashmasligi kerak. Ikkala suyuqlik chegarasida ingichka oq xalqa oqsil aralashmasi hosil bo`ladi. So`ngra suyuqliklar aralashtirilib, yana ortiqcha miqdordagi nitrat kislota qo`shiladi. Cho`kmaning erimesligi kuzatiladi.

2. Oqsillarni sulfat kislota bilan cho'ktirish. Sulfat kislota bilan cho'ktirish ham nitrat kislota bilan cho'ktirish kabi o'tkaziladi. 5 tomchi kontsentrlangan sulfat kislotata ohistalik bilan probirka devori bo'ylab oqsil eritmasi quyiladi. Bunda cho'kma hosil bo'ladi. O'nta ortiqcha miqdorda sulfat kislota qo'shilganda cho'kma erib ketadi. Olingen natijani 2 —jadvalga muvofiq rasmiylashtiring.

11 – TAJRIBA.

Oqsillarni organik kislotalar bilan cho'ktirish.

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: sul'fosalitsil kislotaning 10% li eritmasi, trixlorsirka kislotaning 10% li eritmasi.

II. Kerakli anjomlar: probirkalar, shtativlar, tomizgichlar.

Bajariladigan ish tartibi. Organik kislotalar ham oqsillarni cho'ktirib emas denaturatsiya holatini yuzaga keltiradi. Uchxlorsirka kislota va sulfosalitsil kislotalar oqsilga sezgir bo'lganligi sababli amaliyatda keng qo'llaniladi. Sulfosalitsil kislota siyidik tarkibida kam miqdordagi oqsilni aniqlash imkonini beradi. Shuningdek bu kislota yordamida boshqa biologik suyuqliklar ekssudatlar tarkibidagi oqsillar aniqlanishi mumkin. Bu kislotaning sezgirligi 1:50000 dir. Sulfosalitsil kislota oqsillardan tashqari uning parchalanish mahsulotlar —yuqori molekuliyar pepton va - polipeptidlarnii ham cho'kmaga tushira oladi. Uchxlorsirka kislota esa faqat oqsillarni cho'kmaga tushirib ularni parchalanish mahsulotlarini cho'kmaga tushira olmaydi. Shuning uchun bu kislota ham oqsillarini quiyi molekulalni muddalardan ajratishda ishlatiladi. Oqsilsiz azot qoldiqlarini uchxlorsirka kislota yordamida amiqlashda oqsil azoti va oqsilsiz azotni alohida aniqlash mumkin. Oqsillar cho'kmaga tushirilgach fil'tratni qaynatish yo'li bilan xlorsirka kislotadan holi bo'linadi. Bunda uchxlorsirka kislota xloroform karbonat angidritga parchalanadi.

1. Sulfosalitsil kislota ta'sirida cho'ktirish. 5 tomchi oqsil eritmasiga 2 tomchi 20% li sulfosalitsil kislota eritmasi solinadi. Oqsil cho'kmaga tushadi.

2. Uchxlorsirka kislota ta'sirida cho'ktirish 5 tomchi oqsil eritmasiga xlorsirka kislota eritmasi solinadi. Oqsil cho'kmaga tushadi. Olingan natijalarni jadvalga yozing.

5 —jadval.

Oqsilni cho'ktiruvchi modda	Reaktivlar	Cho'kmanning xossasi va rangi	Reaksiyaning asoslanishi va xususiyatlari

12 – TAJRIBA.

Oqsillarni natriy xlorid va natriy sulfat tuzlari ta'sirida.

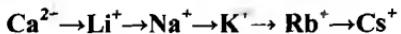
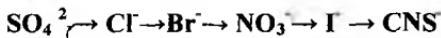
Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: natriy xloridning mayda kukuni, ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi va mayda kukuni, sirka kislotaning 1% li eritmasi, natriy gidroksidning 10% li eritmasi, mis sulfatning 1% li eritmasi.

II. Kerakli anjomlar: probirkalar, shtativlar, pipetkalar.

Ishning bajarilish tartibi.

Oqsillarni yuqori kontsentratsiyali neytral tuzlar —natriy xlorid, ammoniy sulfat ta'sirida cho'ktirish tuzlash deyiladi. Tuzlash reaksiyasini natijasida oqsil makromolekulasingin suv qobig'i emiriladi va zaryadi neytrallanadi. Turli xil oqsillarning cho'ktirish uchun turli miqdordagi tuz talab qilinadi. Globulinlar yuqori molekulyar og'irlikka ega bo'lgani uchun albuminlarga nisbatan oson tuzlanadi. Ular ammoniy sulfatning yarim to'yintirilgan eritmalarida, albuminlar esa to'yingan eritmalarini ta'sirida cho'kmaga tushadi. Natriy xlorid ammoniy sulfatga nisbatan oqsillarni cho'kmaga sustroq tushiradi, chunki uning suv qobig'ini erish xususiyatlari kamroq. Bu xususiy Gofmeystr qatoridagi ionlarning joylashishiga bog'liq.



Oqsillarii neytral tuz eritmalarini ta'sirida cho'kmaga tushishi qaytar jarayon bo'sib, oqsil cho'kmasi suvda qayta eriy oladi, ya'ni fizik —ximiyaviy xususiyatlarini

saqlab qoladi. Shu tufayli tuzlash usuli oqsillarning kristal holatida ajratib olish uchun qo'llaniladi.

1. Oqsillarni natriy xlorid tuzi bilan cho'ktirish—tuzlash. Probirkaga 20 tomchi oqsil eritmasi solinadi. Unga natriy xlorid kukunidan eritma to'yinguncha, ya'ni qo'shilgan tuz eriguncha qo'yiladi. Bir necha daqiqa o'tgach globulinlar cho'kmasi hosil bo'ladi. Probirkadagi aralashma fil'trdan o'tkaziladi. Bunda albuminlar fil'tr tagidagi suyuqlikka o'tadi. Ular hatto natriy xlorid bilan to'yintirilganda ham nitrat eritmalarcho'kmaga tushmaydi. Albumin tutuvchi eritmaga bir tomchi sirka kislotaning 1% li eritmasidan solib qaynatilganda kuchsiz kislotali muhitda albuminlar cho'kmaga tushadi. Bir necha daqiqa o'tgach ushbu eritma filtrdan o'tkaziladi. Filtratda oqsil qolmaganligini isbotlash uchun Biuret reaksiyasi o'tkaziladi. Reaksiyaning manfiyligi oqsil yo'qligini ko'rsatadi.

2. Oqsillarni ammoniy sulfat bilan tuzlash. 20 tomchi oqsil eritmasiga 20 tomchi to'yingan ammoniy sulfat eritmasi solib aralashgiriladi. Yarim to'yingan ammoniy sulfat eritmasi hosil bo'lishidan globulinlar cho'kmaga tushadi. 5 daqiqa o'tgach probirkadagi eritma filtrdan o'tkaziladi. Fil'tratga albuminlar o'tadi. Unga ammoniy sulfat kukunidan ya'ni tuzning yangi qo'shimchasi eriguncha solinadi. Albumin cho'kmaga tushadi. Albumin fil'trdan o'tkaziladi. Filtratda oqsil qolmaganligini isbotlash uchun biuret reaksiyasi o'tkaziladi. Olingan natijalarni quyidagi 6 – jadvalga asosan rasmiylashtiramiz. Musbat natijani «+», manfiy natijani «—» ishorasi bilan belgilaymiz.

6-jadval.

Ishlatiladigan oqsil eritmasi va oqsil fraktsiyalarning nomi	Natriy xloridning to'yingan eritmasida cho'kadigan oqsillar	Natriy xlorid bilan tuzlashdan so'ng kuchsiz kislotali muxitda cho'kadigan oqsillarning nomi	Yarim to'yintirilgan ammoniy sulfat eritmasida cho'kmaga tushgan oqsillarning nomi	Ammoniy sulfatning to'yingan eritmasida cho'kmaga tushadigan oqsillarning nomi
	/			

Bajariladigan ish yuzasidan xulosa.

3. Tuzlangan oqsil eritmalaridan tuz va oqsillarni tozalash, ajratish. usuli bilan cho`ktirilgan oqsillar odatda tuzlardan gel'—fil'tratsiya dializ usuli yordamida tozalanadi. Bu usullar yordamida tuzlar va oqsillarning turli xil molekula ajralish xossasiga ega ekanligi aniqlanadi.

Masala.1 DELE ion almashinishi xromatografiya usuli bilan pepsinni tozalash.

Reaktivlar: Gemoglobin, cho`chqa pepsini, DELE selluloza, NaCl 4 molyarli eritmasi.

pH— 5.2 li 4 molyarli atsetat bufer.

Bajariladigan ish tartibi:

1. Gemoglobin parchalanishidan pensinni proteolitik aktivligini aniqlash.

Gemoglobin eritmasini tayyorlash: 50 ml li stakandan 500 ml gramm gemoglobin va puxta aralashtirilgan holda oz miqdorlar bilan 25 mllitr 0.06 N HCl qo'shiladi. ertmani burmali filtrdan o'tkaziladi va probirkalarga 1 ml litrdan quyib chiqiladi.

Aktivlikni aniqlash. 1 mllitr eritmali probirkalarini 3 — 5 daqiqa davomida 37°C da termostatlanadi. Vaxtoy sekundometr orqali aniq belgilab xar bir probirkaga ma'lum kontsentratsiyali pepsin eritmasidan 0,1 ml litrdan quyib chiqiladi.

10 minutdan so`ng fermentativ reaksiyani 5 mllitr 5% li trixlor sirka kislotasidai qo'shib to`xtatiladi. Hosil bo`lgan cho`kmani zich fil'tr orqali o'tkaziladi va filtratlar optik zichligini 280 nanometrda aniqla姜adi.

Nazorat tajribada gemoglobin eritmasini 1 ml litrga 37°C dagi inkubatsiyasi 10 daqiqadan so`ng 50 mllitr 5% li trixlor sirka kislota qo'shiladi, 5 daqiqadan so`ng 0,1 ml pepsin eritmasi qo'shilaQdi, so`ng filtrlanadi va optik zichligini hisoblanadi.

Har bir tekshirilayotgan oqsil eritmasi uchun 2 ta narallel suyuqlikni aniqlash o'tkaziladi va o'rtacha qiymat olinadi. Quyidagicha formula bilan aniqlanadi.

$$a = A - A_k / A_{280} V$$

bu erda A —filtrating optik zichligi A_k — nazorat eritmani optik zichligi, A_{280} — gemoglobinga qo'yilgan ferment eritmasining optik zichligi, V — ferment eritmasini mlda ko'rsatilgan xajmi.

2. DEAE sellyulozani tayyorlash.

20 gr DEAE sellyulozani 1 l distillangan suvda 1—2 daqiqa davomida suspenziyalanadi. O'lchamli tsilipdrga olinadi, suspenziya 30 daqiqa davomida cho'ktiriladi va cho'kmadan zarrachalarni to'kib tashlanadi. By jarayonni 3 — 4 marotaba qaytariladi. Smolami NaOH 1% li 200 ml erinmasida suspenziyalanadi. Vyuxner voronkasida filtrlanadi va suv bilan neytral muhit bo'lguncha yuviladi. 0,5 moyarli NaCl, 0,1 molyarli pH 5,2 li atsetat bufer bilan, yuvilayotgan H₂O larda Cl ionlari yo'qolib ketguncha yuviladi. DEAE sellyulozani kolonkaga o'tkaziladi va ishlovni oldingidek qaytariladi.

3. Xromotografiya.

Pepsin sanoat preparatini 50 mg ni pH = 5,2 li 0,1 molyar atsetatli buferda eritiladi, va pipetka bilan kolonkaga 10 ml soat tezlik bilan qo'yiladi. Oqsilni barchasipi qo'yib bo'lgandan so'ng kolonkani bufer bilan yuviladi va oqsilni 0,1 molyarli pH = 5,2 li atsetat buferida NaCl eritmasi 0—1 mili gradient bilan elyurlanadi. elyuatlarda oqsilni miqdori aniqlanadi, bunda 280 nm da optik zichligini o'lchanadi va grafik tuziladi, grafikda elyuat hajmi absissalar o'qida yotadi, ordinatalar o'qida oqsilni javob beradigan chuqqilarda, pepsin aktivligini aniqlanadi. Bunda substrat sifatida gemoglobin qo'llaniladi.

Oqsilni tozalik darajasini % da boshlang'ich pereparat va tozalangan ferment aktivliklari nisbatlari kabi olinadi. Oqsil unumi % larda tozalangan va boshlang'ich oqsil yig'indi aktivliklari foizli nisbatlari kabi olinadi.

13 – TAJRIBA.

Dializ usuli bilan oqsillarni ajratish va tozalash.

Tekshiriluvchi material: tuxum oqsilining 3% li eritmasi.

I. Ishdan maqsad: oqsil eritmalarini qo'sh molekulali moddalardan, tuzlashdun keyingi ortiqcha tuz miqdoridan holi qilish.

II. Reaktivlar: ammoniy sulfat tuzining to'yingan eritmasi, bariy xloridning 5% li eritmasi, mis sulfatning 1% li eritmasi, natriy gidroksidning 10% li eritmasi.

3. Kerakli anjomlar: 100ml sig'imli stakan, 150X150 mm li sellofan, uhm tayoqchalar va rezina bog'log'ichlar.

Bajariladigan ish tartibi:

1—2 ml tuxum albumini erigmasiga bir tomchi to'yingan ammoniy sulfat eritmasidan solinadi. Xo'llangan sellofandan xaltacha yasaladi va unga probirkadagi suyuqlik solinadi.

Xaltachaning ipi ikkita shisha tayoqcha orag'iga olinadi va bu tayoqchalar rezina xalqalar bilan qisiladi. Xaltacha distillangan suv solingan stakanga tushiriladi. Xaltachadan suyuqlik satxi stakandagi suv sathidan pastroqda bo'lishi kerak. Bir soatdan so'ng stakandagi suvdan olinib quyidagi reaksiya o'tkaziladi.

A) Sulfat ioniga sifat reaksiya. 1 ml suvgaga 3-4 ml tomchi bariy xloridning 5% li eritmasi solinadi. eritmaning oq rangda xiralashishi bariy sulfatning cho'kmaga tushganini ko'rsatadi.

B) Oqsil borligini isbotlash uchun biuret reaksiyasi o'tkaziladi.

C) xaltacha ichidagi suyuqlik probirkaga olinadi na oqsilga oid sifat reaksiya — biuret reaksiyasi o'tkaziladi.

6. Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Dializ usulining asoslanishini, dializator rasmini va olingan natijalarni daftaringizga yozing va tegishli xulosa chiqaring.

14-TAJRIBA.

Oqsil gidrolizati—aminokislolar aralashmasini xromatografiya usuli bilan ajratish.

Gidrolizat tarkibidagi aminokislolar aralashmasini ajratish va ayrim aminokislolararning sifat va miqdorini aniqlash qog'ozda qaziladigan taqsimlovchi xromatografiya usuli keng qo'llaniladi. Bu usul M.S.Svetning 1903 yilda taklif qilgan xromatografiya analizining o'zgartirilgan ko'rinishidir.

Aminokislolarни ajratish ularni ikkiga aralashmaydigan eritmada erish xususiyatini aniqlash orqali amalga oshiriladi. Hozirgi paytda xromatografiya usulining quyidagi xillari mavjud: adsorbsion usul aminokislolarning turli adsorbentlarda adsorbsiyalanishiga bog'liq; ion almashtiruvchi xromatografiya usuli aminokislolarning zaryadiga qarab ionit yoki anionitlardan foydalanadi. Afin

xromatografiya - xususiy bog'lanish bog'lanish holatiga ega bo'lган fermentlar, immunoglobulinlar, retseptor va gormonlardan foydalanib tegishli birikmalar ajratiladi.

Aminokislolar aralashmasini qog'oz xromatografiya usuli bilan ajratish.

Ushbu maxsus tayyorlangan xromatografiya - filtr qog'ozida o'tkaziladi.

Namlangan kameraga joylashtirilgan xromatografiya qogozi 20 — 22% suvni ushlab qolish xususiyagiga ega. Demak, suv xarakterlanmaydigan faza, chunki, u qog'ozga shamilgan, xarakatlanuvchi faza sifatila organik erituvchilardan foydalaniladi.

Ularga suv bilan to'yintirilgan izopropil, izobutil, qog'ozida bir tomchi aminokislota butil spirlari, fenol va boshqalar kiradi. Xromotografiya qog'ozida bir tomchi aminokislota eritmasidan tomiziladi, qog'ozning ikkinchi uchi tegishli organik erituvchiga tushiriladi. erituvchi qog'oz bo'lakchasidagi xarakatlanish tezligi uning eruvchanligiga bog'liq. Aminokislota suvda qancha yaxshi erisa, organik erituvchida shuncha yomon eriydi va organik erituvchiga nisbatan xarakatlanish tezligi sust bo'ladi. Shu yo'l bilan aminokislolar turli masofada taqsimlanadi.

Aminokislolarini xromatografii qog'ozida xarakatlanishiga qarab, yuqoriga pastga va doira bo'ylab xarakatlanuviga xromatografiya turlari tafovut qilinadi.

Aminokislolarining xromatografiya qog'ozida taqsimlanish masofalarida *a* — aminokislolar uchun o'tkaziladigan ningidrin reaksiyasi yordamida aniqlanadi. Aralashmadagi muayyan aminokisloti aniqlash uchun xromatografiya qog'oziga guvoh aminokislolar tomiziladi va shu aminokislolarining masofasiga ko'ra tegishli aminokislota aniqlanadi. Shuningdek, tegishli aminokislota taqsimlanish koeffitsienti *Rf* ko'ra aniqlanishi mumkin.

$Rf=a/b$ Bunda *a* — aminokislolarining tomizilgan joydan o'tgan masofasi, *b* — eritmaning o'tgan masofasi. Masofalar mm da o'chanadi.

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

Tekshiriluvchi material: gidrolizlangan aminokislota aralashmasi.

Reaktivlar: torozining 0,4% li eritmasi, glutamin kislotaning 0,6% li eritmasi, leysinning 0,5% li eritmasi, ningidrinning atsetondagi 0,2% li eritmasi va yuqoridagi

aminokislolar aralashmasi, erituvchi sistemalari 15:15:10 nisbatda olingan butil sperti, sirka kislota va suv aralashmasi.

Kerakli anjomlar: xromatografiya fil'tr qog'oz, Petri kosachasi, xromatogrammalarini qilish uchun moslama, purkagich, 105°C li qurichtich shkaf, naychi, skalpellar, shisha tomizgichlar, qalin nina.

Bajariladigan ish tartibi:

1. Xromatografiya filtr qogozidan 11x11 sm li to'rtburchaklar yasaladi. To'rtburchak oddiy qora qalam bilam to'rt qismga bo'linadi. Chiziqlar kesishgan nuqtadan radiusi 10 mm bo'lган aylana chiziladi. To'rtburchak tomonlari tartib raqamlari bilan belgilanadi. Shundan so'ng xromatografiya qog'ozni Petri kosachasiga o'rnatiladi. Uning chetlari Petri kosachasini ustida bo'lishi kerak.

2. Har qaysi bo'linmagan ingichka tomizgich yordamida sinaladigan aminokislota va ularning aralashmasi ehtiyyotkorlik bilan tomiziladi. Erituvchilarining shimalishi uchun xromatografiya qog'ozining o'rtasidagi teshikchaga fil'tr ustunchasi o'rnatiladi. Xromatografiya kamerasiga shu teshikcha orqali qalin nina bilan 10—15 ml erituvchi solinadi. Idishning tubi erituvchi bilan to'ldirilgan bo'lishi kerak. Kamera ko'pik berkitiladi. Filtr ustuncha orqali erituvchi sekin asta xromatografiya qog'ozining yuqorisiga qarab yo'naladi. erituvchi xromatogramma chegarasiga yaqinlashganda jarayon tugatiladi, erituvchi etgan chegara qalam bilan belgilanadi. Shundan keyin xromachogramma maxsus moslamaga joylashtirilib, 100—120°C li quritgich shkafda quritiladi, shunda ajralgan aminokislolar qog'ozga o'rashadi. Quritish jarayoni 5—10 daqiqa, ya ni erituvchining xidi atrofga tarqalguncha davom etadi. Quritilgan xromatogramma aminokislolarini aniqlash uchun ningidrin eritmasi purkaladi va ya ni quritiladi. Natijada aminokislolar qutnashgan joyda dog' hosil bo'ladi.

3. Har qaysi aminokislotaning "Rf" si topiladi va sinama aminokislota bilan uhalashmadagi aminokislota solishtiriladi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish: Xromatografiya usulining asoslanishi, ~~rumi~~ bunda olingan natijalarni daftarga yozib tegishli xulosa chiqaring.

15 – TAJRIBA.

O'simliklarning yashil barglaridagi kraxmalni aniqlash.

Kerakli asbob va reaktivlar: probirka, 1,2,5 ml li pipetka, gaz gorelkasi yoki spirt lampa, etil spirt, yolning 1% li eritmasi, o'simlik bargi.

Kraxmal faqat yashil barglarda aniqlanishi mumkin, sarg'aygan barglarda xlorofill bo'limganligi sababli kraxmal sintezlanmaydi.

Ishning bajarilishi. 2 ta probirka olib, ularning biriga o'simlikning yashil bargi, ikkinchisiga sarg'aygan bargi solinadi. Har ikkala probirkaga 1-2 ml distillangan suv qo'yib, 2-3 minut qaynatiladi. So'ngra issiq suv to'kib tashlanadi va uning o'rniغا 1 ml etil spirt qo'yiladi. Probirkalar qaynab turgan suv hammomiga 3-5 minut qo'yiladi va har minutda chayqatib turiladi. Yashil bargdagi xlorofil va sariq bargdagi ksantofill spirtga o'tadi barg esa rangsizlanadi. Spirtli ekstrakt alohida idishga qo'yiladi. Rangsizlangan bargli probirkaga esa yana 1 ml dan spirt qo'yib, 3-5 minut suv hammomida qizdiriladi. Spirt yuqoridagi idishga to'kilib rangsiz barg bir necha marta distillangan suv bilan yusiladi. Shundan keyin har bir probirkaga 3-4 ml dan distillangan suv qo'yib, barg to'qimasini yumshatish uchun qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi. 5-10 minutdan keyin suv to'kib tashlanadi va barglar alohida nomerlangan filtr qog'izga qo'yiladi, so'ngra 3-4 tomchi 1% li yod eritmasidan tomiziladi. Agar bargda kraxmal bo'lsa, sekin-asta ko'k nuqtalar paydo bo'lib, bargning yuzasi ko'karadi.

16 – TAJRIBA.

Piyoz ekstraktidagi glyukoza va boshqa qaytaruvchi shakarlarni aniqlash.

Kerakli asbob va reaktivlar: qirg'ich yoki pichoq, gaz gorelkasi, probirka, Felin suyuqligi, piyoz.

Bosh piyozening suvli ekstrakti Felin reaktivi bilan qizdirilganda avval sariq rangli mis (I) gidroksid, so'ngra qizil rangli mis (I) oksidi hosil bo'ladi. Bu reaksiyaekstraktda glyukoza va boshqa qaytaruvchilik xususiyatiga ega moddalar borligiga asoslangan.

Ishning bajarilishi. Bosh piyoz qirg'ichda yoki boshqa usulda yaxshilab maydalanadi. Tayyorlangan massadan probirkaga 0,5 g olib, uning ustiga 2 ml distillangan suv qo'yiladi va 3-4 minut qaynatiladi. So'ngra qog'oz filtr orqali filtrlanadi. Filtratdan 10 tomchi olib Felin reaksiyasi yordamida qaytaruvchi shakarlar borligi aniqlanadi. Piyoz o'mniga sabzidan ham foydalanish mumkin. Har ikkala ish natijasi 7-jadval ko'rinishida ifodalaniladi.

Tekshiriladigan material	Foydalilanigan reaktivlar	Kuzatilgan rang	Reaksiyanimaga bog'liq

17 –tajriba.

Kraxmalni miqdoriy aniqlash.

Kerakli asbob va reaktivlar: suv hammomi, 200 ml li o'lchov kolbasi, qaytar sovitgichli 200 ml hajmli konussimon kolba, chinni hovoncha (dismetri 60 mm), 5 va 10 ml li darajalangan pipetkalar, 25 ml li Mor pipetkasi, 25 va 50 ml li to'g'ri kranli byuretka, 100 ml li o'lchov tsilindri, shisha plastinka, shisha tayoqcha, xlorid kislotaning 25% li eritmasi, NaCl ning 10% li eritmasi, yodning 0,1 n eritmasi, natriy tiosulfatning 0,1 n eritmasi (yuqori aniqlikda tayyorlanishi kerak), NaCl ning 0,5 n eritmasi, H_2SO_4 ning 2 n eritmasi, kraxmalning 1% li eritmasi, Lyugol eritmasi.

Kraxmalni miqdoriy jihatdan aniqlash so'lak amilazasi yordamida fermentativ yo'l bilan parchalanganda hosil bo'ladigan glyukozani Vilshtetter va Shudl usuli bo'yicha yodometrik titrlashga asoslangan.

Ishning bajarilishi. Kraxmalni ekstraksiya qilish uchun 5 g kartoshka (yoki boshqa kraxmali bor modda) chinni hovonchada yaxshilab maydalanib, sig'imi 200 ml li o'lchov kolbasiga solingen 30-50 ml distillangan sovuq suvdan o'tkaziladi, so'ngra ustiga darhol 100 ml distillangan issiq suv qo'yiladi va qaynab turgan suv hammomiga 1 soat qo'yiladi. Kolbadagi suyuqlik chayqatilib, aralashtirilib turiladi. Shundan keyin kolbani suv hammomidan olib, $40^{\circ}C$ gacha sovitiladi va uning ustiga 10 ml so'lak eritmasi, 5 ml 10% li natriy xlorid eritmasidan qo'shib, $37-40^{\circ}C$ li suv hammomiga (kartoshka bilan ishlaganda 2-3 soat, g'allasimonlar kraxmali aniqlanganda 12-18 soat) inkubatsiyaga qo'yiladi. Kraxmalning gidrolizlanish

darajasi va tamombo'lishi vaqtida yod bilan reakciyasi yordamida aniqlanadi. Buning uchun kolbadagi aralashmadan shisha tayoqcha yordamida qattiq zarrachalar tutgan bir tomchi suyuqlik olinib buyum oynasiga tomiziladi va bir necha tomchi Lyugol eritmasi qo'shiladi. Agar ko'k rang hosil bo'lmasa, kolbaning o'lchov belgisiga qadar suv bilan to'ldirib, yaxshilab aralashtirgach, quruq filtr orqali filtrlanadi. Amilaza ta'sirida hosil bo'lgan dekstrinlar va maltoza 2,5% li HCl eritmasi bilan gidrolizlanadi. Buning uchun 100 ml filtrat 200 ml li konussimon kolbaga qo'yiladi. Uning ustiga 12 ml 25% li xlorid kislota eritmasidan qo'yilib, kolba og'ziga qaytar sovitgich (yoki uzunligi 80 sm bo'lgan shisha nay) o'matgan holda qaynab turgan suv hammomiga 3 soat qo'yiladi. Gidroliz tamom bo'lgach kolba vositiladi, eritma esa 200 ml li o'lchov kolbasiga o'tkaziladi, gidroliz olib borilgan kolba bir necha marta suv bilan chayqatib qo'yiladi va umumiy hajm 200 ml ga yetkaziladi. Suyuqlik tarkibidagi glyukoza yodometrik yo'l bilan aniqlanadi. Gidrolizatdan 10 ml olib, ustiga 0,1 n yod eritmasidan 15 ml qo'yiladi va yaxshilab chayqatib turgan holda to yod ranggi yo'qolguncha 0,5 n NaOH eritmasidan sekinsta 25 ml qo'yiladi, 10-15 minutdan keyin 2 n sulfat kislota eritmasidan 5 ml qo'shiladi va ajralgan yod 0,1 n tiosulfat eritmasi bilan titrlanadi. Eritma sariq rangga kirgandan so'ng har 50 ml hajmga 1% li kraxmal eritmasidan 1 ml tomiziladi. Parallel ravishda gidrolizat o'rniga teng miqdorda suv qo'yib kontrol qilinadi. Tekshirilayotgan mahsulotdagi kraxmal miqdori qo'yidagi formula yordamida protsentlarda hisoblab chiqiladi:

$$C = \frac{(V - V_1) \cdot V_2 \cdot 0,009 \cdot 100 \cdot 0,9}{a \cdot V_3}$$

bu yerda: V – kotorlni titrlash uchun sarflangan 0,1 n tiosulfat eritmasining miqdori (ml); V_1 – tajriba uchun sarflangan 0,1 n tiosulfat eritmasi miqdori (ml); 0,009 – titrlash natijasini glyukoza miqdoriga o'tkazish uchun koefitsient; f – tekshirilayotgan material miqdori (g); 0,9-glyukozani kraxmalga qayta hisoblash uchun koefitsient; V_2 – o'simlik mahsuloti ekstraktining hajmi (400 ml), V_3 – yodometrik titrlash uchun olingan aralashmaning hajmi (ml).

Kartoshkada har xil shakarlar miqdori oz, shuning uchun ularni hisobga olmasdan, topilgan glyukoza miqdorini kraxmalga aylantirib topish mumkin. Boshqa mahsulotlarda (pishmagan olma, barglar, poyalarda) shakar miqdori e'tiborga olarlik darajada bo'ladi. Bu holatda kraxmal miqdorini aniq topish uchun, alohida qaytaruvchi mono va disaxaridlarni aniqlab, olingen qiymatni glyukoza miqdoridan chiqarib yuborib undan keyin kraxmalga aylantirish kerak.

NUKLEOPROTEIDLAR

Bu gruppaga organizmning barcha hujayralarida bo'ladigan va genetik axborotni tashish hamda oqsilning biologik siptezida qatnashish kabi eng muhim hayotiy vazifalarni bajaruvchi murakkab oqsillar kiradi. Ularning oqsil qismini asosan protaminlar va gistonlar, oqsilmas qismini esa nuklein kislotalar tashkil etadi.

Dezoksiribonukleoprotein (DNP) va ribonukleoprotein(RNP) tarkibidagi oqsil va nuklein kislotalar o'zaro ionli bog'lar vositasida bog'langan bo'ladi. Shuning uchun ular ko'pincha ajratib olish vaqtidayoq dissotsilanadi.

18 – TAJRIBA.

a-Aminokislogalarga o'tkaziladigan ningidrin reaksiyasi.

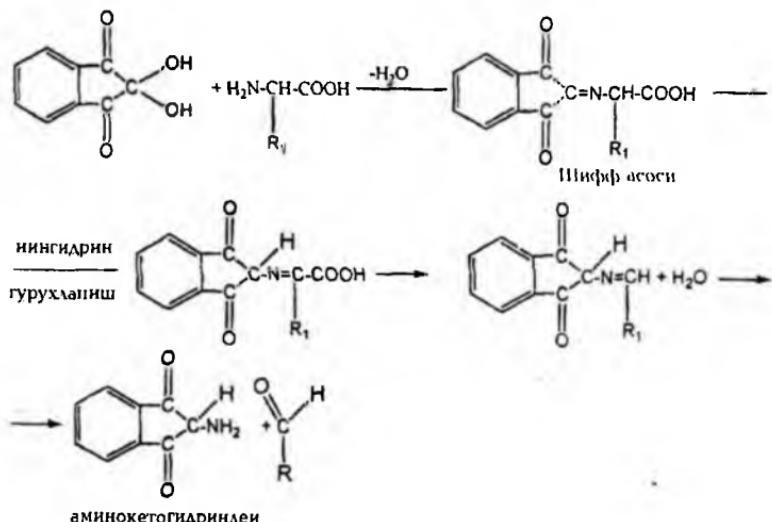
Tekshiriluvchi material: Oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: 0,1%li ningidrinning spirtli eritmasi.

II. Kerakli anjomlar: probirka va shtatiyvlar, spirt lampasi.

Reaksiyaning asoslanish: Ushbu reaksiya aminokislotalarni *a* —holatida turgan aminoguruxlariga xosdir. Ningidrin ta'sirida oksidlangan *a* — aminokislotada dezaminlanadi, dekarboksillanadi. Natijada SO₂, ammiak, aldegid xos bo'ladi. Oksidlangan ningidrin qaytarilgan ningdrinning ikkinchi molekulasi bilan ammiak ishtirokida birikib binafsha — ko'k rangli kondensatsiyalangan mahsulotni hosil qiladi.

Reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Bajariladigan ish tartibi:

Probirkadan 1—5 tomchi oqsil eritmasiga 4-5 tomchi ningidrin eritmasidan solib, 1 — 2 daqiqa qizdiriladi. Ko'kimtir —binafsha yoki binafsha rang hosil bo'ladi. Olingan natijalar 1 — jadvalga yoziladi.

19 – TAJRIBA.

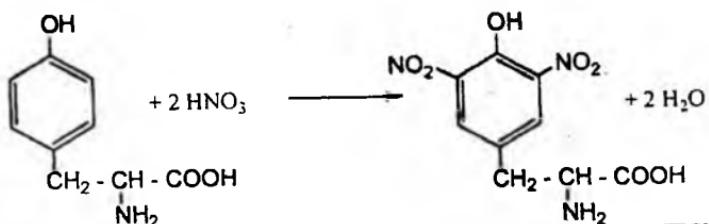
Siklik aminokislotalarga o'tkaziladigan ksantroprotein reaksiyasi.

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi

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

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

Reaksiyaning asoslanishi. Ushbu reaksiya oqsil triptofan borligini isbotlaydi. Oqsil eritmasiga kontsentrlangan nitrat kislota qo'shilganda benzol xalqanining nitrollanishi natijasida sariq rang hosil bo'ladi. Eritmaga ishqor qo'shilganda esa u sarg'ish — pushti ranga o'tadi (sariq rangli nitrobirikma hosil bo'ladi) reaksiya tenglamasi quyidagicha:



sariq rangli dinitropirozin.

Bajariladigan ish tartibi. 4 — 5 tomchi oqsil eritmasiga 1—2 tomchi konsentrangan nitrat kislota olib, ehtiyyotlik 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 tuz hosil bo'ladi. 1 — jadvaldan foydalanib natijalarni yozing.

20 – TAJRIBA.

Kuchsiz bog'langan oltingugurt tutuvchi aminokislotalarga o'tkaziladigan reaksiya. Foli reaksiysi.

Tekshiriluvchi material: oqsil eritmasi.

I. Reaktivlar: foli reaktivi.

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

Reaksiyaning asoslanishi. Sistein va sistin olish aminokislotalarida oltingugurt juda kuchsiz bog'langan bo'lib, ularni ishqor yordamida ajratib olish mumkin. Reaksiyaning asoslanishi ishqoriy gidrotiz natijasida ajralgan oltingugurt qo'rg'oshin bilan birikib, qopa rangli qo'rg'oshin sulfid tuzini hosil qiladi. Bu tuz eritmada cho'kma holatda bo'ladi. Ushbu reaksiya sistein almashinuvi buzilganda aniqlanadi.

FERMENTLAR (ENZİMLER).

Fermentlar organizmlarda sodir bo`ladigan hayotiy jarayonlarning katalizatorlaridir. Ular oqsil tabiatiga ega va hujayraning o`zida biologik sintez yo`li bilan hosil bo`ladi. Fermenglar yuqori molekulyar massaga ega biopolimerlardir. Ular juda ko`p sonlidir, chunki organizmda fermentlar ishtirokisiz birorta ham reaksiya sodir bo`lmaydi.

Fermentlar 6 sinfga bo`linadi:

- I. Oksidoreduktazalar — oksidlanish va qaytarilish fermentlari.
- II. Gidrolazalar — murakkab organik birikmalarning suv yordamida parchalanish reaksiyalarini katalizlaydi.
- III. Transferazalar - tashuvchi fermentlar.
- IV. Liazalar— qo`shbog`, saqlovchi molekulalarni oson nogidrolitik yo`! bilan parchalovchi fermentlar.
- V. Izomerazalar— molekulalarnipg tuzilishini o`zgartirish hisobiga ularning izomerlarini hosil qiluvchi fermentlar.
- VI. Ligazalar(sintetazalar) — biologik sintez jarayonlarining fermentlari.

Fermentlar termolabil moddalar bo`lib xarorat o`zgarishiga sezgir moddalardir. Shuning uchun ular faqat ma`lum temperaturadagina yuqori aktivlik namoyon qiladi. pH ning ma`lum qiymatlarda faoliik ko`rsatadi.

Fermentlar yuqori spetsifik ta`sirga ega bo`lgani uchun har bitta ferment ko`pincha bitta ximiyaviy reaksiyaga yoki bitta substratga ta`sir ko`rsatadi.

Fermentlarning o`z aktivatori va ingibitorlari mavjud bo`lib, fermentativ aktivlik ularning ta`siriga bog`liq.

Fermentlarni birorga tashuvchi modda sirtiga shimdirib xarakatsiz holga keltirib foydalaniladigan biologik katalizatorlar immobillangan fermentlar deyiladi. Bunday tarzda foydalanayotgan fermentlar soni 200 dan ortiq. Fermentlar yordamida sanoatda dori — darmonlar, vitaminlar, gormonlar, ozuqa oqsillari va boshqa ko`pgina qimmatli mahsulotlar olinadi.

21 – TAJRIBA.

So'lak amilazasining kraxmalga ta'siri.

Tekshiruvchi material. 10 marta suyultirilgan so'lak amilazasi.

I. Ishdan maqsad: so'lak tarkibida amilaza fermenti bo'lib, u kraxmalda glikogen kabi polisaxaridlar va ayrim polisaxaridlarni mal'toza yoki glyukozagacha gidrolizlash.

II. Reaktivlar: 1% li kraxmal, lyugol eritmasi, Trommer reaktivi.

Bajariladigan ish tartibi:

Og'iz yaxshilab chayiladi va toza idishga 1—2 ml so'lak yig'iladi. Unga 10 xissa ko'p distillangan suv quyib suyultiriladi. Agar hosil bo'lgan eritma tiniq bo'lmasa paxta filtr orqali suzib olinadi. 2 probirkaga kraxmalning 1% li eritmasidan 2 ml dan quyiladi. Bit'a suyultirilgan so'lak eritmasidan 1 ml, ikkinchisiga shuncha miqdorda suv quyiladi va har ikkala probirka $37 - 38^{\circ}\text{C}$ haroratli suv hammomida 10 minut davomida saqlanadi. So'ngra xar ikkala probirkadagi suyuqliklar ikkiga bo'linadi. Ularning yarmisiga yodning kaliy yodiddagi 0,3% li eritmasi tomiziladi, qolgan qismi bilan esa Trommer reaksiyasi o'tkaziladi. Birinchi probirkadagi kraxmalning gidrolizlanish mahsulotlari ikkinchi probirkadagi eritmada farqli o'laroq yod ta'sirida o'z rangini o'zgartirmaydi, lekin Trommer reaksiyasini namoyon qiladi. Kraxmalning gidrolizlanishidan hosil bo'lgan maltoza disaxaridi qaytaruvchi xossaga ega uglevoddir. shuning uchun gidrolizatda Trommer reaksiyasi ijobjiy natija beradi.

Olinigan natijalarni rasmiylashtiramiz.

Trommer reaksiyasi tenglamasini yozing, lyugol eritmasi ta'sirini ifodalang.

OKSIDLANISH – QAYTARILISH FERMENTLARI (OKSIDOREDUKTOZALAR).

Tirik organizmda sodir bo`ladigan oksidlanish va qaytarilish reaksiyalarida ishtirok etadigan fermentlar oksidlanish — qaytarilish fermentlari deyiladi. Ularning degidrogenazalar, oksidazalar, sitoxromlar kabi guruhlari mavjud.

Vodorod atomi yoki elektronlarni bevosita kislород atomiga o`tkazuvchi oksidoreduktazalar aerob degidrogenazalar yoki oksidazalar deyiladi. Bunday ko`chirilishni bir substraktdan boshqasiga o`tkazilishi bilan yakunlovchi fermentlar esa anaerob degidrogenazalar deyiladi. Anaerob degidrogenazalar ikki komponentli fermentlar bo`lib, ularning prostetik gruppasi PP vitamin saqlovchi nukleotidlari — nikotinamidadenindinukleotid (NAD) va uning fosfati(NADF)dir. Aerob degidrogsnazalarning aktiv gruppasi B₂ vitamini saqlovchi flavanoidi nukleotidlari — flavinmononukleogid (FMN) va flavinadenindinukleotid (FAD) dir.

22 – TAJRIBA.

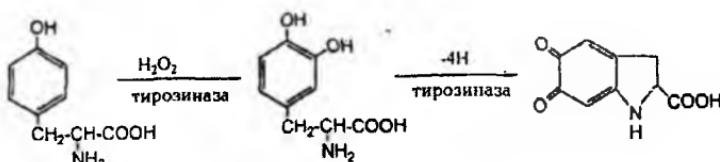
Kartoshka tarkibidagi tirozinazani aniqlash

Tekshiriluvchi material: hom kartoshka.

I. Reaktivlar: 1% li tirozin eritmasi.

II. Kerakli anjomlar: doka, probirkalar, suv hammomi.

Reaksiyaning asosi: kartoshka tarkibidagi tirozinaza fermenti tirozinni havo kislороди yordamida oksidlaydi:



dioksifenilalanish

Bajariladigan ish tartibi: bir bo`lak xom kartoshka qirg`ichdan o`tkaziladi va ozroq suv qo'shib eziladi. Hosil bo`lgan bo'tqani qo'sh qavat dokadan o`tkazib filtranadi. Filtratdan 1 ml olib unga tirozinning 1% li eritmasidan bir necha tomchi tomiziladi va chayqatilib 40°C haroratlari suv hammomiga huyiladi. Aralashma pushti — qizil, so`ngra qo'ng'ir va nihoyat (1 — 2 soat) qora rangga kiradi.

23 - TAJRIBA.

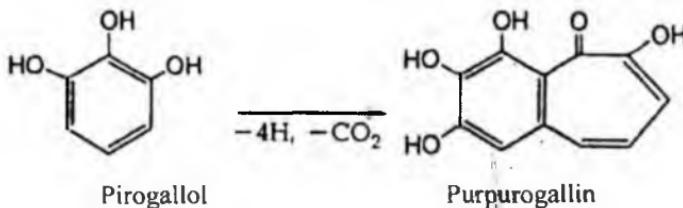
Kartoshka tarkibidagi peroksidazalarni aniqlash.

Tekshiriluvchi material: kartoshka so'rimi

I. Kerakli reaktivlar: piragololning 1% li eritmasi, vodorod peroksidning 3% li eritmasi.

II. Reaksiya asosi: o'simliklarda peroksidaza fermentlari ko'p uchraydi, ular polifepollar va aromatik aminlarning vodorod peroksid ta'sirida oksidlanishi reaksiyalarida katalizatorlik qiladi.

Ishning borishi: oldingi tajribada tayyorlangan kartoshka so'rimidan 4—5 tomchi olib, unga piragollolning 1% li eritmasidan 1—2 ml va vodorod peroksidining 3% li eritmasidan 1—2 tomchi qo'shiladi. Vaqt o'tishi bilan purpurogallining sarg'ish — qo'ng'ir cho'kmasi hosil bo'ladi:



Nuklein kislotalar (RNK, DNK) ni tabiiy manbalar(paxta chigit, undirilgan mosh, loviya, fasol, no'xat) dan ajratib olish

1-TAJRIBA.

**Fenol yordamida deproteinlash orqali paxta chigitidan
DNK ajratib olish**

Ishning umumiy izoxi. Oldindan yog'sizlantirilgan paxta chigit kununidan DNK-proteidni dodetsilsulfat yordamida eritib olinib, spirt bilan cho'kmaga tushiriladi.

Jihozlar va reaktivlar. 100 ml-li o'lchov silindri, shovoncha, sentrifuga, SF-26, 100 ml-li stakanlar, standart tuzi eritma – STE (0,14 M NaCl, 0,05 M Na-sitrat pH 8,3), suvga to'yitirilgan fenol, 200 ml 65%-li spirt, 10%-li DDS-Na.

Ishning borishi. 10 g yog'sizlantirilgan paxta chigitining kukunini standart tuzli eritma (STE) bilan shovonchada gomogen sholatga keltiriladi, bunda eritmaning qovushqoqligi ortadi. Gomogenatga teng shajmda suvga to'yintirilgan fenol qo'shiladi va aralashmani 30-40 minut davomida chayqatilib, keyin sentrifugada 15 min aylantiriladi. Bunda 3 ta qatlama shosil bo'ladi: pastki qatlama – denaturatsiyaga uchragan oqsil cho'kmasi, o'rta qatlama – fenol va yuqori qatlama suvli qatlama iborat. Fenol va suv qatlamlari oraligida denaturatsiyaga uchragan oqsilning yupqa qavati shosil bo'ladi. Suv qismida DNK bo'lib, uni pipetka yordamida tortib olinadi. Suv qismidan fenolni yo'qotish uchun efir bilan ishlanadi (1 shajmda ikki marotaba, ammo bu bosqichni qisqartirish mumkin). Suv qismidagi DNK-ni 2,5-3 shajmdagi sovutilgan 96°-li spirt yordamida cho'ktiriladi, buning uchun oldinroq DNK eritmasining ion kuchini 1 M-gacha keltiriladi (5 M nariy atsetat yordamida). DNK eritmasini oz-oz miqdorda spirtga qo'shiladi. DNK ipsimon cho'kma sholida eritma yuzasiga chiqadi. DNK iplarini 20 ml standart tuzi eritmada eritiladi va unga 1 M-gacha natriy atsetatdan qo'shiladi va spirt bilan cho'ktirish qaytariladi. DNK-ni shisha tayoqchaga o'raladi va uni filtr qog'ozni orasiga olib siqiladi va 20-30 ml STE-da eritiladi. eritmaning 260 nm-da optik zichligi o'lchanadi va DNK-ning chiqish miqdori aniqlanadi (A_{260} dagi 1 optik birlik 47 mkg DNK-ga teng). A_{260}/A_{280} va A_{260}/A_{230} nisbatlarni aniqlanadi. Birinchi nisbat qoldiq oqsil mikdorini (oqsildan tozalangan $DNK \geq 2,00$), ikkinchi nisbat qoldiq polisaxaridlarning miqdorini aniqlaydi.

1-TAJRIBA.

Undirilgan loviyadan umumiy RNK ajratib olish

Ishning umumiy izoxi. Fenol – detergent yordamida loviya kurtagidan umumiy RNK ajratib olinib, uning tozalik darajasi va unumini aniqlash.

Jihozlar va reaktivlar.

Sentrifuga, shovoncha, aralashtirgich, 50 ml-li o'lchov silindri, 10 ml-li pipetka yoki 10-20 ml-li shpritslar, standart tuzli eritma – 0,14 M Na(K)-sitrat, 200 ml etil spirti, suvgaga to'yingan fenol, pH 6,0-li 10%-li Na-dodetsilsulfat (Na-DDS), xloroform, izoamil spirti, 5 g ungan loviya.

Ishning borishi. Loviyaning unib chiqqan qismini vodoprovod suvi bilan va keyin distilangan suv bilan yaxshilab yuviladi. Undan 5 g olib, chini shovonchada 50 ml standart tuzi eritmada gomogen sholatga keltirililadi va gomogenatni 3-4 qavatlilokdakidan o'tkaziladi. Bu gomogenatga 1%-gacha Na-dodetsilsulfat qo'shiladi va aralashtiriladi va uning ko'pirib ketmasligiga e'tibor berib, suvgaga to'yintirilgan pH 6,0-li fenol qo'shiladi. Aralashmani 60 °C-gacha qizdiriladi va 30 minut davomida yaxshilab chayqatiladi, 0 °C - + 5 °C atrofida sovutililadi va 15-20 minut davomida sentrifugalanadi. Bunda 3 ta qavat shosil bo'ladi: suvli, fenol va cho'kma. Suvli qatlam deproteinlashga uchragan RNK-dan tarkib topgan, uni shprits yordamida ajratib olinadi va teng shamdagisi xloroform va izoamil spirti aralashmasi (24:1) bilan deproteinlanadi. Aralashmani fenol bilan ishlanganidek yaxshilab chayqatiladi, sentrifuga qilinadi va yuqoridagi suvli qavat ajratib olnadi. RNK suvli qavatdan 2,5 shamydagisi spirt bilan cho'ktiriladi (-10 °S). TSentrifuga yordamida cho'kmani ajratib olinadi va 10-20 ml standart tuzi eritmada eritiladi yoki boshqa bufer eritma ishlatalish mumkin va 260, 280 va 230 nm-da yutilish qiymatlari aniqlanadi. A_{260}/A_{230} va A_{260}/A_{280} aniqlanadi. Birinchi nisbat RNK-ning polisaxaridlardan, ikkinchisi oqsillardan tozalanish darajasini belgilaydi ($\geq 2,00$). 260 nm-dagi yutilish yordamida RNK kontsentratsiyasi va shosil bo'lgan miqdori aniqlanadi (260 nm-dagi 1 optik birlig qiyomatga 42 mkg RNK to'g'ri keladi).

3-TAJRIBA.**Detergent yordamida deproteinlash orqali paxta chigitidan
DNK ajratib olish**

Ishning umumiyo izoxi. Olingen yog'sizlantirilgan paxta chigiti kukunidan dezoksiribonukleoproteidni 1%-gacha Na-dodetsilsulfat (Na-DDS) yordamida eritilib olinadi. 1M NaSl yordamida Na-DDS- oqsil kompleksini DNK-dan deproteinlanish jarayoni olib boriladi.

Jihozlar va reaktivlar. 500 ml-li o'chov silindr, shovoncha, sentrifuga, SF-26, 2 dona 100 ml-li stakanlar, tris-EDTA bufer «TE» (0,02 M tris HCl pH 8,0 0,2 mM EDTA bilan), 10%-li Na-DDS, 96%-li spirt.

Ishning borishi. YOg'sizlantirilgan 10 g quruq paxta chigitining kukunini shovonchada TE ubferi bilan (40-50 ml-gacha) gomogen sholatga kaltiriladi va unga 10%-gacha Na-DDS komplekslar va boshqa moddalarni dissotsiatsiyalash uchun qoshiladi. Detergentni asta qoshib bori shva aralashtirish natijasida eritmaning qovushqoqligi oshadi va gomogenat tipiiq sholatga keladi. Dissotsiatsiyalanish jarayonidan keyin gomogenati 15 min. davomda sentrifuga yordamida (5-70 ming ayl/min)tindiriladi. Tindirilgan gomogenatga NaSl-ning natijaviy kontsentratsiyasi 1 M bo'lgncha (5 M eritmadan) ko'shiladi va loyqa suspenziyani sovuqxonada (xolodil'nik) 30 min. davomida saqlanadi, so'ngra 1M tuz kontsentratsiyasida erimagan Na-DDS-oqsil kompleksinining cho'kmasini sentrifuga yordamida ajratib olinadi va tashlab yuboriladi. Supernatant ustidagi suyuqliqni oz-oz miqdorda 3-shajmdagi 95%-li sovitilgan spirtga quyiladi. YUqori molekulali DNK bunda suvli spirtning yuziga qalqib chiqadi. DNK iplarini shisha tabqchaga o'rabi, keyin 20-30 ml TE-da eritladи va unga 1 M-gacha bo'lgan NaCOOCH₃ qo'shiladi va spirt bilan cho'ktirishshni qaytariladi.

Ajratib olingen DNK namunasi oz bo'lsa sham RNK-dan va 1-2% oqsil qoldigidan tashkil topgan. DNK iplarini ikkinchi marotaba cho'ktirilgandan keyin uvi spirtdan tozalash uchun filtr qogoz orasiga olib qisiladi. Keyin TE-da eritiladi va DNK miqdori aniqlanadi. DNK eritmasinig 1 optik birligiga 47 mkg/ml-dagi kontsentratsiya to'g'ri keladi ($I = 1 \text{ sm}$, $A_{260} (47 \text{ mkg/ml}) = 1,00$). A_{280} va A_{210} ni aniqlanadi, A_{260}/A_{280} nisbatan qoldiqli oqsilning miqdorini belgilaydi ($\geq 2,00$). A_{260}/A_{230} nisbatan esa polisaxaridlarning miqdorini belgilaydi.

RNK va DNK larni tozalash, ishqoriy va kislotali gidrolizlari.

Gidroliz mashsulotlarining tarkibini (purin, pirimidin asoslari) xromatografiya yordamida o'rganish

1 – TAJRIBA.

DNK-ning kislotali gidrolizi va xromatografiya yordamida nukleotid tarkibini aniqlash

Ishning umumiy izoxi. D NK-ni HClO_4 -ning 72%-li aralashmasi bilan gidrolizlanadi va gidrolizatni silikagelli yupqa qatlama xromatografiya qilinadi, asoslarning rangli dog'larini ajratib olinadi va asoslarning miqdorini va nukleotid tarkibini aniqlanadi.

Jihozlar va reaktivlar. 2 M D NK, 72%-li HClO_4 , gidroliz uchun ampula, 100 °S-li termostat yoki suv shammomi, xromatografiya kamerasi, SF-26, yupqa silikagel' qatlamlari xromatografiya qog'oz.

Ishning borishi. 2 mg D NK-ni oz miqdordagi 72%-li HClO_4 bilan (DNK cho'kmasi kislotaga shimdirlilsin) bir soat davomida 100 °S-da (suv shammomida berkitilgan ampulada gidrolizlanadi). Gidrolizdan keyin, ampula ochiladi va gidrolizatni kerak bo'lgachda 1-2 tomchi suv bilansuyultiriladi va yupqa silikagelli qavatlarda xromatografiya qilinadi. Yuqorida ko'rsatilgan sharoitda D NK ozod asoslargacha, ribozagacha (furfurolga aylanadi) va fosfat kislotaga gidrolizlanadi. To'yingan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1 M NaCOOCH_3 : i-propanol = 80:18:20 sistemasida xromatografiya qilinganda asoslar quyidagicha taqsimlanadi: (boshlangich nuqtaga nisbatan) guanin, adenin, timin, tsitozin. 5 mM HCl ishlatalganda asoslarning taqsimlanishi o'zgarmaydi, ya'ni guanin, adenin, timin, tsitozin, ammo timin sitozindan yaxshiroq ajralib chiqadi.

Metanol : konts. HCl : suv = 7:2:1 sistemasida qogoz xromatografiyanı ishlatsa yaxshi natijalarga erishish mumkin. Pastga yo'naluvchi qogoz xromatografiyasida asoslar quyidagicha joylashadi: guanin, adenin, tsitozin va timin.

Xromatogrammani issiq shavoda quritiladi va UB-nurida kuzatilib, qalam bilan asoslarning dog' chegaralarini belgilanadi, silikageldagi yoki qog'ozdag'i shar bir dog' 5-6 ml 0,1 n HCl bilan yuviladi. Yuvib olishni tezlatish uchun qog'ozni

mayda-mayda qilib qirqiladi va yuvishni bir qancha vaqt davomida 37-45 °C-da olib boriladi.

Yuvib olingen eritmalarni shisha filtrdan o'tkaziladi va optik zichligi o'lchanadi: guanin 250 va 290 nm-da, adenin 260 va 290 nm-da, tsitozinin 276 va 290 nm-da, timin 260 va 290 nm-da. O'simliklardan olingen DNK-ni o'rghanishda xromatogrammalarda tsitozin va timin dog'lari orasida yana bir chiziq shosil bo'ladi: **u** 5-metiltsitozinga to'g'ri keladi. 5-metiltsitozinga to'g'ri keladigan ekstraktni 280 va 300 nm-da tekshiriladi. Olingen optik zichliklarga ko'ra asoslarning miqdori quyidagi formula bo'yicha mkmollarda aniqlanadi: $G = 0,714 \times (E_{250} - E_{290})$, $A = 0,399 \times (E_{260} - E_{290})$, $TS = 0,940 \times (E_{276} - E_{290})$, $5\text{-MTS} = 0,893 \times (E_{280} - E_{300})$ va $T = 0,743 \times (E_{260} - E_{290})$. Har bir asosning molyar protsenti shisoblab (shar bir asosning mkmollar yig'indasi 100% deb olinadi) chiqariladi. Natijalar jadval ko'rinishida rasmiylashtiriladi.

2 – TAJRIBA.

RNK-ning ishqorli gidrolizi va yupqa qatlamlili xromatografiya yordamida nukleotid tarkibini aniqlash

Ishning umumiy izoxi. DNK 1 n KON yordamida ribomononukleotidlarigacha bilan gidrolizlanadi, gidrolizat HClO_4 bilan neytrallanadi, silikagelli plastinkalarda yupqa qavatli xromaografiya qilinadi, nukleotidlar aloshida ekstraksiyalanadi va RNK-ning nukleotid tarkibini aniqlanadi.

Jihozlar va reaktivlar. 10 mg RNK preparata, shlifli probirka, 37 li termostat, sentrifuga, xromatografiya kamerasi, SF-26, 1 n KOH, 50%-li HClO_4 , universal indikator qog'ozи.

Ishning borishi. 10 mg RNK olib, uni ul'tratermostatda 37-38 °S sharoratda 12-18 soat davomida 0,1-0,2 ml 1 n KOH yordamida gidroliz qilinadi. gidroliz vaqtini 3,5-4 soatgacha qisqartirish mumkin, lekin bu sharoitda (4 soat, 60 °S) tsitidil kislotasining bir qismi dezaminlanadi va uridil kislotaga aylanadi. Gidroliz vaqtini tugagach, gidrolizat sovutiladi va 50%-li HClO_4 bilan neytrallanadi. Yomon

criydigan KClO_4 cho'kmaga tushishi uchun aralashma muzli suv shammomida qoldiriladi.

Gidroldizatdagi ribomononukleotidlар aralashmasи YU+X yordamida etanol : n-butanol (4:1) sistemasida aniqlanadi. So'ngra plastinkani quritib, shu yo'nalishda suv bilan to'yingan va kontsentrlangan ammiak yordamida pH 3,5-4,5-ga keltirilgan izomoy kislotasida xromatografiya qilinadi. Nukleotidlар standartdan boshlab, quyidagi tartibda joylashadi: guanil kislota, uridil, tsitidil va adenil kislota. Ul'trabinafsha nurida shosil bo'lgan dog'lar aniqlanadi, oldiy qalam bilan chiziladi va pH 7,0 bo'lgan 5 ml 0,3-0,5 M K-(yoki Na) fosfat buferi eritmasи yordamida 37-45 °S-da bir necha soat davomida elyuatsiya qilinadi. elyuatlar spektrofotometrda quyidagi to'lqin uzunliklarida tekshiriladi: guanil kislota (GK) 255 nm va 290 nm, adenil kislota (AK) 260 nm va 290 nm, sitidil kislotasi (TSG) 270 va 290 nm, uridil kislotasi (UK) 260 va 290 nm. Nukleotidlар mkmollarda quyidagi formulalar bo'yicha aniqlanadi: GK = $0,47 \times (E_{255} - E_{290})$, AK = $0,363 \times (E_{280} - E_{290})$, TSK = $0,73 \times (E_{270} - E_{290})$, UK = $0,515 \times (E_{260} - E_{290})$. RNK ni xarakterlash uchun nukleotidlар molyar protsentlarda ifodalanadi.

Nisbatan tez va effektiv ravishda ajratishga DEAE-sellyulozalar plastinkalar YUQX da olib borish bilan erishish mumkin. Bunda DEAE-sellyulova gips yordamida plastinkaga mahkamlanadi (plastinkalarga 78,5 g DEAE—sellulova va 62 ml suvdagi 1 g gipsdan iborat suspenziya qo'llaniladi, 50 °C da 2 soat davomida quritiladi). 0,005 n HCl yordamida xromatografiya qilinadi, elyuatsiya qilish va nukleotidlарni miqdorini aniqlash yuqorida bayon etilgani kabi amalga oshiriladi. Nukleotidlarning joylashishi quyidagi tartibda bo'ladi: A-2 fosfat (0,32), A-3 fosfat (0,24), G-2 fosfat (0,18), G-3 fosfat (0,09), TS-2 fosfat (0,61), TS-3 fosfat (0,50), U-2 fosfat (0,48), U-3 fosfat (0,42).

UGLEVODLAR

Uglevodlar xujayraning tuzilishi va hayot faoliyatida oqsillar kabi zarur moddalar bo`lib, tarkibi ko`pincha uglerod va suv molekulasi elementlaridan iborat ($S_m H_{2n}O_n$) polioksikarbonil birikmadir. Aldegid gruppa saqlovchi uglevodlar al`dozalar, keton gruppa saqlovchilar —ketozalar, amino gruppa bo`lganlari aminoqandlar deb ataladi. Tuzilishiga ko`ra barcha uglevodlarni uch gruppaga monosaxaridlar, olongosaxaridlar va polisaxaridlarga ajratish mumkin. eng oddiy uglevodlar monosaxaridlar bo`lib, ular uglerod atomlari soniga qarab trioza, tetroza, pentoza, geksoza va x,k deb ataladi. Bularning bog`lanish zanjirlari ochiq va xalqali shaklda uchraydi. Xalqa shaklidagi gidroksil gruppa yarim atsetal yoki glikozid gidroksili deb ataladi. Uglevodorodlarnipg qaytarish xossasi xuddi shu gidroksil gruppaga bokliq. Shu gidroksil gruppa hisobiga boshqa molekulalerning birikishidan tirk tabiatda keng tarqalgan glikozidlar hosil bo`ladi. Nuklein kislotalar ham pentozalarning vakili bo`lgan riboza va dezoksiriboza glikozidlaridir. Geksozalar vakillaridai glyukoza, fruktoza, galaktoza, mannoza kabi uglevodlar amaliy jihatdan muhim ahamiyatga ega. 2 — 10 ta monosaxarid zvenosining birikishidan oligosaxariddar hosil bo`ladi. Bular orasida saxaroza, mal`toza, tsellibioza, laktoba, tregalloza kabi disaxaridlar ahamiyatlidir. Polisaxaridlar ko`pgipa monosaxaridlarping birikishidan hosil bo`ladi. Agar ulariинг monomer birliklari bir xil bo`lsa gomopolisaxarid, xar xil bo`lsa — geteropolisaxaridlar deb nomlanadi. Gomopolisaxaridlar orasida kraxmal, glikogen, selluloza, geteropolisaxaridlardap esa gialuron kislota, heparin, inulin na pektin moddalar xarakterlidir.

MONOSAXARIDLARNING SIFAT REAKSIYALARI.

Umumiy formulasi $C_MH_{2n}O_n$ bo`lgan va gidrolizlanmaydigan uglevodlar monosaxaridlardir. Ularda asimmetrik uglerod atomlari bshlgani uchun optik izomerlar mavjud antipodlar aralashmasi ratsematlar deyiladi. Monosaxaridlarda ketoenol va xalqa zanjirli tautomeriya kuzatiladi. Kristall holda monosaxaridlar faqat xalqa shaklida bo`ladi, eritilganda solishtirma burish burchagi o`zgaradi. Bu xalqali va ochiq zanjirli izomerlarping dinamik muvozanatga kelishi bilan bog`liq hodisa mutarotsiya deyiladi.

Monosaxaridlar al'deigid gruppa yoki spirtlarga xos reaksiyadarni namoyon qiladi. Bular oksidlanish, qaytarilish, karbonil kislorodining o'rnnini olish, polikondensatlaiish (smolalanish) va boshqa reaksiyalardir. Bioximiaviy nuqtai nazardan monosaxaridlariing oksidlanish — qaytarilish va fosfo — efirlar hosil qilish reaksiyalari qimmatlidir.

Monosaxaridlariing turli rangli reaksiyalarga ham ega bo'lib, ularni sifat va mivdor jihatdan aniqlashga yordam beradi.

1 – tajriba.

Fruktozaning mochevina bilan reaksiyasi.

Tekshiriluvchi material: fruktoza eritmasi.

I. Kerakli reaktivlar: mochevina kukuni, koitsentrangai HCl.

II. Kerakli asboblar: chinni kosacha, probirkalar, shtativlar, pipetka.

Ishning borishi: Chinni kosachaga ozroq (0,5—1g) mochevina kukuni, 5 — 6 tomchi kontsentrlangan HCl va 2 — 3 tomchi fruktozanipg 2% li eritmasi solinadi. Mochevina erib ketguncha chayqaladi va kosacha qaynab turgan suv hammomiga quyiladi. 10— 15 minutdan keyin feruza (moviy) rang hosil bo'ladi.

Ushbu reaksiya al'dogeksozalar bilan o'gkazilsa qizil rang, al'dopentozalar bilan o'tkazilganda esa sariq rang hosil bo'ladi.

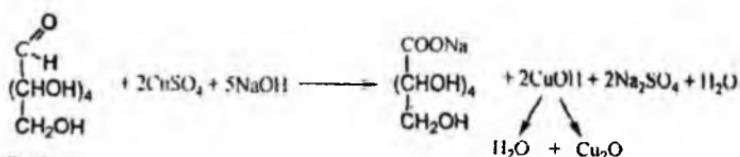
2-tajriba

Monosaxaridlarning oksidlanishi.

- 2) Tekshiriluvchi material: glyukozaning 1% li va fruktozaning 1% li eritmasi.
- 3) Kerakli reaktivlar: NaOH ning 10% li eritmasi, mis kuporasining 5% li eritmasi, kumush oksidning ammiakdag'i eritmasi.
- 4) Kerakli asboblar: suv hammomi, termometr, probirkalar, pipetka va shtativlar.
- 5) Ishning borishi: monosaxaridlar ishqoriy sharoitda oksidlanib, ko'pgina metallarni qaytaradi. Qaytarish xossasi mal'toza, lakoza va tsellobioza kabi disaxaridlarda ham mavjud.

A) Trommer reaksiyasi. Glyukozaning suyultirilgan eritmasida uning yarim xajmi miqdorida o'yuvchi natriyning 10% li eritmasidan qo'shiladi va mis kuporosiping 5% li eritmasidan bir necha tomchi tomiziladi. Aralashma qaynaguncha

qizdiriladi. Dastlab sariq rangli mis (I) gidroksid cho'kmasi hosil bo'ladi va u tzedu mis (I)-oksidning qizil cho'kmasiga aylanadi:



B) Kumush oksidning qaytarilishi.

2 ta toza probirkaga kumush oksidning ammiakdagи eritmasidan 3 — 4 ml dan quyiladi va ularping biriga glyukozaning 1% li eritmasidan 2 ml, ikkinchisiga fruktozaning 1% li eritmasidan 2 ml qo'shiladi. Probirkalar 70- 80°С xaroratli suv hammomida 5- 10 minut mobaynida saqlanadi. Probirkaning devorida kumush ko'zgu hosil bo'ladi:



DISAXARIDLARNING UMUMIY REAKSIYALARI.

Ximiyaviy tuzilishiga ko'ra disaxaridlар monosaxaridlarning glikozid—glyukoza tipida bog'langan vakillaridan katta farq qiladi: birinchi tip vakillari al'degid yoki keton gruppaga xos reaksiyalarni bermaydi, oksidlanmaydi, qaytarilmaydi va xokazo. Ikkinchi tip disaxaridlар ximiyaviy xossalari jixatidan buning aksidir. Lekin xar ikkala tip disaxaridlар oddiy va murakkab efirlar hosil qiladi, metall gidroksidlari bilan ta'sirlashadi.

Ko'pgina disaxaridlар ham monosaxaridlар kabi suvda yaxshi eriydigan, shirim ta'mli, oson kristallanadigan, molokulnr massasi upcha yuqori bo'lмаган moddalardir. Umumiy formulasi murakkab uglevodlar kabi $S_mN_{2n}O_n$ tarzida(bu erda $m > n$).

1 – TAJRIBA

Saxarozaning inversiyasi;

Saxaroza qaytaruvchi xossaga ega emas, chunki u glyukoza bilan fruktozaning trigaloza tipida birikishidai hosil bo'lgan. Saxaroza kislotali muhitda gidrolizlanib inversiyalangan vand (teng miqdordagi glyukoza bilan fruktoza aralashmasini) hosil qiladi.

Probirkaga saxarozaning 1% li eritmasidan 3 — 4 ml quyiladi va unga sulfat kislotaning 10% li eritmasidan 1 ml qo'shiladi. Aralashma 1 — 2 minut davomida qaynatiladi. Gidrolizatdan 0,5ml quyiladi. qolgan qismiga natriy bikarbonat kukuni qo'shib neytrallanadi (lakmus bilan sinang). So'ngra gidrolizat bilan Trommer reaksiyasi o'tkaziladi. Olib qo'yilgan gidrolizat bilan Sellvanov reaksiyasini qilib ko'ring.

Tajriba natijalari saxarozaning inversiyalariganligini va naytarish xossasiga ega bo'lgan monosaxaridlarga parchalanganligini ko'rsatadi.

2 – TAJRIBA.**Saxarozaning kobalt va nikel tuzlari bilan reaksiyasi.**

Tekshiriluvchi material: saxarozaning 10% li eritmasi.

I. Kerakli reaktivlar: uyuvchi natriyning 5% li eritmasi, kobal't sulfatning 5% li eritmasi, nikel' sulfatning 5% li eritmasi.

II. Kerakli asboblar: suv hammomi, termometr, probirka, shtativlar, pipetka.

Bajariladigan ish tartibi:

Shakar molekulasida spirt gruppalarini borligi ularni murakkab efirlar va metallarning gidroksidlari bilan saxaratlar hosil qilish xususiyati bilan isbotlanadi.

Ikkita probirkaga saxarozaning 10% li eritmasidan 2 — 3 ml qo'yiladi va ularga o'yuvchi natriyning 5% li eritmasidan 10—12 tomchi qo'shiladi. Birinchi probirkaga kobal't sulfatning 5% li eritmasidan, ikkinchi probirkaga esa nikel' sulfatning 5% li eritmasidan bir necha tomchi tomiziladi. Saxaroza kobal't tuzlari ta'sirida binafsha rang, nikel' tuzlari ta'sirida esa yashil rangli birikmalar hosil qiladi.

3 – TAJRIBA.**Saxarozaning fermentativ gidrolizi.**

1) Tekshiriluvchi material: 1,5 — 2 g xamirturush.

2) Kerakli reaktivlar: 10—12ml suv, saxarozaning 3% li eritmasidan 3 ml.

3) Kerakli asboblar: suv hammomi, termometr, probirkalar, pipetka, shtativlar.

I. Ishning borishi:

Saxaroza xamirturush tarkibida ko'p bo'ladi. Hovonchaga 1,5 — 2 g xamirturush solib yaxshilab yanchiladi va 10—12 ml sut quyib chayqatiladi. Undap 6 ml olib ikkita probirkaga bo'lib qo'yiladi. Ularning biri qaynab turgan cyv hammomida 10 minut to'ldiriladi. Ushbu probirkaga cyv oqimida sovitiladi. So'ngra xar ikkala probirkaga saxarozaniig 2% li eritmasidan 3 ml dan qo'shiladi. 5 — 8 minutdan so'ng aralashmalarni fil'trlab ular bilan Trommor reaksiyasi qilib ko'rildi. Ferment ta'sirida ikkinchi probirkadagi saxarozaning gidrolizlanganligiga va gidroliz maxsulotlari Trommer reaksiyasini ko'rsatganligiga ishonch hosil qiling.

POLISAXARIDLAR

Polisaxaridlardan tarkibida monosaxarid zvenolari ko'p bo'lganligi uchun ular yuqori molekulyar massaga ega. Ularning ko'pchiligi suvda yaxshi eriydi yoki kolloid eritmalar hosil qiladi. Shirin ta'm ham bu moddalar uchun xos emas.

Polisaxaridlardan katta biologik ahamiyatga ega. Kraxmal, glikogen, insulin kabi vakillari o'simlik va hyvonlar organlarida zapas ozuqa modda hisoblansa, xondroitin sulfat kislota, kansulyar polisaxaridlardan tselyuloza tayanch va ximoya vazifasini bajaradi.

Ximiyaviy tuzilishiga ko'ra barcha polisaxaridlardan poliglikozidlardir. Ular suyultirilgan kislotalar va fermentlar ta'sirida gidrolizlanadi. Inqorlar esa ularni gidrolizlay olmaydi.

4 – TAJRIBA

Kraxmal uchun sifat reaksiya.

Tekshiriluvchi material: kraxmal.

I. Kerakli reaktivlar: yod, lyugol, eritmasi 80 — 90 ml qaynab turgan suv.

II. Kerakli asboblar: suv hammomi, termometr, probirkalar, pipetka, shtativlar.

Bajariladigan ish tartibi:

Kraxmal molekulasi ikki komponentlidir. Tarmonlanmagan qismi — amilaza (yod ta'sirida ko'karadi) tarmoqlangan milopektin (yod ta'sirida qizil-binafsha tusga kiradi) deb ataladi.

Kraxmal kleysgeriga lyugol eritmasidan tomixilsa ko'k rang hosil bo'ladi. qizdirilganda rang yo'qoladi. Sovitilganda yana paydo bo'ladi.

Lyugol eritmasi 1 g yod va 2 g kaliy yodidning 100 ml suvdagi eritmasidir.

Kraxmal kleysteri 1 g kraxmaliig ozgina sovuq suvda tayyorlangan bo'tqasiga 80 — 90 ml qaynab turgan suv quyib tayyorlanadi.

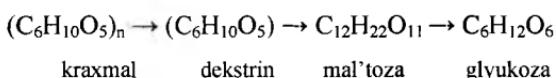
5 – TAJRIBA.**Kraxmalning gidrolizlanishi.**

Kraxmal maxsus ferment — amilaza ta'sirida disaxarid ~~maltozaynicha~~
parchalanishi mumkin. Kislotalar ta'sirida gidrolizlanganda esa dastlab ~~dekstrinlarga~~,
~~so'ngra~~ esa monosaxarid — glyukozaga aylanadi.

Probirkaga 4 — 5ml kraxmal kleystridan solib unga sulfat kislotaning 10% II eritmasidan 0,5 ml qo'shiladi va past alangada qizdiriladi. Suyuqlik qaynagach xur ikki minutda buyum oynasi ustiga 1 tomchidan olib lyugol eritmasidan 1 tomchi qo'shib, rang o'zgarishi kuzatib boriladi.

Dastlab kraxmal yod ta'sirida ko'karadi, vaqt o'tishi bilan gidrolizi boshqa maxsulotlari hosil bulib, binafsha rangga kiradi. Sungra esa yodning sariq rangi saqlanib qoladi.

Gidroliz nihoyasiga yetgach aralashma sovitiladi va oz – ozdan kalsiy karbonat qo'shish bilan neytrallanadi. eritmaning ko'pirishi to'xtagach u filtrlanadi, yaya'niosil bo'lgan kaltsiy karbonatdan tozalanadi. Filtrat bilan Trommer reaksiyasi o'tkaziladi. Gidroliz mahsulotlari orasida qaytaruvchi monosaxarid — glyukoza bo'lganligi uchun ham Trommer reaksiyasi ijobiy natija beradi. Gidroliz sxemasi:

**6 – TAJRIBA.****Sellyulozaning gidrolizlanishi.**

Sellyuloza qiyin gidrolizlanadigan polisaxariddir. Unga kontsentrlangan H_2SO_4 bilan ishlov berilsa, sellyulozaning murakkab efirlari va amiloid hosil bo'ladi.

Bunday o'zgarishlarga uchragan sellyuloza osonroq gidrolizlanadi.

Quruq probirkaga fil'tr qogoz qiyqimi solinadi va uning shimalishi uchun etarli miqdorda kontsentrlangan sulfat kislotasi qo'yiladi. Aralashma shilimshiq modda hollil bo'lguncha shisha tayoqcha yordamida aralashtirib turiladi. Ortigacha kislotasi to'kkib tashlanadi. qolgan massaga 5 — 6 ml suv quyiladi va 10 minut chumrosi qaynatiladi

Keyin gidrolizatga natriy bikarbonat talqonini qo'shib neytrallanadi va uning tarkibida qaytaruvchi shakar borligi Feling suyuqligi yordamida aniqlanadi.

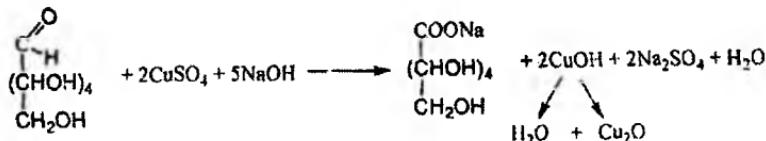
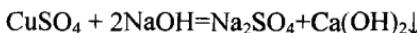
Gidroliz sxemasi:



kraxmal glyukoza

Feling suyuqligi, ikki xil erigma bo'lib, ishlatish oldidan teng hajmda aralashtiriladi:

1. 500 ml da 34,6 g mis kuperosi bo'lgan eritma
2. 500 ml da 173 g segnet tuzi va 70 g uyuvchi natriy bo'lgan eritma.



7 – TAJRIBA.

Jigar oqi taloqdan DNK ajratib olish.

Reaksiyaning asoslanishi: DNK larni ajratib olish uchun qulay biologik materiallar buqoq bezi, taloq, jigar, spermatozoidlardir.

I. Tekshiriluvchi reaktivlar: 5 g taloq yoki jigar.

II. Kerakli reaktivlar: osh tuzining 2 m eritmasi va 1 m eritmasi, distillangan suv.

III. Kerakli asboblar: Sentrifuga, xovoncha, probirkalar va shisha tayoqcha.

Bajariladigan ish tartibi:

Xavonchada 5 g taloq yoki jigar shuncha miqdordagi mayda va toza qum bilan yaxshilab eziladi. So'ngra aralashmaga osh tuzining 2 m eritmasidan 5 ml qo'shiladi. Keyinchalik osh tuzining 1 m eritmasidan 25 ml qo'shiladi va 10—15 minut eziladi. So'ngra massa tsentrifugalanadi. Sentrifuganing xajmi o'lchanadi va undan 6 hissa ko'proq suvga asta —sekin qo'shiladi. Suv qum bilan aralashtirib turilsa, DNK inchalari cho'pga ilashib chiqadi. Ugar cho'kma para —para bo'lsa, tindirib, tsentrifugalash yo'li bilan ajratib olish mumkin. Hosil bo'lgan cho'kmadan keyingi tajribada foydalanaladi.

8 – TAJRIBA.**DNK uchun sifat reaksiyasi.**

1. Reaksiyannng asoslanishi: oldingi tajribada olingan DNK cho'kmasisini **gidrolizlash** yo'li bilan tarkibiy qismlarga ajratish va uni xar bir komponenti uchun **sifat reaksiya** o'tkazish mumkin. Dastlab DNK oddiy hosil va DNKga parchalanadi. **So'ngra** DNKnинг destruktsiyalanishi natijasida purin asoslari, pirimidin asoslari, **dezoksiriboza**, anorganik fosfat kabilar hosil bo'ladi. Oddiy oqsillardan esa **polipeptidlar**, peptidlar va aminokislotalar kabi parchalanish maxsulotlari hosil **bo'lishi** mumkin.

Tekshirilupchi material: DNK cho'kmasi.

I. Kerakli reaktivlar: o'yuvchi natriyning 0,4% li eritmasi, difenilamin eritmasi.

II. Ishlatiladigan asboblar: probirka va pipetkalar.

4. Ishning borishi: probirkaga DNK cho'kmasidan ozroq solib, uning ustiga **o'yuvchi** natriyning 0,4% li eritmasidan 1 — 2 ml va shuncha difenilamin eritmasi **quyiladi**. Aralashma 10—12 minut qaynab turgan suv hammomida saqlanadi. Ko'k **rang** hosil bo'ladi. DNK tarkibidagi dezoksiriboza difenilamin bilan shunday rang **beradi**. Difenilamin eritmasi tayyorlashda, 70% li spirtda ikki bora qayta kristallab **tozalangan** 1 g moddani 2,75 ml kontsentrlangan sulfat kislota va 100 ml muz sirka **kislota** eritib tayyorlanadi.

9 – TAJRIBA.

Xamirturishlardan nukleoprotein ajratib olish.

Tekshiruvchi material: yangi xamirturush.

Reaktivlar: H_2SO_4 ning 10% li eritmasi, $NaOH$ ning 10% li eritmasi. Mis(II) **sulfatning** 1% li va 7% li eritmasi, NH_3 ning kontsentrlangan eritmasi, $AgNO_3$ ning 1% li eritmasi, molibden reaktivi.

Kerakli anjomlar: qaytar xolodilnik o'rnatilgan keng probirkalar, asbest turlari **yoki** Ag hammomlar, voronkalar, fil'trlar.

Bajariladigan ish tartibi:

1. Gidroliz. Keng probirkaga 0,5 g xamirturush(achitqi), ustiga to'rt ml 10% li N_2SO_4 colinali va probkali qaytar xolodilnik bilan birlashtiriladi (25 — 30 sm).

Moslama asbestos churli isitgichda yoki qum hammomida 1 soat davomida qaynatiladi. Bir ozdan so`ng gidroliz to`xtatiladi. Fil'trdan o`tgan suyuqlik tarkibidagi gidroliz maxsulotlari sifat reaksiyalar yordamida aniqlanadi.

1. Polipeptidlarni aniqlash uchun biuret reaksiyasi, 5 tomchi gidrolizatga 10 tomchi 10% li natriy oksid eritmasi va (1 tomchilik sulfat eritmasidan solinadi. Suyuqlik binafsha tusga kiradi.

1. Purin asoslariga Ag sinamasi, 10 tomchi gidrolizat, 1 tomchi kontsentrlangan NH_3 eritmasi bilan peytrallanadi. So`ng unga 5 tomchi 1% li AgNO_3 eritmasi solinadi. 3 — 5 daqiqa o`tgach purin asoslarining Ag li birikmalari ipir — ipir cho`kmaga tushadi. Cho`kma qoramtilrusga kiradi.

1. Riboza va dezoksiribozaga Trommer reaksiyasi 5 tomchi gidrolizatga 10 tomchi 30% li NaOH na 1—3 tomchi 7% li CuSO_4 eritmasi solinadi. eritməlar aralashgirilib, uning yuqori qismi qizdiriladi. eritma qaynashi bilan qizil rangli Mis(I) oksid hosil bo`ladi. Bu cho`kma ribozaning oksidlanishi va Cu(OH)_2 ning qaytarilishi oqibatida CuO hosil bolishiga bog`liq.

1. Fosfor kislota molibden reaksiyasi. 5 tomchi gidrolizatga 20 tomchi molibden reaktividan solib, bir necha daqiqa alanga yuzasida qaynatiladi. Gidrolizat tarkibida fosfor kislota bo`lgani uchun eritma och sarik rangga kiradi. eritma sovitlganda esa ammoniy fosfor — molibden kompleks birikmasi cho`kmaga tushadi.

Olingan natijalar quyidagi jadvalga binoan rasmiylashtiriladi.

8-jadval

Reaksiya nomi	Ochiladigan birikma nomi	Ishlatilgan reaksiya	Reaksiya mahsuli

UGLEVODLARNING ORALIQ ALMASHINUVI

Glyukoza hayvon, odam va boshqa tirik organizmlarning to'qima holida hujayralarida asosan energetik ehtiyojlar uchun foydalilanligi sababli oraliq almashinuv protsessida anaerob va aerob sharoitlarda katabolitik parchalanishga uchraydi. Bu protsessning birinchi bosqichi anaerob sharoitda ketadi va glikoliz yoki bijg'ish deb yuritiladi. Bunda glyukoza pirouzum kislota va sut kislotagacha anaerob sharoitda parchalanadi, ya'ni bu reaksiyalar uchun kislород talab qilinmaydi. Pirouzum va sut kislotalar oraliq almashinuvning asosiy metabolitlari hisoblanadi. Shu mahsulotlarni va bu protsessda ishtirok etuvchi fermentlarni sifat va miqdor jihatdan aniqlash yo'li bilan to'qima va hujayralarda uglevodlarning anaerob parchalanish holati haqida xulosa chiqarish mumkin. Bu metabolitlar, keyingi bosqichlarda anaerob sharoitda hosil bo'lgan sut kislota qaytadan glikogen sinteziga surflancha, pirouzum kislota esa aerob sharoitda katabolizmning umumiyligi yo'li orqali **SO₂** bilan suvgacha oksidlanadi.

GLIKOGENOLIZ

Uglevodlar – glikogen va glyukoza tirik organizmlarning to'qima va hujayralarida anaerob sharoitda sut kislotagacha parchalanadi. Bu protsess glikogendan boshlansa, glikogenoliz, ya'ni bijg'ish deb ataladi.

Glikogenolizning energetik qiymati glyukozaning aerob oksidlanishiga nisbatan bir necha baravar kam bo'lsa-da, mikroorganizmlar, o'simlik, hayvon va odam organizmida ehtiyoja bog'liq ravishda katta tezlikda ketadi. Anaerob parchalanish o'simliklar to'qimalarining tashqi muhit bilan to'g'ridan-to'g'ri aloqada bo'lmaydigan qismlarida, odam qattiq jismoniy ish vaqtida kislород yetarli bo'lmay qolganligi sababli energetik ehtiyojni qoplash maqsadida foydalilanildi.

Glikogen fosforilaza ta'siridan fosfat kislota ishtirokida qaytarmaydigan chekkasidan (formulaning chap tomonidan) glyukoza-1-monofosfat ajratish yo'li bilan parchalanadi:

Hosil bo'lgan glyukozo-1-fosfatglyukomutaza va geksozomeraza fermentlari ta'sirida fruktozo-6-fosfatga aylanadi. Bu mahsulot fosfofruktokinaza va ATP

ta'sirida fruktozo-1,6-difosfatga; u esa aldolaza ta'sirida 2 ta fosfotrizoga parchalanadi:

Hosil bo'lgan 3-fosfoglitserin aldegid glitseraldegidfosfatdehidrogeneneza fermenti ta'sirida degidrogenlanadi. Bu bosqich energetik jihatdan ahamiyatli bo'lib, glikolitik oksidoreduktsiya deb ataladi. Bu vaqtida ferment bilan substrat orasida makroerg bog' hosil bo'ladi va fosfat kislota ishtirokida fosfatli makroer bog' tutgan substrat 1,3-difosfoglitserin kislota hosil bo'ladi:

Bu kislota fosfoglitseratkinaza fermenti ishtirokida ADF ni fosforlab, ATF ga aylantiradi. 3-fosfoglitserin kislota fosfoglitseromutaza ta'sirida 2 fosfoglitserin kislotaga aylanadi. Bu oraliq mahsulot yenolaza ta'sirida suv yo'qotadi, natijada fosfoefir bog' makroerg bog'ga aylanadi. Piruvatkinaza fermenti hosil bo'lgan fosfoenolpiruvatdagi makroerg fosfatni (ADF ni) fosforlash uchun sarflaydi va erkin piruvat hosil bo'ladi. Bu mahsulot anaerob sharoitda fosfoglitserinaldegididan ajralgan vodorodni laktatdehidrogenaza fermenti ta'sirida biriktirib sut kislotaga aylanadi:

1- TAJRIBA.

ACHITQIDAN NUKLEOPROTEINLARNI AJRATIB OLİSH VA GİDROLİZLASH.

Kerakli asbob va reaktivlar: chinni hovoncha, pipetka, laboratoriya sentrifugachi, sentrifuga tarozisi, shisha tayoqcha, 25-30 sm uzunlikdagi shisha nay yoki qaytar sovitgich, gaz garelka yoki spirit lampa, sentrifuga probirkalari, oddiy ximiyaviy probirkalar, efir (dietil efir), 5% li sirka kislota H_2SO_4 ning 10% li eritmasi, NaOH ning 0,4; 10; 30% li eritmalari, $CuSO_4$ ning 1; 7% li eritmasi, kontsentrlangan ammiak eritmasi, molibden reaktivi, toza qum, quritilgan achitqi.

Nukleoproteinlarning ximiyaviy tarkibini o'rganish uchun qulay ob'ekt achitqi hujayralari hisoblanadi. Quruq achitqi massasi yoki undan ajratib olingan nukleoproteinni sulvat kislota yordamida gidrolizlancha, polipeptidlarga, purin va pirimdin asoslariga uglevod komponentiga va fosfat kislotaga parchalanadi. Gidroliz mahsulotlarini spetsifik sifat reaksiyalar yordamida aniqlash mumkin. Nukleoproteidlar quyidagicha parchalanadi:

Polipeptidlar biuret reaksiyasi yordamida aniqlanadi. Purin asoslarini kumush oksidining ammiakli eritmasi, uglevodlarni Trommer yoki Feling reaktivlari, fosfat kislotani esa ammoniy molibdat yordamida aniqlash mumkin.

Ishning bajarilishi.

1-bosqich. Achitqidan nukleoproteidlarni ajratib olish.

CHinni hovonchaga 1 g achitqi solib, uning ustiga 1-2 tomchi efir, 4-5 tomchi suv tomiziladi va 0,2-0,4 g qum solinadi, so'ngra 1-2 minut tuyuladi. Shundan so'ng aralashma ustiga o'yuvchi natriyning 0,4% li eritmasidan 4 ml quyib, yana 5 minut tuyuladi. Hovonchadagi massa sentrifuga probirkachiga solinadi, ikkinchi shunday probirkaga suv qo'yib, sentrifuga tarozisida tenglashtiriladi va 10 minut sentrifugalanadi. Sentrifugat pipetka yordamida toza hovonchaga o'tkaziladi va shisha tayoqcha yordamida, aralshtirib turgan holda 5% li sirkal kislota eritmasidan 1,5 ml quyladi. Bunda nukleoproteid cho'kmasi hosil bo'ladi. Hovonchadagi aralashma pipetka yordamida sentrifuga probirkasiga o'tkaziladi va 10 minut sentrifugalanadi. Sentrifugat to'kib tashlanadi, nukleoprotein cho'kmasi esa gidrolizlanadi.

2-bosqich. Nukleoproteinlarni gidrolizlash.

Probirkaga nukleoprotein cho'kmasi (yoki 100 mg quritilgan achitqi) solinib, ustiga 10% li sulfat kislotasi eritmasidan 4 ml qo'yiladi. Probirkka og'zi sovitgich sifatida uzun rezina nay (25-30 sm) o'tkazilgan probka bilan berkitiladi va asbest to'rga qo'yib, kuchsiz alanga yoki elektr plitkasida qizdiriladi. Aralashma bir soat qaynatilgandan keyin qizdirish to'xtatiladi va sovitiladi, so'ngra filtrlanadi. Filtr bilan polipeptidlar, purin asoslariga, riboza va fosvat kislotaga xos quydagi reaksiyalar qilib ko'rildi:

a) *polipeptidlarga xos Biuret reaksiya.* Probirkaga 5 tomchi gidrolizat olib, unga 10% li o'yuvchi natriy eritmasidan 10 tomchi va 1% li mis (II) sulfat eritmasidan 1 tomchi qo'shib, chayqatiladi. Suyuqlik pushtibinafsha rangga bo'yaladi.

b) *purin asoslariga xos kumush bilan qilinadigan reaksiya.* 10 tomchi gidrolizatdan olib, uni kontsetrlangan amiakning 1 tomchisi bilan neytrallanadi va

unga 1% li kumush nitrat eritmasidan 5 tomchi qo'shiladi. 3-4 minutdan keyin purin asoslarining kumushli qoramtil cho'kmasi paydo bo'ladi.

v) *riboza va dezoksiribozaga xos Trommer reaksiyasi.* 5 tomchi gidrolizat olib unga 30% li NaOH eritmasidan 10 tomchi qo'shib, mis (II) gidroksid loyqasi hosil bo'lguncha 7% li mis (II) sulfat eritmasidan tomiziladi. Suyuqlikni aralashtirib, qaynaguncha qizdiriladi. Riboza yoki dezoksiribozaga mis (II) oksidini qizil rangli mis (I) oksidiga qaytarganligi uchun qizg'ish loyqa hosil qiladi.

g) *fosfat kislotaga xos molibden bilan qilinadigan reaksiya.* 20 tomchi molibden reaktiviga 2-3 tomchi gidrolizat qo'shib, bir necha minut qizdiriladi. Agar gidrolizatda fosfat kislota bo'lsa, suyuqlik limon sarig'i rangiga kiradi. Sovitilganda sariq kristall cho'kma paydo bo'ladi.

2 – TAJRIBA.

HAYVON TO'QIMALARIDAGI DNK MIQDORINI ANIQLASH.

Kerakli asbob va reaktivlar: laboratoriya sentrifugasi, suv hammomi, shisha tayoqcha, Keldal kolbasi, 50 ml li o'lchov tsilindri, darajalangan o'lchov probirkasi, fotoelektrokolorimetr, probirka, shtativ, muz hammomi, NaOH ning 1 n eritmasi, NaCl ning 20% li sirka kislotadagi to'yigan eritmasi, etil spirt, trixlor sirkaning 5% li eritmasi, kontsentrlangan sulfat kislota, 30% li vodorod peroksid, NaOH ning 30% li eritmasi, universal indikator qog'oz; ammoniy molibdatning 5% li eritmasi, hidroxinonning 1% di eritmasi, karbonat sulfat aralashmasi, tarkibida 1 mkg/ml fosfor bor KH_2PO_4 ning standart eritmasi, jigar yoki taloq, perxlorat kislotaning 0,5 n eritmasi, Dishe reaktivi, 0,2 mg/ml kontsentratsiyali dezoksiribozaning standart eritmasi.

DNK A.S.Orlov va Ye.I.Orlova usuli bo'yicha miqdoriy jihatdan aniqlanadi. Bu usulning mohiyati shundaki, tekshiriladigan to'qima ishqoriy muhitda hidrolizlangandan keyin, NaCl ning sirka kislotadagi to'yigan eritmasi quyilganda oqsillar cho'kib, eritmada DNK va tarkibida fosfor bor boshqa moddalar qoladi. Dnk ni boshqa fosforli birikmalardan spirt yordamida cho'ktirib, ajratib olinadi.

To'qimadagi DNK miqdorini, undagi fosfor yoki dezoksiribozaga qarab aniqlash mumkin.

Ishning bajarilishi.

1-bosqich. Jigar yoki qora taloqni ishqor ta'sirida gidrolizlash.

100 mg to'qima sentrifuga probirkasiga solinib, uning ustiga 1 ml 1 n NaOH eritmasidan quyib, qaynab turgan suv hammomiga 15 minut quyiladi. Vaqt vaqt bilan probirkadagi aralashma shisha tayoqchya bilan aralashtirib turiladi. Shu vaqt ichida to'qima to'la erib ketadi.

2-bosqich. Oqsillar va DNK ni cho'ktirish.

Gidrolizat asta-sekin avvalo xona temperaturasigacha, so'ngra muz yordamida 00S gacha sovitiladi. Uning ustiga NaCl ning 20% li sirka kislotadagi to'yingan eritmasidan 0,5 ml qo'shib, oqsil cho'ktiriladi. 5 minutdan keyin aralashma 5 minut minutiga 3000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi.

Sentrifuga probirkalaridan biriga 6 ml etil spirt qo'yib, sovitib qo'yiladi. Sovitilgan spirt ustiga sentrifugat (cho'kma ustidagi suyuqlik) qo'yiladi: bu vaqtida DNK cho'kadi, RNK va tarkibida fosfor bor boshqa birikmalar spirtli eritmada qoladi. DNK ni to'laroq cho'ktirish uchun, sentrifugalanganda olingan oqsil cho'kmasini 1 ml 1 n li NaOH da (sovitilgan) eritiladi va tezda NaCl ning 20% li sirka kislotadagi to'yingan eritmasidan 0,5 mo qo'shib, qaytadan cho'ktiriladi. Aralashma 5 minut minutiga 5000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi. Sentrifugat birinchi DNK cho'ktirilgan spirli aralashmaga qo'yiladi. Probirkadagi suyuqlik yaxshilab aralashtirilgach, DNK ni to'laroq cho'ktirish uchun muz hammomiga 1 soat qoldiriladi. Bir soatdan keyin probirkadagi aralashma 5 minut yuqori tezlikda-minutiga 5000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi; sentrifugat to'kib tashlanadi. DNK cho'kmasi esa 2 marta 5% li trixlorsirka kislota bilan yuviladi. DNK miqdorini uning tarkibidagi fosforga yoki dezoksiribozaga qarab aniqlash mumkin.

3-bosqich. DNK ni fosfor bo'yicha miqdoriy aniqlash.

Ajratib olingan DNK kuydirilganda (minerallashtirish) fosfat erkin holatda ajraladi.

Qaytaruvchi ishtirokida fosfatni ammoniy molibdat bilan reaksiyasida hosil bo'lgan molibden ko'kini kolorimetrik aniqlash mumkin, chunki rangning ravshanlik darajasi fosfor miqdoriga bog'liq bo'ladi. Trixlor sirka kislota bilan yuvilgan DNK batamom Keldal kolbasiga o'tkazilib, ustiga 1,5 ml kontsentrlangan sulfat kislota qo'shiladi va tiniq suyuqlik hosil bo'lguncha minerallashtiriladi. DNK ni kuydirishni tezlashtirish uchun 30% li vodorod peroksid qo'shiladi. Minerallashtirish tugagndan keyin Keldal kolbasidagi suyuqlik konussimon kolbaga o'tkazilib, 30% li NaOH eritmasi yordamida (universal indikator bo'yicha) neytrallanadi. So'ngra suyuqlik 50 ml li o'lchov kolbasiga o'tkaziladi va belgi chiziqqacha distillangan suv qo'yib, hajmi 50 ml ga yetkaziladi.

Kolbadan 5 ml suyuqlik olib, 10 ml li darajalarga bo'lingan o'lchov probirkaga quyiladi, unga 5% li ammoniy molibdat eritmasidan 0,5 ml va 1% li gidroxinon eritmsidan 0,5 ml qo'shiladi. 5 minutdan keyin probirkaga 2 ml karbonat-sulfit aralashmasidan qo'shib, suv bilan umumiy hajm 10 ml ga yetkaziladi.

10 minutdan keyin rangli eritmaning optik zichligi fotoelektrokolorimetrda qitzil-svetofiltrda (600 nm) aniqlaniladi. Optik zichligi aniqlangach tekshirilayotgan ob'ektdagi fosforning miqrorini kalibrlash egri chizig'i yordamida hisoblab topish mumkin.

Kalibrler egri chizig'i chizish uchun 1 ml eritmada 1; 2; 3; 4 mkg fosfor bo'ladigan KH_2PO_4 ning standart eritmalarini tayyorlanadi. Shu standart eritmalar bilan yuqoridagi rangli reaksiya qilinib, ularning optik zichligi FEK da aniqlanadi. Absissa o'qiga standart eritmalarning kontsentratsiyasi, ordinata o'qiga optik zichlik (FEK ko'rsatkichi) qo'yiladi.

Tekshirilayotgan obektdan fosforga qarab DNK miqdorini quyidagi formula yordamida hisoblab topish mumkin:

$$x = \frac{a \cdot 50 \cdot 10,1}{5}$$

bu yerda: a-kalibrlash egri chizig'i asosida topilgan fosfor miqdori (mkg); 50-minerallashtirilgan DNK ning umumiy hajmi (ml); 10,1-fosfor miqdorini DNK ga o'tkazish uchun koeffitsient; 5-rangli reaksiya uchun olingan gidrolizat.

4-bosqich. DNK miqdorini dezoksiribozaga xos rangli reaksiya asosida aniqlash.

Trixlorsirka kislota bilan yuvilgan DNK cho'kmasiga 0,5 n NaOH eritmasidan 0,5 ml qo'yib, probirka og'zini uzun gaz o'tkazgich shisha naycha o'matilgan probirka (havo sovitkichi) bilan berkitib, qaynab turgan suv hammomiga 20 minut quyiladi. Sovitilgan gidrolizatdan 2 ml olib, uning ustiga 4 ml Dishe reaktivi qo'shiladi. Aralashma qaynab turgan suv hammomida 10 minut qizdiriladi, so'ngra sovitiladi. Aralashma barqaror ko'k rangga bo'yaladi. Rangning ravshanlik darajasi FEK da, qizil svetofiltr (600 nm) yordamida aniqlanadi. Zarurat bo'lsa, gidrolizat Dishe reaktivi –suv (2:1 nisbatdagi) bilan suyultiriladi. To'qimadagi DNK miqdori dezoksiriboza asosida tayyorlangan kalibrash egri chizig'idan foydalanib, hisoblab topiladi.

Dezoksiriboza uchun kalibrash egri chizig'i quyidagicha chiziladi: avval 1 ml da 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mg dezoesiriboza bor standart eritmalar seriyasi tayyorlanib, Dishe reaktivi bilan rangli reaksiya qilinadi. Aralashma rangining ravshanlik darajasi FEK da aniqlanib optik zichligi ordinata o'qiga, dezoksiriboza miqdori absissa o'qiga qo'yib chiqiladi va grafik chiziladi..

3-TAJRIBA.

DNKNI HAYVON TO'QIMASIDAN AJRATIB OLİSH VA TOZALASH.

Kerakli asbob va reaktivlar: gomogenizator, 37°C li termostat, texnik tarozi, 50 va 500 ml li o'lchov tsilindrлari, laboratoriya sentrifugasi, 20 va 50 ml li shprits, 50; 200; 500 ml li stakanlar, shisha tayoqcha, tuzli eritma (tarkibi: 0,15M natriy tsitrat 0,01 M EDTA), xloroform, izoamil spirt, etil spirt, perxlorat kislotaning 57% li eritmasi, etil efir, NaOH ning 0,5 n eritmasi, KOH ning 1 n va 5 n eritmalar, dodentsilsulfatning 20% li eritmasi, NaCl ning 5 m eritmasi, muskul yoki jigar.

Dezoksiribonuklein kislota (DNK) o'simlik, hayvon va mikroorganizmlar hujayralarida asosan yadroda, juda oz miqdorda, tsitoplazmada oqsil bilan bog'langan holatda bo'ladi. DNK ni ajratib olish uchun, uni oqsildan ajratish, turli biologik

membranalardan tozalash zarur. DNK ni hujayradan ajratib olishda (u RNK bilan aralash holatda bo'ladi), avval uni RNK dan tozalab, so'ngra quritiladi.

Ishning bajarilishi.

20 g hayvon to'qimasi (jigar, bo'qoq bezi) 100 ml tuz eritmasi bilan shisha gomogenizatorda maydalanyadi. Olingan gomogenatga oxirgi kontsentratsiyasi 2% bo'lguncha 20% li dodetsilsulfat (10-12 ml) qo'shiladi va 37°C li termostatga yarim soat qo'yiladi. Hosil bo'lgan yopishqoq eritmaga nukleoproteidlarni dissotsilash uchun oxirgi kontsentratsiyasi 1 m bo'lguncha 5 m NaCl eritmasidan (25-26 ml) qo'shiladi. Gomogenat shliflangan qopqoqli kolbaga o'tqazilib, ustiga 24:1 nisbatdagi xloroform izoamil spirt aralashmasidan 400 ml qo'shib, 10-15 minut yaxshilab, chayqatiladi. Aralashma 50 ml li sentrifuga probirkalariga quyilib, 30 minut 2500 ayl/min tezlikda sentrifugalanadi. Bu vaqtida sentrifugat 3 ta fraktsiyaga bo'linadi: yuqori qavatda nuklein kislotalar, o'rta qavatda oqsillar, eng pastki qavatda-xloroformli fraktsiyada lipidlar va organik erituvchida eriydigan boshqa komponentlar qoladi.

Shprits yordamida yuqoriga fraktsiya so'rib olinadi va uni eritma tiniqlashguncha xloroform-izoamil spirt bilan ishlash 2-3 marta takrorlanadi. Tarkibida nuklein kislota bor suvli qavatlar birlashtirilib, ikki baravar ko'p miqdorda 96% li etil spirt quyilgan stakanga doimo aylanasisiga aralashtirib turgan holatda, astasekin quyiladi. Natijada nuklein kislotalarning' oq spiralsimon cho'kmasi hosil bo'ladi. So'ngra spiralsimon DNK shisha tayoqcha yordamida oz miqdorda 70% li etanol quyilgan stakanga o'tkaziladi. Bu operatsiya 2-3 marta takrorlanadi. So'ngra nuklein kislotalar cho'kmasi spirt-efir (1:1) aralashmasi va efir bilan yuvilgach, xona temperaturasida quritish uchun qoldiriladi.

DNK va RNK ajratish uchun 10-15 mg quruq nuklein kislota preparati 5 ml 0,5 n NaOH da eritilib, 37°C li termostataga 18 soat qo'yiladi. Eritma sovitiladi va 57% li perxlorat kislota (HClO_4) yordamida neytrallanadi, so'ngra HClO_4 kontsentratsiyasi 2% ga yetkuncha kislota qo'shish davom ettiriladi. Hosil bo'lgan DNK cho'kmasi sovitkichli sentrifugada 10 minut 3000 ayl/min (3000g) tezlikda sentrifugalash yo'lli bilan ajratib olinadi. Olingan DNK cho'kmasi ikki marta 2% li HClO_4 2 marta 7% li

spirit, spirit-efir (1:1) aralashmasi va nihoyat, efir bilan yuviladi. Har safar DNK cho'kmasi sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi, so'ngra DNK cho'kmasi havoda quritiladi.

4-TAJRIBA.

O'simlik to'qimalaridan DNK ni ajratib olish.

Kerakli asbob va reaktivlar: chayqatgich apparat, sovitgichli sentrifuga, ajratgich voronka, pH metr LPU-0,1, 100; 200 ml li o'lchov tsilindrlari, shlifli, qopqoqli kolba, pipetka, hovoncha, probirkta, 37°C li termostat, «a» eritma-tarkibida 0,1 M EDTA, 1M dodentsilsulfat (DDS) bor, natriy xlорidning 0,15 M eritmasi ($rN=7,0$), «b» eritma tarkibida 0,1 M EDTA, 2% DDS bor, natriy xlорidning 0,15 M eritmasi ($rN=6,0$), «v» eritma tarkibida 0,1 M EDTA, 5% DDS bor, natriy xlорidning 0,15 M eritmasi ($rN=8,0$), 96% li etanol, 78% li etanol, suvga to'yintirilgan fenol, fenol-xloroformning 1:1 nisbatdagi aralashmasi, NaCl ning 0,15 M va 0,015 M eritmalari, papain (tarkibida 0,005 M EDTA bor 88 mkg/ml eritma, $rN=6,5$), tripsin (1 mkg/ml, $rN=7,2$), pronaza (500 mkg/ml, pH=8,0), tripsin (375 mkg/mo); papain (50 mkg/ml), RNK-aza (50 mk/ml), tarkibida 1,5 M natriy sitrat bor 0,015 M NaCl eritmasi, tarkibida 0,001 M EDTA bo'lgan natriy atsetatning 3 M eritmasi, propanol.

O'simlik to'qimalaridan DNK ni ajratib olishda tekshiriladigan ob'ektlarni gomogenizatsiyalash, eritmadan nukleoproteinni ekstraktsiyalash, olingan preparatni oqsilsizlantirishda qo'llaniladigan usullarni tanlash katta ahamiyatga ega. quyida o'simlik materiallaridan yuqori molekulyar DNK ajratib olishning optimal varianti keltirilgan.

Ishning bajarilishi. Suyuq azotda fiksatsiya qilingan 100 g piyozning meristema to'qimasini hovonchada bir xildagi mayin kukun hosil bo'lguncha maydalab, uning ustiga tarkibida 1 ml fenol bo'lgan 100 ml eritma qo'shiladi va yana bir xil massa hosil bo'lguncha maydalanadi. Hosil bo'lgan gomogenat 100 ml fenol bilan chayqatiladi. Tayyor bo'lgan aralashma 0°C da 20 minut 6000 ayl/min (10000 g) tezlikda sentrifugalanadi. Bu vaqt sentrifuga probirkasida 3 ta qavat hosil bo'ladi; probirkta tubida fenol, uning o'rta qismi oqsil va maydalangan o'simlik to'qimalari, yuqori qismi esa tarkibida DNK bor suvli qavat, o'rta qavat olinib, «a» eritma bilan

yuqoridagidek ekstraktsiya qilinadi. Bu operatsiya suv qavatida DNK qolmaguncha davom ettiriladi. Shundan keyin o'simlik to'qimasining qoldig'i «b» va «v» eritmalari bilan yuqoridagicha yana ekstraktsiya qilinadi. Eritmadagi DNK ma'lum miqdordagi ekstraktga 96% li spirt quyilganda cho'kma hosil bo'l shiga qarab aniqlanadi.

Oqsilsizlantirish. Olingan DNK ekstraktini oqsilsizlantirish quyidagicha olib boriladi. Ekstraktga teng miqdorda xloroform-fenol (1:1) aralashmasini quyib, 20 minut chayqatiladi, so'ngra yuqoridagi sharoitda sentrifugalanadi. Sentrifugatning suvli qavatini ajratib olib, unga ikki hajm 96% li etanol qo'shib, DNK cho'ktiriladi. Cho'kmada fenol va DDS ni yo'qotish uchun 5-7 marta 70% li etanol bilan yuviladi. Cho'kma 0,15 m NaCl da eritilgach, quyidagi usullarning biri yordamida oqsilsizlantiriladi:

1) papain (800 mkg/ml)+0,005 m EDTA ($rN=6,5$) bilan 37°C da 2 soat davomida inkubatsiya qilish;

2) tripsin (1 mkg/ml) bilan ($rN=7,2$) 37°C da 1 soat davomida inkubatsiya qilish;

3) pronaza (500 mkg/ml) bilan ($rN=8,0$) da xona temperaturasida bir sutka davomida inkubatsiya qilish;

4) 1 soat 37°C da tripsin (375 mkg/ml) bilan inkubatsiya qilish, so'ngra yuqoridagidek xloroform-fenol aralashmasi bilan ishlash. Shundan so'ng eritmada DNK 96% li etil spirt yordamida cho'ktiriladi. Buning uchun aralashmaga 1:2 nisbatda etil spirt qo'shiladi.

5) olingan cho'kma 5-7 marta 70% li etanol bilan yuviladi. DNK cho'kmasi bufer eritmada eritiladi va papain bilan (50 mkg/ml) 37°C da 1 soat inkubatsiya qilinadi.

Eritmadagi DNK 96% li etanolda cho'ktirilgach, 0,15 m natriy xloridda eritiladi.

RNK va polisaxaridlardan tozalash. Buning uchun DNK eritmasining pH ko'rsatkichi HCl yordamida 5,0 ga keltiriladi. RNK-aza eritmasidan oz miqdordagi DNK-aza aralashmasini yo'qotish uchun dastlab 10 minut 80°C da qizdiriladi.

So'ngra DNK eritmasi RNK-aza bilan (50 mkg/ml) 37°C da 1 soat inkubatsiya qilinadi. Shundan keyin DNK eritmasi yana fenol-xloroform aralashmasi bilan yuqoridagidek ishlanadi va DNK 1:2 hajmdagi etanol bilan cho'ktiriladi. D NK cho'kmasi tarkibida 1,5 mm natriy tsitrat bo'lgan 0,015 M natriy xlorid eritmasida eritiladi va unga tarkibida 0,001 M EDTA bo'lgan 3 M ($rN=7,0$) natriy atsetat (1:10) qo'shiladi. Olingan eritmaga doimo aralashtirib turgan holda tomchilatib 0,5-0,54 hajm izopropanol qo'shiladi. Bu vaqtda faqat D NK cho'kib, RNK parchalanadi va polisaxaridlar eritmada qoladi. D NK cho'kmasi 70% li etanolda 5°C da saqlanadi. Ajratib olingan D NK preparatlarining xossasiga qaraganda pronaza yordamida oqsilsizlantirish eng optimal variant hisoblanadi. 9-jadvalda ajratib olingan D NK ning fizik-ximiyaviy xossalari keltirilgan.

9-jadval

Nº	Oqsilsizlantiruvchi agent	Sedimentatsion konstanta, (S)	Oqsil miqdori, (%)	Giperxrom effekti, (%)
1	Papain	21,2	3,0	24,0
2	Tripsin	26,8	2,1	25,0
3	Pronaza	27,5	0,93	33,3
4	Tripsin i papain	21,7	1,5	24,0

5-TAJRIBA.

D NK ning nukleotid tarkibini aniqlash.

Kerakli asbob va reaktivlar: vakuum eksikator; ampula, laboratoriya sentrifugasi, sentrifuga probirkasi, «M» tipdagi Leningrad xromatografiya qog'oz, ultraxemiskop, spektrofotometr, xromatografiya kamerasi, 37°C li termostat, perxlorat kislötaning 56% li yoki 70% li eritmasi, KON ning 4 M eritmasi, kontsentrlangan HCl, HCl ning 0,1 n eritmasi, D NK preparati, 36% li etil spirni erituvchi sistema-n-butanol-N2O –kontsentrlangan ammiyak-60:10:0,1.

Dezoksiribonuklein kislötaning nukleotid tarkibini aniqlash uchun avval toza D NK perxlorat kislota ta'sirida gidrolizlanadi, so'ngra gidrolizatdagi nukleotidlar

kolonkali, qog'oz xromatografiyasi yoki elektroforetik usullar yordamida ajratiladi va nukletidlar miqdori spektrotometrik usulda aniqlanadi.

1-tajriba. DNK nukleotid tarkibini qog'oz xromatografiya usulida aniqlash.

Ishning bajarilishi. 200-500 mg hayvon to'qimasidan ajratib olingan DNK preparati 2 marta 36% li etil spirtda yuvilgach, vakuum eksikatorda quritiladi. Quritilgan DNK 1-2 tomchi 70% li (yoki 56% li) perxlorat kislota eritmasida namlanadi va kavsharlangan ampulada, qaynab turgan suv hammomida 1 soat (agar 56% li perxlorat kislota ishlatsila, ikki soat) gidrolizlanadi. Bunday sharoitda DNK erkin asoslargacha gidrolizlanadi. Ampula ochilib, gidrolizat kapilyar yordamida sentrifuga proirkasiga o'tkaziladi. Ampula devori juda oz miqdordagi distillangan suv bilan chayqaladi. Chayindi ham sentrifuga probirkasiga quylidi. Gidrolizat quylgan probirkaga avval 2 tomchi 4 M kaliy gidroksid, so'ngra neytrallanguncha tomchilatib 1 M o'yuvchi kaliy eritmasi qo'shiladi. Shundan keyin kapillyar yordamida 1 tomchi kontsentrlangan xlorid kislota tomizib, 10 minut 2000-3000 ayl/min tezlikda sentrifugat keyingi xromatografik analiz uchun ishlataladi.

2-tajriba. DNK gidrolizatini qog'oz xromatografiya usulida analiz qilish.

Gidrolizatni tarkibiy qismlarga ajratish uchun ishqoriy muhitli erituvchi sistema: n-butanol-suv-kontsentrlangan ammiak (60:10:0,1 nisbatda) ishlataladi. Pastga oquvchi xromatografiya uchun «Leningradskaya medlennaya» («M») tipidagi qog'ozdan foydalilanadi. «Guvoh» modda sifatida 25-50 nonamol miqdorda nuklein kislota tarkibiga kiruvchi purin va piramidin asoslar tomiziladi. Tekshirilayotgan gidrolizatlar xromatogrammaga 0,05-0,1 ml hajmda tomiziladi, bu bitta dog'dagi «guvoh» modda sifatida tomizilgan asoslar miqdoriga to'g'ri keladi. Xromatografik ajralish protsessi 20-40 soat davom etadi. Azotli asoslarning qog'ozdagi lokalizatsiyasi ultraxemiskopda aniqlanadi. Asoslar start chizig'idan boshlab quyidagi tartibda joylashadi: guanin, tsitozin, 5-metiltsitozin, adenin, timin. Gidrolizatdagi asoslarni miqdoriy jihatdan aniqlash uchun xromatogrammadagi ultraxemiskop yordamida chegaralangan zonalar qirqib olinib 5 ml 0,1 n HCl eritmasida 37°C da, 12 soat davomida elyutsiya qilinadi. Kontrol sifatida qog'ozning azot asoslari tarqalmagan qismi qirqib olinib, bir xil sharoitda elyutsiya qilinadi.

Elyuatlarning optik zichligi spektrofotometrning 1 sm li kyuvetalarida kontrolga qarshi quyidagi jadvalda berilgan to'lqin uzunliklarda aniqlanildi:

10-jadval

Asoslar	To'lqin uzunligi	Hisoblash uchun koefitsient
Guanin	250-290	0,714
Adenin	250-290	0,399
Tsitozin	270-290	0,940
5-metiltsitozin	280-300	0,893
Timin	260-290	0,743

Hisoblash uchun 10-jadval asosida optik zichlik ayirmasi, masalan, adenin uchun $D = D_{260} - D_{290}$ topilib, bu miqdorni hisoblash koefitsientiga ko'paytirilsa, 5 ml elyuatdagi asosning mikromol miqdori kelib chiqadi.

6-TAJRIBA.

Qon zardobi va siydkdag'i urat kislota miqdorini aniqlash.

Kerakli asbob va reaktivlar: sentrifuga, 10; 25 ml li o'lchov tsilindri, 2,10 ml li pipetkalar, FEK, trixlor sirkal kislotaning 10% li eritmasi, qon zardobi, urat kislotaning standart eritmasi, natriy karbonatning to'yingan eritmasi, Folin reaktivi.

Urat kislota fosforvolframat reaktivini qaytaradi, natijada ko'k rangli volfram oksidlari hosil bo'ladi. Rangning ravshanlik darajasi urat kislota kontsentratsiyasiga to'g'ri proportional.

I-tajriba. Qondagi urat kislotani aniqlash.

Ishning bajarilishi. Oqsilni cho'ktirish uchun sentrifuga probirkasiga 1,5 ml qon zardobi quyib, teng miqdorda 10% li trixlor sirkal kislota va 1,5 ml distillangan suv qo'shiladi. 10 minutdan keyin 15 minut 3000 ayl/min tezlikda sentrifugalanadi. So'ngra 2 ta o'lchov tsilindri olib, ularning biriga 1,5 ml sentrifugat, ikkinchisiga kontrpol sifatida 1,5 ml suv quyiladi va tsilindrarda natriy karbonatning to'yingan eritmasidan 0,7 ml va Folin reaktividan 0,05 ml qo'shiladi. Bunda sentrifugatli aralashma ko'karadi. Suyuqlikning hajmi 10 ml ga yetkazilib, qizil svetofiltrda FEK ning o'ng barabanidan foydalanim, kolorimetrlanadi. Hisoblash avval chizilgan

kalibrlash egri chizig'i asosida olib boriladi. Egri chiziq asosida topilgan qiymat 3 ga (suyultirish darajasi) va protsent qiymatini topish uchun 100 ga ko'paytiriladi.

Kalibrlash egri chizig'i chizish uchun turli kontsentratsiyali urat kislotaning standart eritmalari tayyorlanadi. Ish standart eritmani (0,02 mg/ml) tayyorlash uchun urat kislotaning asosiy standart eritmasidan (20 mg) 5 ml olib 10 marta, ya'ni hajmi 50 ml ga yetguncha suyultiriladi. 7 ta nomerlangan probirka olib, ularga 11-jadvalda keltirilgan miqdorlarda reaktivlar qo'shiladi.

11-jadval

Kerakli reaktivlar	Probirkalar nomeri va urat kislota kontsentrasiyasi						
	1	2	3	4	5	6	7
Urat kislotaning ish standart eritmasi, (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2
Probirkalardagi urat kislota miqdori, (mkg)	2	4	8	12	16	20	40
Natriy karbonatning to'yingan eritmasi, (ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Folin reaktivi, (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Distillangan suv, (ml)	9,15	9,05	8,85	8,65	8,45	8,25	7,25

Rang ravshanlik darajasi yuqoridagidek qizil svetofiltrda, 10 ml li kyuvetada, FEK ning o'ng barabanidan foydalanib kolorimetrlanadi. Kontrol eritma sifatida alohida probirkaga 0,7 ml natriy karbonatning to'yingan eritmasi, 0,05 ml Folin reaktivi va 9,25 ml distillangan suv qo'yiladi.

Abssissa o'qiga urat kislotaning kontsentrasiyasi, ordinata o'qiga optik zichlik qo'yilib, egri chiziq chiziladi. Olingan grafik kalibrash egri chizig'i vazifasini o'taydi.

2-tajriba. Siydikdag'i urat kislota miqdorini aniqlash.

Siydikdag'i urat kislotani aniqlashda siydik avval 50 marta suyultirilishi kerak. 2 ta probirka olinib, ulardan biriga 1,5 ml distillangan suv, ikkinchisiga 1,5 ml suyultirilgan siydik qo'yiladi. Har ikkala probirkaga natriy karbonatning to'yingan

eritmasidan 0,7 ml dan va Folin reaktividan 0,05 ml dan quyiladi. So'ngra suyuqlik hajmi 10 ml ga yetkaziladi va FEK da qizil svetofiltrdan foydalanib kolorimetrlanadi.

Siydikdagি urat kislota miqdori quyidagi formula asosida hisoblab topiladi:

$$C = \frac{a \cdot b \cdot v}{1,5 \cdot 1000}$$

bu yerda: S-siydik bilan ajaralayotgan urat kislotaning milligramm miqdori, a-kalibrlash egri chizig'i bo'yicha topilgan urat kislotaning mikrogramm miqdori, b-siydikning suyultirilish darjasи; v-sutkalik siydikning millilitr miqdori; 1,5-analiz uchun olingan siydikning miqdori; 1000-mikrogrammni milligrammga aylantirish uchun koeffitsient.

7-TAJRIBA.

Spirtli bijg'ish.

Kerakli asbob va reaktivlar: bijg'ituvchi nay, hovoncha, termostat, 50 ml li o'lchov tsilindri, voronka, filtr qog'oz, glyukozaning 5% li eritmasi, o'yuvchi natriyning 10% li eritmasi, Lyugol eritmasi.

Glyukozaning anaerob parchalanishi barcha tirik organizmlarda pirouzum kislota hosil bo'lguncha asosan bir yo'nالishda ketadi. Hosil bo'lgan pirouzum kislota odam, hayvon va o'simlik organizmida sut kislotaga aylansa, ko'pchilik mikroorganizmlarda, masalan, pivo achitqisida avval yuqori aktivlikka ega bo'lgan dekarboksilaza fermenti ta'sirida dekarboksilanib, sırka aldegilga aylanadi. Hosil bo'lgan oraliq mahsulot alkogoldegidrogenaza fermenti ta'sirida NADN·H⁺ ishtirokida qaytarilib, etil spirtga aylanadi:

Spirtli bijg'ishning oxirgi mahsulotlarini oddiy ximiyaviy reaksiya yordamida aniqlash mumkin. Bijg'ish protsessi bijg'ituvchi trubkada olib boriladi. Bijg'ish protsessida hosil bo'lgan SO₂ ni aniqlash uchun trubkaga ma'lum miqdorda ishqor quyib, trubka og'zi berkitilsa, karbonat angidrid natriy gidroksid bilan reaksiyaga kirishgani uchun vakuum hosil bo'ladi. Spirtni aniqlashda esa yodoform hosil bo'lish reaksiyasidan foydalaniladi:



Ishning bajarilishi. 1 g achitqi 25-30 ml 5% li glyukoza yoki saxaroza eritmasi bilan chinni hovonchada bir xil massa hosil bo'lguncha maydalanadi, tayyor bo'lgan aralashma bijg'ituvchi trubkaning boshi berg qismi to'lguncha quyiladi, kengaygan qismi ochiq qolishi kerak. so'ngra trubka 37°C li termostatga 30-60 minut qo'yiladi va vaqtı-vaqtı bilan kuzatib turiladi. Bijg'ituvchi trubkaning berk tomoni yarmiga qadar gaz bilan to'lgandan keyin, termostatdan olinadi.

CO_2 hosil bo'lganligini aniqlash. Ajralib chiqqan gaz karbonat angidrid ekanligini aniqlash uchun trubkaning kengaygan qismi 10% li o'yuvchi natriy eritmasi bilan to'ldiriladi va trubka og'zini barmoq bilan berkitgan holda yaxshilab chayqatiladi. SO_2 ishqor bilan shiddatli reaksiyaga kirganligi sababli, trubkada vakuum paydo bo'lib barmoqni so'radi.

Etil spirt hosil bo'lganligini aniqlash. Bijg'ituvchi trubkadagi aralashma filtrlanib, filtrtdan probkaga tomchi eritma quyiladi, uning ustiga shuncha miqdorda lyugol eritmasidan qo'shiladi. Hosil bo'lgan aralashma bir oz qizdirilsa, yodoformga xos hid seziladi.

LIPIDLAR ALMASHINUVI

Lipidlар eng kontsentrlangan energiya manbai bo'lib, odam va hayvonlar energetik ehtiyojining 1/3 dan yarmigacha bo'lган qismi yog' va yog'simon muddalarning oksidlanishi hisobiga qoplanadi. Tirik organizm o'zining normal rivojlanishi uchun ovqatning muhim tarkibiy qismlari-vitaminlar, to'yinmagan yog' kislotalarini asosan lipidlar bilan birgalikda oladi. Lipidlар biologik manbalar strukturaviy tarkibiy qismlarining asosini tashkil qiladi. Ular gidrofob xossaga ega bo'lганligi uchun organizmda bo'kmaydi, kam hajmni egallaydi, shu sababli rezerv energetik material sifatida to'planadi.

Lipidlар organizmda eng harakatchan muddalar bo'lib, hujayra, to'qima yoki butun organizm ehtiyojiga bog'liq ravishda parchalanib yoki sintezlanib turadi.

O'simliklarda, shuningdek hayvon va odamlarda ham yog'lar asosan uglevoddan hosil bo'ladi. Yog'larning to'planishi uglevodlarning kamayishiga olib

keladi. Masalan, yong'oqning pishib yetilmagan mevalarida 3% yog', 21% kraxmal, pishganlarida esa 62% yog', 2,6% kraxmal topilgan.

Hozirgi kunda lipidlarning yangi gruppasi-prostaglandinlar organizmda endokrin bezlari funktsiyasini, nerv, yurak-tomir va ovqat hazm qilish sistemasi faoliyatini boshqaqrishi ma'lum.

YOG'LARNING PARCHALANISHI VA HAZM BO'LISHI

Odam va hayvonlar organizmiga ovqat bilan tushgan lipidlarning assimilyatsiyasi ularning ovqat hazm qilish sistemasida parchalanib so'rilihidan boshlanadi. Hazm shirasidagi lipolitik fermentlar faqat emulgirlangan yog'larni parchalaydi.

Yog'larning parchalanishi va so'rilihida o't suyuqligining ahamiyati katta. U yog'larni emulsiya holatiga o'tkazadi, oshqozon osti bezi lipazasini aktivlaydi, gidroliz natijasida hosil bo'lgan yuqori yog' kislotalari bilan suvda eriydigan kompleks hosil qilib, ularning oson so'rilihini ta'minlaydi.

1 – TAJRIBA.

YOG'LARNI EMULSIYA HOLATIGA O'TKAZISH.

Kerakli asbob va reaktivlar: probirkalar, 1ml li pipetka, letsitin, oqsilning 10% li eritmasi, natriy karbonatning 10% li eritmasi, sovunning 1% li eritmasi, paxta moyi.

Yog'larni sirt aktiv moddalar-ishqor, ishqoriy reaksiya beruvchi tuzlar-sovun, soda, fosfat tuzlari, oqsil, fosfatidlar, o't kislota tuzlar emulsiyaga aylantiradi. Bu moddalar mayda-mayda yog' parchalarining atrofini yupqa parda ko'rinishida o'rabi, shu orqali ularni qaytadan birikishiga yo'l qo'ymaydi.

Ishning bajarilishi. 6 ta probirka olib, ularning birinchisiga 1 ml distillangan suv, ikkinchisiga ozgina letsitin, uchinchisiga 1 ml o't suyuqligi, to'rtinchisiga 1 ml natriy karbonat, beshinchisiga 1 ml sovun, oltinchisiga shuncha miqdorda oqsil eritmasidan quyib, probirkalarning hammasiga 2-3 tomchidan paxta moyi tomizilgach, ulardag'i aralashmani yaxshilab chayqatiladi. So'ng probirkalarda emulsiya hosil bo'lishi kuzatiladi.

O'simlik xomashyosi asosidagi preparatlarning zamonaviy

YUQX bilan analiz qilish

Odatda YUQX dorivor o'simliklar va farmsanoat uchun keng qo'llanilganligi sababli bu usul dorilarni identifikatsiya qilishda jahon farmakopiyasida katta ahamiyatga ega.

Odatdagi YUQXda olingan natijalarni aniq hisoblash va taqqoslashda qiyinchiliklarga duch kelinadi. Oddiy YUQXning natijalari biz e'tibor bermagan har xil omillar ta'sirida noaniq chiqadi. Metodologiyani takomillashtirishda qaramaqarshiliklar keltirib chiqaradi, to'g'ri va aniq natijalar olish uchun kamchiliklarga uchraydi. Shunday qilib, YUQXni eskirib borayotgan usul sifatida qarash va uni nisbatan ko'proq ahamiyatga ega bo'lган yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (YUSSX) yoki boshqa usul bilan almashtirish kerak degan fikrga kelishi mumkin. Shularga qaramay bu usulning o'ziga xos xususiyatlari bor, masalan; analizda faqat "surat"ini olish identifikatsiya qilish imkonini beradi, shu bilan birga barqarorlikni tekshirish uchun yoki ishlab chiqarishda mahsulot sifatini aniqlashda o'ziga xos ahamiyatga ega. Analizning tezkorligi va kam sarfliliği bilan ham ahamiyatlidir. Farmatsevtika va kimyo sanoatining tezkorlik bilan rivojlanishi o'z-o'zidan YUQX usulubining ham takomillashimi talab etadi. Mazkur ishda YUQX uslubining nazariy ma'lumotlarini va amaliy natijalarini ochib berishga harakat hilingan.

Yevropa farmakopiyasida YUQX hamma dorivor o'simliklar, ekstraktlar va ba'zi sintetik preparatlarni identifikatsiyasi uchun asosiy usul sifatida qo'llaniladi. YUQX uncha zamonaviy darajadagi usul bo'lmasa ham farmakopiyadagi istalgan boshqa uslubga bog'liqligi va texnikasi kam emas. Keyingi vaqtarda YUQX usuli va yuqori samarali yupqa qavatli xromatografiya (YUSYUQX) usuli bilan takomillashib, qo'llanilish sohasi ham kengayib bormoqda. Instrumental YUSYUQX namunaning sepilishi, ko'tarilish jarayoni va natijalarni qayd qilish bosqichlarining anikligi bilan oddiy YUQXdan tubdan farq qiladi. Plastinkalar ko'rsatkichining aniqligi uslubning muhim tajribaviy xususiyati hisoblanadi. YUSYUQXning muhim jixati shundaki, natijalar faqat "surat" shaklida taqqoslanmaydi. Shu bilan birga YUSYUQX miqdoriy usul sifatida ham qaraladi, uni farm yo'nalishida miqdoriy

analiz sifatida qo'llash imkoniyati bor. Asosan miqdoriy aniqlashlar yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (YUSSX) yordamida bajarilar edi. Texnikalashgan YUSYUQX usuli uni almashtirish imkonini beradi.

Uslubni muqobillashtirish va standartlashtirish tajriba natijalarini samaradorligining oshishiga olib keladi. Nazariy ma'lumotlar va amaliy manba ma'lumotlariga asoslanib, zamonaviy YUQX-yuqori samarali YUQXni ishlatalish sohasi kengayib bormoqda.

Plastinkalar va ularning xarakteristikalarini

70-Yillar oxirida rastalarda yangi YUSYUQX plastinkalar paydo bo'la boshladi. Bu plastinkalar tor, o'rta o'lchamli ($5 \mu\text{m}$) sorbentli va keng $2-10 \mu\text{m}$ o'lchamdagagi sorbentli bo'lishi bilan xarakterlangan. YUSYUQX plastinkalarning qalinligi bir xil taqsimlangan bo'lib, ularning yuzasi oddiy plastinkalarga nisbatan silliq va samaradorligi yuqori. 12-Jadvalda ularning xarakteristikalarini taqqoslab keltirilgan.

12-Jadval. Plastinkalarning xarakteristikalarini taqqoslash

Kattaliklar	O'lcham	YU+X	YUSYUQX
Zarralar o'lchami	[μm]	2-40	2-10
Zarralarni o'rtacha ilchami	[μm]	10-15	5
Qatlam qalinligi	[μm]	250	100, 200
Ishchi diapazon	[mm]	100-150	30-70
Muqobil ko'tarilish soxasi	[mm]	120	60
Elyuirlanish vaqtি	[min]	30-60	7-20
Erituvchi sarfi	ml	25-50 20X20	10-20(20X10) 5-10 (10X10)
Detektrlash o'lchami:UB	ng	100-1000	10-100
Detektrlash o'lchami: fluoressensiya	ng	1-100	0,1-10
Narxi*		1 (20X20)	1,2 (20X10) 0,8 (10X10)

Shuni ta'kidlash kerakki, farmatsevtika sohasining qayerida YUQX plastinkalari ishlatilsa, o'sha yerda YUSYUQX plastinkalarini ishlatalish mumkin. Haqiqatan ham olingan natijalar aniq va moddalar yaxshi ajratilgan bo'ladi. Shvetsariyaning

Fotokimyo bo'yicha ekspert kometeti farmatsevtika sohasida bir nechta shunga talluqli bo'lgan analizlar ekspertizasini o'tkazdi. 1-Rasmda shirin va achchiq apelsin yog'inining ikki xil plastinkalarda ajratilishi taqqoslangan. YUSYUQX plastinkada YUQX plastinkaga nisbatan ajralish yaxshi bo'lganligi va kamsarfligi ko'rindi.

YUQX plastinkani 15 sm gacha elyuirlash uchun 45 minut, YUSYUQX plastinkani 5 sm gacha elyuirlash uchun esa 7 minut sarflangan. Elyuint sifatida etilatsetat:toluol-15:85 nisbatda ishlataligan, anis aldegidi bilan modifikatsiya qilingandan keyin 366 nm da skanerda o'qitilgan.

Bir xil sharoitlar qo'llanilishiga qaramasdan har xil firmaga tegishli bo'lgan plastinkalarda analiz natijalari sezilarli darajada bir-biridan farqlanadi.

Ma'lum bir test bilan plastinkalarni basholash mumkin emas, shuning uchun metodikaning yozilishida plastinka tayyorlangan firma kursatilishi kerak. Bu esa keyingi tekshirishlarda o'z samarasini beradi.

Namunani plastinkaga tomizish

YUQX dagi hamma tekshirishlar odatda boshlang'ich nuqtadan dog'lar orasidagi masofani aniqlash (R_f -qiymati)ga asoslangan. O'z navbatida analizning sifatlari, to'g'ri o'tishi namunani plastinkaga tomizilishi bilan bog'liq. Miqdoriy analiz uchun belgilangan miqdor (doza)ni mikrohajmlarda yuqori darajadagi aniqlikda tomizish kerak. Moddalarning ajralish darajasi namunaning tomizilish shakli, o'lchami va soha bo'yicha bir xil taqsimlanishiga bog'liq. Namunani tomizishning ikki usuli kontakt (kapilyar va shprits yordamida) va purkash usullari qo'llaniladi. Kontakt usuli bilan tomizishda xalqasimon yoyilish sodir bo'lib, namunani erituvchi yoyilgan soha bo'yicha bir xil taqsimlanishi sodir bo'lmaydi. Kontakt usuli bilan tomizishda erituvchini diffuziyalanishi natijasida start sohasi qalin bo'ladi va bu o'z navbatida komponentlarni ajralishiga salbiy ta'sir ko'rsatadi. Bu asosan namuna oson yoyiluvchan erituvchilarda eritilganda muhim ahamiyat kasb etadi.

Purkash orqali tomizishda xromatografik ajralish sezilarli darajada yaxshilanadi va xatoliklar sezilarli darajada kamayadi. Purkash vaqtida hech qanday qo'shimcha jarayonlar (elyuirlanish va diffuziya) sodir bo'lmaydi. Belgilangan soha bo'yicha

namunani bir xil taqsimlash imkoniyati mavjud bo'ladi. Bu esa xromotografik ajralishni yaxshilanishiga olib keladi. Purkash vaqtida namuna hamma nuqtalar bo'ylab teng taqsimlangan bo'ladi, bu esa mikdoriy analiz uchun muhimdir. Shuni ta'kidlab o'tish kerakki, kontakt usulida tomizishda, masalan; mikrokapilyarda tomizilganda xattoki, plastinkalarda «konsentrangan zona» hosil bo'ladi va mantiqiy ajralish bo'lmaydi. R_f-qiymatlari farqi kichik bo'lishi bilan birga har xil anomal holatlar yuzaga keladi.

- a) elyuirlanishdan oldingi tomizish sohasi. Chapdan o'ngga: kontaktli nuqtasimon, purkash nuqtasimon, kontaktli chiziqsimon, purkash chiziqsimon
- d) kontaktli chiziqsimon (5-trek, yashil chiziq) va chizish purkash (7-trek, ko'k punktir chiziq) natijalarini taqqoslash

Elyuirlanish

Xromatografiyaning oxirgi natijasi (holati, shakli va komponentlarning ajralishi) kameralarning tipiga va ularning «to'yinishiga» bog'liq. Tajribalar asosan aniq belgilangan sharoitlarda qo'shimcha chetlanishlarsiz olib boriladi. Xromatografiyaning nazariyasi ko'pgina adabiyotlarda yoritilgan bo'lib, odatda to'yingan kamera (vertikal va gorizontal) oddiy holatdagiga qaraganda yaxshi natija beradi.

Bunda elyuirlanish jarayonida elyuintning tezligi kamayadi. YUSYUQX plastinkalar uchun zarrachalar ulchami kamayishi va qatlam qarshiligi kamaygan sari xromatografiya uchun ishchi masofasi kamayadi.

Muayyan bir sharoitda va bir kamerada, tashqi sharoitlar o'zgarmagan holda komponentlarning R_f-qiymatlari elyuirlanish (front) holati bilan ham bog'liq bo'ladi. 6-Rasmda ikki komponent uchun ajralish va front balandligi orasidagi bog'liqlik grafigi berilgan. Ajralish quyidagi formula yordamida hisoblangan:

$$R_s = 1/4(\alpha - 1)(R_f N)^{1/2} (1 - R_f).$$

YUSYUQX plastinkalar uchun eng yaxshi ajralish front masofasi 5-7 sm hisoblanadi. Muqobil front masofasi 6 sm atrofida bo'ladi. Ko'pgina elyuintlar uchun silikagelda ushbu elyuirlanish jarayoni 7-20 minut davom etadi. Ko'rsatilgan sharoit uchun optimal diapozon R_f=0.3-0.4 ga teng bo'ladi. Elyuint (xarakatlanuvchi

faza)ning elyuirlanish tezligini shunday boshqarish kerakki, aniqlanadigan komponentlar ana shu diapozonda taqsimlanishi lozim.

Bu nazariy manbani tajribada oson isbotlash mumkin. R_f qiymati 0,4-0,5 bo'lgan bir juft komponent (strelka bilan ko'rsatilgan) tanlab kuzatilganda elyuirlanish masofasi oshishi bilan ajralish oralig'i kattalashgandek bo'ladi. Lekin xromotogrammalarни bitta shkalaga keltirganimizda ajralish oralig'ini deyarli o'zgarmasligini ko'rishimiz mumkin. Ajralish maksimumi elyuirlanish masofasi 6 sm bo'lganda sodir bo'ladi. Elyuirlanish masofasi oshishi bilan R_f -qiymati kamayadi. Bu effektini elyuintdag'i uchuvchan erituvchining uchishi hisobiga komponent ulushining oshishi bilan tushuntirish mumkin.

Ochiltirish (Modifikatsiya qilish)

Xromotogrammalarни xim'yaviy ochiltirish odatda qiyinchiliklarsiz amalga oshiriladi. Buning uchun reagent eritmaları plastinkaga purkaladi yoki eritmaga bo'ktiriladi. Bo'ktirishni va purkashni muqobil sharoitini tanlash qiyin bo'lishiga qaramasdan ochiltirish ko'p qo'llaniladi. Purkash bajaruvchidan yuqori malakani talab etadi. Bundan tashqari plastinkaga purkaladigan reagent miqdori va uni bir xilda taqsimlanishini nazorat qilish qiyin, bular ham natijalarga ta'sir ko'rsatadi. Purkash xavfli aerozollarni keltirib chiqarishi ham mumkin.

Immersiya usulida ochiltirish ancha oson boshqarish mumkin. Reagent konsentratsiyasi, plastinkaga qo'yish tezligi va immersiya vaqtı boshqariladi. Reagentning eritmada taqsimlanishi va plastinkada taqsimlanishini boshqarish bir muncha qulayroqdir. Immersiya vaqtida hech qanday aerozollar bo'lmaydi.

Ba'zan kimyoviy ochiltirishda aniq berilgan parametrlar asosida qizdirish talab etiladi, masalan: berilgan temperaturada x vaqt mobaynida yoki rang hosil bo'lguncha qizdirish.

Ochiltirishning umumiy uslubi yo'q, har bir ochiltirishning xususiy parametrlari (reagent va uning konsentratsiyasi, vaqt va sharoiti)ni, shu bilan birga quritish parametrlari (qizdirishdan oldingi va keyingi vaqt va temperatura)ni ko'rsatish kerak.

Natijalarni hujjalashtirish

YUQXni boshqa xromatografik usullardan o‘ziga xos muhim jihat shundaki, unda analizning elyuatsiyasi va natijalarni qayd qilish uchun plastinkalar suratga olish imkoniyati mavjud. Hozirgi davrda hamma joylarda raqamli fotografiya, video va raqamli kameralar, hattoki programmalashtirilgan skanerlarni qo‘llash qulaydir.

Zamonaviy farmakopiyada natijani matnli yozilishi endilikda analizning to‘liq va mukammal obyektiv baholash uchun yetarli emas. Masalan; Yevropa farmakopiyasida tanishtirilgan [6] arpabodiyon yog‘ining analizini UB 254 nm da o‘rganilganda ikkita dog‘ni topish mumkin (arpabodiyon aldegid va anetol). Vanilin bilan yorug‘likda modifikatsiya qilingan (ochiltirilgan)dan keyin finish chizig‘idan pastroqda linallaol va anetolga mos keluvchi dog‘lar aniqlanadi.

Ba’zi bir maqlolarda analiz natijalari jadval ko‘rinishida ifodalangan (13-jadval). Lekin ular raqamli suratlarning o‘rnini bosa olmaydi.

13-Jadval. Yevropa farmakopiyasida arpabodiyon yog‘i analizi natijalarining qayd qilinishi [7] qo‘srimcha dog‘lar, matnlar bilan ko‘rsatilgan.

Plastinka yuqori qismi		Plastinka yuqori qismi	
Anetol: fluoresensiya ----	fluoresensiya Anetol) ----	Anetol: jigarrang dog‘ ----	binafsha dog‘ (monoterpenoid uglevodorodlar) jigarrang dog‘ (anetol) ----
arpabodiyon aldegid: fluoresensiya ----	fluoresensiya (arpabodiyon aldegid) ----	linalool: ko‘k dog‘	----
guvox	tekshiriluvchi	guvox	tekshiriluvchi

Bu ikki analizni haqiqiy baholash uchun uning matnli formasi ham, jadvallি formalari ham kerak bo‘lmaydi. Matnda strelkalar bilan ko‘rsatilgan sohalar hamma joyda ham yozilmaydi, suratda bu ikki yog‘da bo‘lgan ajralishlar aniq ko‘rsatilgan.

YUQXning boshqa bosqichlaridagi singari hujjatlashtirish uchun raqamli fotografiyani qo'llash va uning yozuvlarini aniq kafolati uchun qo'llanilishi muhimdir. Yaqin kunlarda dorivor o'simliklar analizining raqamli fotografiya yordamida (plastinkalarning rasmlari) atlasi paydo bo'lishi mumkin. Bunday atlas nafaqat izlarning tavsifi, balki har bir o'simlikni xarakterlash uchun xizmat qilishi kerak. Ko'pgina har xil tabiiy o'simliklarning (fenotip) analizi bitta plastinada aks etgan bo'lishi mumkin.

Standartlashtirish va xalqaro normalashtirish

Bundan oldingi bo'limlarda YUQX usulining bir qancha muhim xarakteristikalari ko'rib chiqildi, umumiy va xususiy jihatlari muhokama qilindi. Ba'zan xujjatlarni xalqaro meyorlar darajasida rasmiylashtirishda YUQXning keng masshtabli qo'llash imkoniyati yetarli emas. 10-Rasmda Angelica sinensis va Levisticum officinale o'simliklarini YUSYUQX usulida A laboratoriyada tekshirilgan va V laboratoriyaga tekshirish uchun berilgan natijalar keltirilgan. Ikkala laboratoriyada ham tekshirishlar berilgan qo'llanma asosida diqqat bilan olib borilganligiga qaramasdan olingan natijalar o'xshash ammo aynan bir xil emas. Bu ikki laboratoriyalarning tajribalarida umumiy metodikadan chetlanishlar mavjud, lekin ularning barchasi to'g'ri bajarilgan.

Tajribalar

Plastinkalarni yuvish

Kamerani tuyintirish

Sepish

Xujjatlashtirish

Plastinkani aktivlashtirish

A laboratoriya

Yuvilmagan

20 min. filtr qog'ozni bilan

Dipping

videosyemka

xonada, 40% namlik

V laboratoriya

MeOH-CHCl₃, 105°da
30 min. quritilgan

15 min. qog'ozsiz

purkash

planshetnli skanner

R2O5 da quritish
(namlik aniqlanmagan)

U AOAS qo'llanmaga asosan sinchkovlik bilan amalga oshirilgan (Peer Verified Method Program). Natijalar qariyb bir vaqtida, bir biridan xabarsiz ikki laboratoriyadan olingan. Metodikalar quyidagi adabiyotlarda keltirilgan.

Yuqorida ko'rib chiqilgan YUQX usuli bajarilgan ishlar va qilingan tavsiyalarga asosan, dorivor o'simliklar va boshqa komponentlarni analizida YUQXni qo'llash uchun aynan quyidagi holatlari e'tiborga molik hisoblanadi;

1. YUSYUQX plastinkalarni qo'llash yo'lga qo'yilgan bo'lishi kerak.
2. Yaxshi sifat va miqdoriy analiz uchun tomizish, purkash orqali amalga oshirilishi kerak.
3. Elyuirlash to'yingan kameralarda bajarilishi va elyuirlanish masofasi 6 sm gacha bo'lishi ma'qul.
4. Uslubiy qo'llanmalar uchun, hamma bajariladigan ish tartibi, reagentlarni tayyorlanishidan to natijalarni baholashgacha bo'lgan jarayonlar to'liq yozilishi talab etiladi.
5. Natijalarning yozilishiga qo'shimcha qilib, atlas shaklidagi plastinkaning har xil usullar bilan olingen bir qancha rangli fotosuratini olish (masalan; UB 254 nm , UB 336 nm yorug'likda) identifikatsiyani sezilarli darajada aniqligini oshiradi.
6. YUQXda standart namunalar bilan taqqoslash asosida olingen natijalar mustahkam sanaladi.

VITAMINLAR

Tirik organizmlar uchun zarur, ximiyaviy tarkibi va xossalari turlicha bulgan kichik molekulyar massaga ega organik moddalar vitaminlar deyiladi. Hayvon va odam organizmlarining vitaminlarga bo'lgan talabi asosan o'simlik va mikroorganizmlar hisobiga qondiriladi. Vitaminlar kam miqdorda va doimo talab qilinadigan ovqat komponentlaridir.

N.I.Lunin vitaminlarni 1880 yilda kashf etgan, 1912 yilda K.Funk bu moddalarni «hayot aminlari» deb atashni taklif etgan, chunki u vitamin tarkibida azot borligini aniqlagan edi. Hozirgi kunda 30 dan ziyod vitaminlar tarkibi, tuzilishi, ximiyaviy va fiziologik xossalari o'r ganilgan. Ularning ko'pi sintez yo'li bilan hosil qilingan. Ularning aksariyati azot yoki, amino yoki aminogruppa saqlamasaga ham bu tarixiy nom saqlanib qolgan. 1973 yilda Mok Kolluma vitaminlarni lotin alifbosi

harflari bilan belgilashni taklif qildi. Organizmda vitaminlar etishmasligi ko'pgina og'ir kasalliliklarga olib keladi. Vitaminlarning ortiqcha miqdorda bo'lishi ham organizmdagi moddalar almashinuvini buzadi. Eruvchanligiga ko'ra vitaminlar ikki gruppaga bo`linadi: suvda eriydigan va yog'da eriydigan vitaminlar.

SUVDA ERIYDIGAN VITAMINLAR

Bu gruppaga vitaminlarga— B₁ (tiamin, antinevit), B₂ (riboflavin, usish vitamin), B₃ (pantogen kislota), B₅ yoki RR(nikotinamid) nikotin kislota, antipollargik, B₆(piridoksin, piridoksolin, piridoksol', antidermatit). B₈(folat kislota, ptoroi glutamin kislota, o'sish faktori), B₁₂(tsiankobalamin, antiapemik), B₁₅ (pangom kislota), B₁₁ (parpitin), P(rutin, kapilyarlarni mustaxkamlovchi), H(biotin), C(aksorbin kislota, singaga qarshi) va vitaminsimon moddalar B_n(xolin), B (inozit), N -(linoet kislota), B₁₃(orot kislota) kabi moddalar kiradi

1-TAJRIBA.

Tekshiriluvchi material: vitamin uchun sifat reaksiyasi Kerakli reaktivlar: FeCl₃ kompleks tuz. Kerakli asboblar: probirka.

B₆ vitaminini FeCl₃ bilan fenolyatlar tipidagi qizil rangli kompleks tuz hosil qiladi.

Probirkaga B₆ vitaminining 5% li eritmasidan 1 ml va FeCl₃ eritmasidan 2 – 3 tomchi qo'shib aralashtiriladi. Qizil rang paydo bo'ladi.

2 – TAJRIBA.

C vitaminini uchun sifat reaksiyalar

Tekshiriluvchi material: C vitamin.

Kerakli reaktivlar: askorbin kislota, kartoshka yoki karam, metilen, ko'pik soda.

Kerakli asboblar: doka, qirg'ich

C vitaminini oksidlanish — qaytarilishi jarayonida ishtirok etuvchi askorbin kislotadir:



A) Askorbin kislotaning qaytarilishi xossalari. Kartoshka yoki karamni qirg'ichdan o'tkazib qo'sh qavatli dokada sharbati siqib olinadi. 1 ml sharbatga metilen ko'kingin 0,01% li eritmasidan 1-2 tomchi sodaning 5% li eritmasidan 2 — 3 tomchi qo'shiladi.

Aralashma sal qizdirilganda metilen ko'kingin rangi yo'qoladi.

3 – TAJRIBA.

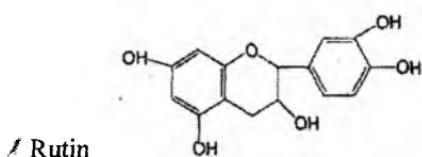
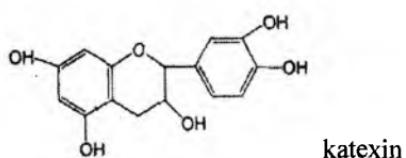
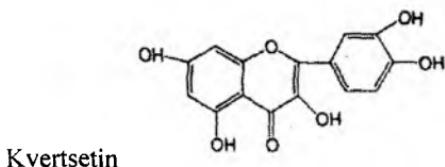
P vitamini va uning analoglari uchun sifat reaksiyalar.

Tekshiriluvchi material: rutin eritmasi.

Kerakli reaktivlar: temir(III) xloridning 1% li eritmasi, kontsentrlangan sulfat kislota, xlorid kislotaning 10% li eritmasi.

Reaksiyaning asoslanishi: P vitamini kabi ta'sir ko'rsatuvchi moddalar keng tarqalgan. Ular fenol tabiatiga ega va asosan flavonning hosilasi bulgan moddalardir. Mevalar, choy, marjumak, toshbaqa tomi kabi o'simliklar tarkibida vitamin ko'p bo'ladi.

P gruppasi vitaminlari vakillari:



A) rutin uchun sifat reaksiyasi:

Ikkita probirkaga rutinning suvdagi to'yigan eritmasidan 1—2 ml dan quyiladi. Birinchisiga temir(III) — xlorid 1% li eritmasidan 1—2 tomchi, ikkinchisiga esa probirka devori bo'ylab kontsentrlangan sulfat kislota eritmasidan 1ml qo'shiladi. Birinchi probirkada yashil, ikkinchisida esa sariq rang hosil bo'ladi.

B) rutinnning gidrolizlanishi:

Rutinning suvdagi to'yigan eritmasidan 5 ml olib, unga xlorid kislotaning 10% li eritmasidan 1ml qo'shiladi va qaynaguncha qizdiriladi. Rutinning kislotali sharoitda gidrolizlanishi natijasida rutinoza va ramnoza monosaxariddari hosil bo'ladi. Bu monosaxaridlar Feling suyuqligidan misni qaytaradi. Hosil bo'lgan gidrolizat fil'trlanadi. Fil'tratning bir qismiga Feling suyuqligidan qo'shib qizdiriladi (1:2). Qizil rangli mis oksidning cho'kishi rutinning gidrolizlanishi natijasida qaytaruvchi qand hosil bo'lganligini ko'rsatadi.

4 – TAJRIBA.

Pepsinni affinli xromatografiya usuli bilan tozalash.

Bu ish pepsinni sanoat preparatidan tozalab sorbentda ajratib olish misolida o'tkaziladi.

Sorbent o'z navbatida 4B seforoza bromtsian oqi 6B ni mono — 2,4 — dinitrofenil bilan geksametilendiaminni sirlashganda olinadi. Ligandni tanlovi fermenti spetsifikasida asoslanadi.

Pepsin, gidrofob aminokislotalar qoldiqlari bilan hosil qilingan bog'larni osonroq parchalaydi. Mono —DNF geksaetilen diamin pepsin substratini yaqqol analogi emas. Lekin u ferment gidrofob uchastkalari bilan tanlab bog'lanadigan gidrofob guruhiga ega.

Reaktivlar: Pepsin, 4B yoki 6B seforoza mono —DNF geksametilendiamin, 5M pH=11,0 fosfatli bufer 3,33 mol' K₃PO₄ 1,67 mol' K₂HPO₄, atsetatli buferlar bularni tayyorlash uchun 1 M sirka kislotada 1 M natriy atsetat quyiladi.

Atsetat buferli aralashmasi tarkibi

Nº	RO	Ch ₃ COOH	4MCh ₃ COONa (ml)
1	4,5	15	1,0
2	5,0	3,0	7,0
3	5,6	2,25	22,75

Korsatilgan eritmalarini qo'yilgandan keyin xajmni NhO bilan 1 l gacha etkaziladi.

Ishni bajarish.

Sorbentni olinishi

Sefarozani bromtsian bilan aktivlatntirish. Bromtsian bilan bajariladigan hamma ishlari mo'rili shkafda bajarilishi lozim. Bromtsian eritmasi bo'lgan idishlar ishqor eritmasida yuvish kerak.

4B sefarozani №1 g'ovak shisha filtrida baktriotatik qo'shimchalarni yo'qotish uchun distillangan suv bilan yuviladi.

Yuvilayotgan suvni extiyot bo'lib yo'qotish kerak, chunki gel qurib qolmasligi uchun. Sefarozani aktivatsiyasini 50 ml li termometr tushirilgan stakanda o'tkaziladi, magnit aralashtirgich bilan aralashtirilayotgan stakanga 5 ml pH 11,0 li fosfat buferini qo'yiladi va 50 gacha muz bilan sovutiladi. Byuksda 5 gr nam sefaroz tortiladi va sovutilgan bufer eritmaga qo'shiladi. Suspenziyani umumiy hajmini distillangan suv bilan 10 ml gacha etkaziladi.

Atsetonitrildagi bromtsian eritmasini 0,25 ml ni 10 ml li probirkaga qo'yiladi, umumiy hajmi 5 ml ga etguncha suv qo'yib aralashtiriladi. Probirka og'zini probka bilan berkitiladi.

Ba'zan suv qo'shilganda bromtsianni mikrokristall cho'kmasi ajraladi, biroz vaqtidan so'ng asta —sekin aralashtirilganda u erib ketadi. Bromtsian eritmasini stakan tepasiga o'rnatilgan tomizgich voronkaga olinadi va sefariza suspenziyasiga 1,5 — 2 daqiqa mobaynida tomchilab qo'yiladi. Yana 8 daqiqa davomida 5— 10°C da aralashtiriladi, aktivlantirilgan gel'ni yuvish:

Yuvishni tez o'tkazish lozim, chunki aktivlangan sefariza barqaror emasdir. Yuvishda qo'llaniladigan suv va boshqa erigmalar oldindan 4°C gacha sovutiladi.

Aktivlantirilgan sefarozani tezda №1 g` ovak shisha fil'grrga olinadi. Fil'trغا oldindan bir necha muz bo`laklarini qo`yiladi. Byuxner idishga ta`sirlashmagan bromtsianni bog`lash uchun qattiq FeSO₄ ni qo`yiladi. Gel`ni distillangan suv bilan universal indikator buyicha neytral rektsiyagacha 50 ml 0,1 M NaHCO₃ va 50 ml 50% li dimetilformamidni (DMFA) eritmasi bilan yuviladi.

$$0,1 \text{ M pH} = 10,0 \text{ li NaHCO}_3$$

Sefaroza 4B-DNF-geksametilendiamin sorbentini olish.

Bromtsian bilan aktivlangan 5 gr sefariza mono —DNF — geksametilendiamin xlorgidrati DMFA —0,1 M NaHCO₃ (1:1) pH=10 aralashmasining 30 mM 10 ml eritmasiga qo`shiladi. Xona haroratida 12 soat davomida aralashtiriladi. Sorbentni fil'trda 50% DMFA ni suvli eritmasi bilan, so`ng 0,001n NSI bilan, 360 nm da yuvilgan suvning yutilishi yuqolguncha va nihoyat suv bilan yuviladi. Serbentni kolokpaga o`tkaziladi na elyuirlaydigan erituvchilar: pH=4,5 0,1 M atsetat bufer, 1 M NaCl tutgan pH=4,5 0,1 M atsetat bufer, 25% li izopropil spirt va 1 M NaCl tutgan pH=4,5 0,1 M atsetat bufer bilan ketma — ket 360 nm da yutilish yuqolguncha yuviladi. So`ng serbent pH=4,5 0,1 M atsetat buferi bilan tenglashtiriladi.

Sorbentda ligand miqdorini aniqlash.

Suv bilan yuvilgan sorbentning suvli suspenziyasini 1 — 2 ml atrofida pipetka bilan olinadi. Berkitilgan pipetkada turib qolgan şefaroza xajmi o`lchanadi va uni oldindai tortilgan byuksda miqdorini o`lchab olinadi. Sorbentni P₂O₅ ishtirokida doimiy okirlikkacha vakuum- eksikatorda quritiladi. Tortilgan sorbent qaytarma sovitgichli 25 ml kolbada 10 ml triftorsirka kislota va 5 ml suv aralashmasi bilan suv xammomida (70°C da) qizdirish orqali eritiladi.

Eritmaning alikvoti olinadi, suv bilan suyultiriladi va UB—spektri o`lchanadi. 2,4-dinitrofenil gruppasining ekstinktsiya koeffitsientidan ($E_{360}=15000$) kelib chiqib, 1 ml ho`l yoki 1 mg quruq sorbentdagи ligand miqdori hisoblanadi.

4-mono-DNF geksametilendiamin sefariza sorbentida pepsin xromotografiyasi.

45 mg pepsin sanoat pereparatini 25 ml pH=4,5 0,1 atsetat buferi bilan eritiladi. Agar eritma loyqa bo'lsa, uni fil'trlanadi. 1 ml eritma olinib, pH=4,5 li bufer bilan 5 ml gacha suytiriladi, 280 nmda yutilish o'lchanadi va proteolitik aktivligini aniqlanadi. Kolonkaga surtilgan oqsilni miqdori va proteologik aktivligini umumiy yig'indisi hisoblanadi.

Oqsil eritmasini kolonkaga 3 ml 4B-mono-DNF- geksametilendiamin sefarzoza sorbenta bilan surtiladi va pH=4,5 li 0,1 M atsetat buferi bilan yuvib, 4 ml da fraktsiyasi olinadi. Olingan fraktsiyalarni 280 nm da yutilishi o'lchanadi. elyuatning optik zichligi 0,1 dan kam bo'lganda, pepsinni 1M NaCl tutgan pH=4,5 0,1 M atsetat buferi bilan ekyuirlanadi. Agar ferment kolonkadan chiqmasa yoki tuliq desorbsiyalanmasa, 1M NaCl tutgan pH=4,5 0,1 M atsetatbuferdag'i 25% li izopropil spirt bilan elyuirlanadi. elyuatsiya ketishini 280 nm dagi yutilishni o'zgarishidan kuzatiladi va elyuat optik zichligini kolonkadan o'tgan elyuirllovchi erituvchi hajmiga bog'liqlik grafigi tuziladi. Shunday qilib, elyuatning uchta fraktsiyasi olinadi: kolonkada sorbsiyalanmagan moddalar fraktsiyasi, 1 M NaCl da desorbsiyalangan oqsil va izopropil spirti qo'shilganda desorbsiyalangan oqsil. Bu fraktsiyalarning 280 nm dagi umumiy yutilishi, umumiy va solishtirma proteologik aktivligi aniqnadi. Oqsilning kolonkaga surtilgan miqdoridan proteologik aktivligi va unumi foizlarda hisoblanadi, hamda tozalik darajasi aniqlanadi.

Qo'shimcha:

Toza holdagi aktiv ferment tutgan elyuat G —25 sefadeks orqali fitrlab, tuzsizlantiriladi yoki suvg'a qarshi dializ qilib liofil' quritish bilan olinadi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR:

1. Филиппович Й.У.Б. и др. Практикум по общей биохимии. М., 1975, 39 с.
2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980, 14 с.
3. Хожиев К.К. Химия иммуноглобулинов. Ташкент, Медицина, 1971, с. 20.
4. Н.А.Тюкавкина, Ю.И.Бауков. Биорганическая химия. М. Медицина, 1991 г.

M U N D A R I J A:

Kirish	3
Oqsillar. Aminokislotalar va peptidlar	4
Nukleoproteidlar	34
Fermentlar (enzimlar)	37
Oksidlanish – qaytarilish fermentlari (oksidoreduktozalar)	38
Nuklein kislotalar (RNK, DNK) ni tabiiy manbalar (paxta chigit, undirilgan mosh, loviya, fasol, no`xat) dan ajratib olish	41
RNK va DNK larni tozalash, ishqoriy va kislotali gidrolizlari gidroliz mahsulotlarining tarkibini (purin, pirimidin asoslari) xromatografiya yordamida o`rganish	44
Uglevodlar	47
Disaxaridlarning umumiy reaksiyalari	50
Uglevodlarning oraliq almashinuvi	57
Lipidlar almashinuvi	72
Yog'larning parchalanishi va hazm bo'lishi	73
Vitaminlar	81
Foydalanilgan adabiyotlar	87

«Fazilatorgtexservis» X/K. chop etildi.

Manzil: Namangan shahri, A.Navoiy ko'chasi, 72-uy.

