



**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIY VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM VAZIRLIGI
TERMIZ DAVLAT UNIVERSITETI**

BOTANIKA KAFEDRASI

**“Biokimyo va molekulyar biologiya”
fanidan
laboratoriya mashg‘ulotlari
(2-qism)**



TERMIZ-2022

Biokimyo va molekulyar biologiya fanidan laboratoriya mashg'ulotlar.

Suliyeva S. X., G'aniyeva G.I., Boboyeva N.T

Ushbu uslubiy ko'rsatma 60510100- biologiya ta'lim yo'nalishi 2 kurs talabalari uchun mo'ljallangan bo'lib, talabalarga biomolekulalarning kimyoviy tuzilishi, oqsillarga xos sifat reaksiyalari, biomateriallardan kerakli bo'lgan: protein va proteid, glikoproteidlar, fosfoproteinlar, nukleoproteidlarni gidroliz qilib, gidroliz mahsulotlarini ajratish nukleoproteidlarni ajratib olish va ularga xos sifat reaksiyalari, oqsil va nuklein kislotalarning gel-elektroforezi, polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida DNK bo'laklarini ko'paytirish to'g'risida ham ma'lumotlar keltirilgan.

Taqrizchi: Samadova Sh.A. – QarDU botanika kafedrası dotsenti,
biologiya fanlari nomzodi

Fiziologik faol moddalar fanidan ishlab chiqilgan uslubiy ko'rsatma Termiz davlat universiteti o'quv-uslubiy kengashining 2022 yil 27 - avgustdagi 1 - sonli yig'ilishida muhokamadan o'tgan va foydalanish uchun tavsiya etilgan

Termiz- 2022

Laboratoriya mashg'uloti mavzulari

№	Mavzu nomi	Soati
1	Tuxum oqsilidan albuminni kristall xolda ajratish	2
2	Qonda glikoproteidlarni aniqlash	2
3	Muskul to'qimasidan oqsil fraksiyalarini ajratish	2
4	Bug'doy unidan oqsillarni ajratish va ular tarkibni o'rganish	2
5	Murakkab oqsillar tarkibini aniqlash	2
6	Oqsillarni gel filtratsiya usuli yordamida tozalash	2
7	Oqsillarning gel elektroforezi	2
8	Achitqi nukleoproteidlarni ajratish	2
9	Jigardan nukleoproteidlarni ajratish	2
10	Piyozdan DNK ni ajratish	2
11	Bukkal epiteliydan DNK ni ajratish	2
12	Nukleoproteidlarni gidroliz qilib, gidroliz mahsulotlarini ajratish	2
13	Nuklen kislotalarning gel-elektroforezi	2
14	PZR usuli bilan tanishish	2
15	Polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida DNK bo'laklarini ko'paytirish (virtual)	2
	Jami	30

Laboratoriya mashg'ulotlari jarayonidagi tartib qoidalar.

Eritmalarni tayyorlash

Biokimyodan laboratoriya mashg'ulotlarini olib borishda rioya qilinishi zarur bo'lgan tartib – qoidalarni talaba to'liq o'zlashtirmasa, unda ayrim havfli holatlarning yuzaga chiqishi aniq. O'z navbatida dars jarayonida talaba biror bir ehtiyotsizlik oqibatida nojo'ya xarakat qilib qo'yganda, ya'ni masalan: teri kuyishi, zaharlanish, yallig'lanish yuz berganda, unga birinchi yordam ko'rsatish qoidalari bilan ham tanish bo'lish talab qilinadi. Shu sababli talabalarni gigiyena qoidalari, laboratoriyada ishlash va texnika-xavfsizligi qoidalari, ko'ngilsiz holatlar yuzaga kelganda birinchi yordam ko'rsatish tartib-qoidalari bilan tanishtirish muhim ahamiyatga ega bo'ladi. Shuningdek biokimyoviy laboratoriya ishlari va ularni o'tkazish uchun kerakli jihozlar hamda ishlatiladigan xilma xil konsentratsiyadagi kerakli reaktivlar bilan ishlashga tegishli ko'nikmalarga ega bo'lishni talab qilganligi uchun birinchi darsning mavzusi aynan shu muammolarning yechimiga qaratiladi.

Darsning maqsadi. Ushbu dars davomida talabalar laboratoriya mashg'ulotlarini bajarishda gigiyenik, laboratoriya, texnika xavfsizligi qoidalari bilan tanishtirish hamda umumiy tartib-intizomga rioya qilish, laboratoriya jihozlari bilan ishlash, shuningdek reaksiyalarni o'tkazish uchun zarur bo'lgan kerakli reaktivlarni tayyorlash ko'nikmalarini shakllantirish hisobga olingan.

Gigiyena qoidalari

1. Laboratoriya ishlarini bajarishda doimo oq xalatda bo'lishni ta'minlanishi.
2. Agar biologik materiallar (xar xil to'qimalar na'munalari, so'lak, qon, siydik, va x.k.z.) ni biokimyoviy tahlil ishlarini olib borishda qo'lni shikastlanishini oldini olish maqsadida ishni rezina qo'lqoplar yordamida bajarish tavsiya etiladi va mashg'ulotdan so'ng qo'lqoplar oldin fiziologik eritma so'ng 4% li vodorod peroksid eritmasi va sovun bilan yuviladi.
3. Singan shisha idishlar, pipetkalar, probirkalardan foydalanish man etiladi.
4. Laboratoriya xonasi va talaba o'z ish stolini tartibli saqlashi lozim, shuningdek stol ustida ish uchun keraksiz buyumlarning bo'lmasligiga erishish kerak.
5. Biologik materiallar va kimyoviy reaktivlar bilan ishlagandan so'ng ishning nihoyasida albatta qo'llarni sovun bilan yuvish shart.
6. Laboratoriya ishi bajariladigan xonalarda ovqatlanish, pardozu-andoz bilan mashg'ul bo'lish va mavzuga bog'liq bo'lmagan boshqa mashg'ulotlar bilan shug'ullanish man etiladi.
7. Reaktivlarni va tekshirish uchun mo'ljallangan materiallar saqlanadigan muzlatgichlarda oziq – ovqat mahsulotlarini vaqtincha va uzoq muddatlarda saqlash qat'iyan ta'qiqlanadi.
8. Qon olish vaqtida faqatgina steril ignadan yoki bir martalik skorifikatorlardan foydalanish kerak.

9. Teriga tushib qolgan biologik material, qon, siydik namunalari qoldiqlari tushgan joy 70% tibbiyot spirti yoki dezinfikatsiyalovchi boshqa eritma surtib tozalanadi.

Laboratoriyada ishlash qoidalar

1. Tajriba o'tkazish oldidan aniq bajariladigan ishni ushbu qo'llanmadan e'tibor bilan o'qib tushunib olish va reaktivlarning xossalari bilan tanishib chiqish zarur.

2. Laboratoriya mashg'ulotlari uchun tutilgan daftarda sana, bajariladigan laboratoriya ishi mavzusi, ishning to'liq mazmuni, formulalar, tenglamalar, jadvallar, rasmlar, sxemalar, xulosalar yozib borilishi lozim.

3. Talabanning ish daftarida dars uchun kerakli jihozlar va kimyoviy reaktivlar, ularni tayyorlashga oid yo'l-yo'riqlar o'z aksini topishi lozim.

4. Laboratoriya ishini bajarishda uni diqqat bilan ushbu qo'llanmada keltirilgan tartibdagi ketma-ketlikda, shoshmasdan, xatoga yo'l qo'ymasdan amalga oshirish talab etiladi.

5. Kimyoviy reaktivlar solingan idishlarning qopqoqlari va tiqinlarini stol ustiga reaktivlar tegmagan tomoni bilan qo'yish va ulardan foydalangandan so'ng idishlarning o'z-o'ziga adashtirmasdan yopib qo'yish lozim.

6. Laboratoriya ishlarini bajarish vaqtida tahlil qilinuvchi namunalarni bir joyda saqlash va hamma uchun umumiy bo'lgan texnik jihozlar va o'lchov tarozilarini joyidan siljitmaslik lozim.

7. Laboratoriyada noma'lum tavsifli bo'lgan reaktivlarni ta'mini tatib ko'rish, teriga tomizib sinash, xonada chekish man etiladi.

8. Kuchli kislota, ishqor eritmaları va zaharli moddalar bilan mo'rili shkaf ostida ishlash, ularni o'lchab olishda avtomatlashtirilgan pipetkalardan foydalanish, qolgan xollarda esa, bu ishni o'lchov silindrlari yordamida o'lchab olib bajarish. Brom, vodorod xlorid va boshqa zaharli moddalar solingan idishini og'zini mo'rili shkaf ostida chetga qaratib ochish kerak.

9. Ishlatilgan kislotalar, ishqorlar, xromli aralashmalar, oltingugurtli aralashmalar birikmalari va boshqalarni alohida belgilangan idishlarga to'kiladi.

10. Konsentrlangan kislotalarni suyiltirishda suvni kislotaga emas, balki kislotani suvga asta – sekinlik bilan aralashtirib turgan holda qo'shib borish talab qilinadi.

11. Mashg'ulot davrida ish rejasida ko'rsatilmagan tajribalarni qo'shimcha ravishda bajarish man etiladi.

12. Laboratoriya mashg'ulotlarida rejalashtirilgan ishlar bajarilgandan keyin barcha ishlarning natijalari rasmiylashtiriladi va foydalanilgan asbob-uskunalar, idishlar va boshqa jihozlar tozalab yuvilgandan so'ng navbatchi talabalar tomonidan yig'ib olinib kafedraning laborantiga olib borib topshiriladi.

Yong'in va texnika xavfsizlik qoidalar

1. Laboratoriyada ishlayotgan har bir kishi yong'in va texnika xavfsizlik qoidalariga amal qilishi lozim.
2. Turli gaz gorelkalar va spirt lampalardan to'g'ri foydalanishni bilishi kerak.
3. Issiq idish va asboblarni hech qachon stolga to'g'ridan-to'g'ri qo'yish yaramaydi, buning uchun maxsus taglik (azbest qog'oz, oyoqli metal panjara) bo'lishi kerak.
4. Tez alangalanuvchi moddalar solingan idishlarni ochiq alangada qizdirish va uning yaqinida saqlash mumkin emas.
5. Agar tez alangalanuvchi moddalar yonib ketsa darhol qizdirish manbayini o'chirish va qum sepish yoki maxsus o't o'chirish vositalaridan foydalanish kerak.
6. Ishlayotgan kishining ust kiyimi yonib ketsa darhol qalin mato yopib havoning kirishini to'xtatish lozim.
7. Elektr asbob – uskunalari tokga ulanganda yerlatilishi lozim.
8. Laboratoriya xonalarida har bir elector ulanish nuqtalari (rezetkalar) izolatsiyalangan va kuchlanish volt kattaligi ko'rsatilgan bo'lishi kerak.
9. Ish tugagandan so'ng barcha asbob – uskunalarini tozalab, reaktivlarni joy – joyiga qo'yish, elektr ulagichlarini o'chirib, gaz va suv jo'mraklarini berkitib chiqish va ish joyini tartibga solib, laborantga topshirish talab etiladi.

Birinchi yordam ko'rsatish

1. Teriga kislotalar to'kilsa darhol o'sha joy suv bilan 3–4 marta yuviladi, so'ngra kaliy permanganat yoki natriy bikarbonat tuzining 3% li eritmasiga botirilgan paxta qo'yiladi.
2. Teriga ishqor to'kilganda avval oqar suv bilan toki silliqqligi ketguniga qadar yuvish kerak. So'ngra kaliy permanganatning 3% li, sirka yoki bor kislotaning 2% li eritmasi bilan yuviladi.
3. Ko'zga kislota yoki ishqor sachrasa, ko'zni yaxshilab toza suv bilan yuvish so'ngra vrachga murojoat etish kerak.
4. Alanga yoki issiq ta'sirida kuygan joy kaliy permanganatning 3% li eritmasi, taninning spirdagi eritmasi bilan yuvilib, so'ngra streptasid emulsiyasi surtib bog'lab qo'yish kerak.
5. Xrom, brom, vodorod sulfid, karbon (II) oksidi va simob bilan zaharlanganda ochiq havoga chiqarib, vrachga murojoat qilish lozim.

Eritmalarni tayyorlash

Tarkibida ikki yoki bir nechta moddadan iborat bo'lgan gomogen sistema (tizim)ga eritma deyiladi. Eritmalar erituvchi modda (dispersion muhit) va eruvchi modda (dispersion faza) lardan tashkil topgan bo'ladi. Demak dispersion muhitda dispersion faza zarrachalarining tekis tarqalishi natijasida eritmalar hosil bo'ladi. Dispersion muhit eritmaning tarkibida ko'p miqdorda bo'ladi, masalan, suyuq eritmalar uchun

suv va har xil organik moddalar erituvchi hisoblanadi. Dispersion faza esa, aralashma tarkibida kam miqdorda bo'lib eruvchi modda (tuzlar, ishqorlar, kislotalar) hisoblanadi. Eritmalarda dispersion muhit ham, dispersion faza ham asosan uch xil agregat holatlarda, yani: qattiq, suyuq va gazsimon bo'lishi mumkin. Shunday qilib, dispersion muhit va dispersion fazalarning holatiga qarab eritmalar quyidagi xillarda bo'lish mumkin:

1. *Gaz:Gaz;*
2. *Gaz:Suyuqlik;*
3. *Gaz:Qattiq modda;*
4. *Suyuqlik:Gaz;*
5. *Suyuqlik:Suyuqlik;*
6. *Suyuqlik: Qattiq modda;*
7. *Qattiq modda:Gaz;*
8. *Qattiq modda: Suyuqlik;*
9. *Qattiq modda: Qattiq modda.*

Qattiq eritmalarga (oltin va mis, chuyan), suyuq eritmalarga (suv va spirt) gazsimon eritmalarga (havo) kirishi mumkin. Eruvchi moddaning erituvchi moddada ma'lum hajm yoki og'irlik birligida erigan miqdoriy ko'rsatkich kattaligiga eritmaning konsentratsiyasi deyiladi. Eritma tavsifini ifodalashning quyidagi noaniq konsentratsiyali turlari mavjud:

- konsentrlangan;*
- to'yingan;*
- to'yinmagan;*
- suyultirilgan;*
- o'ta suyultirilgan.*

Eritmaning biokimyoviy tahlillarida foydalaniladigan aniq konsentratsiyali tavsifli turlari jumlasiga :

- foiz (%)li konsentratsiya;*
- molyar (mol\l) konsentratsiya;*
- normal (mol\ ekv\l) konsentratsiya;*
- titr (t.g\ml) konsentratsiya li xillari kiradi.*

Laboratoriya darslarida asosan foizli, molyar va normal eritmalar keng foydalaniladi.

Foizli eritma tayyorlash. Har qanday erituvchi moddaning 100 ml hajmida erigan modda miqdoriga foiz(%)li eritma deyiladi. Masalan: osh tuzining 0,9% li eritmasi (yani fiziologik eritma) ni tayyorlash uchun 0,9g osh tuzini tarozida tortib olib 100 ml li o'lchov silindriga solamiz va o'lchov belgisiga yetguncha distillangan suv qo'shamiz. Suyuq holatdagi konsentrlangan moddalardan foizli eritma tayyorlashda ularning solishtirma og'irliklarini inobatga olish talab

qilinadi. Masalan, sulfat kislotani uning konsentrlangan eritmasidan 10 % li eritmasini tayyorlashda bu eritmaning solishtirma og'irligi 1,84 ga tengligini e'tiborga olib, 100 ml li o'lchov kolbasiga qancha ml konsentrlangan sulfat kislota kerakligini $10:1,84=5,43$ yo'li bilan aniqlanadi. Demak, 100 ml li hajmda 5,43 ml konsentrlangan sulfat kislota distillangan suv qo'shib aralashtirganda, uning 10 % li eritmasi hosil bo'ladi.

Molyar eritma tayyorlash. Erituvchi moddaning bir litr hajmida molyar massa hisobiga erigan moddaning miqdoriy ko'rsatkichiga molyar (M) eritma deyiladi.

Masalan; osh tuzining (NaCl) 1 molyar eritmasini tayyorlashda uning molyar massasi hisoblab topiladi, ya'ni: $\text{Na}=23$, $\text{Cl}=35,5$; demak: NaCl molyar massasi $=23\text{g}+35,5\text{g}=58,5\text{g}$ ga teng. Shunday qilib, osh tuzini 1 molyar eritmasini tayyorlash uchun bir litrli o'lchov idishiga 58,5 g osh tuzi olinib, uning ustiga o'lchov belgisigacha bo'lgan miqdorda distillangan suv qo'shiladi. NaCl ning 2M eritmasini tayyorlash uchun esa 117 g osh tuzi 1l suvda eritiladi.

Sulfat kislota (H_2SO_4) ning 1M eritmasini tayyorlash uchun yuqorida keltirilgan tartibda ish yuritib H_2SO_4 , ya'ni $\text{H}=1\times2=2$; $\text{S}=32\times1=32$; $\text{O}=16\times4=64$, demak sulfat kislotaning molyar massasi: $2+32+64=98$ g ga teng. Demak, sulfat kislotaning 1 molyar eritmasini tayyorlash uchun $98:1,84=53,3$ ml kons. sulfat kislota olinib 1000 ml li hajmni qolgan qismini distillangan suv tashkil qiladi.

Normal eritma tayyorlash. Erituvchining 1 hajmida erigan moddaning gramm ekvivalenti hisobiga eritilgan miqdoriga normal (N) eritma deyiladi. Masalan, osh tuzining 1 N eritmasini tayyorlash uchun, uning molyar massasi hisoblanadi, bu 58,5 ga teng, uning ekvivalenti natriyning valentligi hisobiga 1ga teng. Endi $58,5:1=58,5$ kelib chiqadi demak, Na ning valentligi 1 bo'lganligi sababli molyar massa o'zgarmaydi va shuning uchun 58,5 g osh tuzi 1000 ml hajmda distillangan suv qo'shilsa osh tuzining 1N eritmasi tayyor bo'ladi. Agar $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ning 1N eritmasini tayyorlash kerak bo'lsa, uning molyar massasi hisoblandi va Cu ning valentligiga bo'linadi va suvda eritiladi. $\text{Cu}=64$, $\text{N}=14\cdot2=28$, $\text{O}=16\cdot6=96$, jami $64+28+96=188$ Cu ning valentligi 2 ga teng bo'lganligi uchun $188:2=94$ kelib chiqadi. Demak, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ tuzining 1N eritmasini tayyorlash uchun 94 g tuz olib o'lchov kolbasiga ko'chirib, distillangan suv yordamida hajmi 1000 ml ga yetkaziladi.

O'tilgan mavzuni mustahkamlash uchun savollar.

1. Laboratoriyada ishlash qoidalariga nimalar kiradi?
2. Laboratoriyada qanday gigiyena qoidalariga rioya qilish lozim?
3. Yong'in va texnika xavfsizligi qoidalarini bayon qiling.
4. Eritma nima?
5. Eritmalarning noaniq tavsifli konsentrsiyalariga nimalar kiradi?
6. Aniq konsentrsiya tavsifiga ega bo'lgan eritmalar qaysi xil eritmalar kiradi?
7. Foizli eritma qanday tayyorlanadi?

1-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Tuxum oqsilidan albuminni kristall holda ajratish

Darsning maqsadi: Tuxum oqsilidan albuminni cho'kma holda ajratib olishning turli yo'llarini bajarib xulosaga ega bo'lish.

Nazariy qism: Albuminlar – suvda yaxshi eruvchi oqsillar, ular neytral tuzlarning to'yingan (masalan, ammoniy sulfat) eritmalarida cho'kmaga tushadi. Faqat bir xil kislota tuzini o'zi (ammoniy sulfatdan tashqari) cho'ktirish uchun yetarli bo'lmay tuzlar aralashmasi (osh tuzi va magniy sulfat yoki natriy sulfat va magniy xlorid)dan foydalanishga to'g'ri keladi. Ammoniy sulfat bilan cho'ktirganda albuminlar 65 % li to'yinishdan boshlab cho'ka boshlaydi, cho'kishni nihoyasiga yetkazish uchun esa 100 % gacha to'yintirish kerak. Shuni alohida qayd etish lozimki, albuminlar va globulinlar atamasi bu oqsillarning distillangan suv va $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning yarim to'yinmagan eritmasida erish xossasiga asoslangan. 1-jadvalda albuminlar va globulinlarning eruvchanligi to'g'risidagi ma'lumotlar keltirilgan. Tuxum tarkibidagi oqsilning 70% ini albumin tashkil qiladi. Albuminni globulindan ajratish uchun tuxum oqsili olinib, unga distillangan suv qo'shish yo'li bilan 10% li konsentrasiyaga ega bo'lgunga qadar suyultiriladi. Odatda globulinlar kuchsiz tuzli eritmada yaxshi eriydi, suv qo'shib o'ta suyultirilganda esa, ular cho'kmaga tushadi. Albumin va globulinlarning shu xususiyatlaridan foydalanib, ularni bir biridan ajratib olinadi. Buning uchun yuqoridagi tartibda tayyorlangan tuxum oqsilini 10% li eritmasini sentrifugalanadi yoki filtrlanadi.

1- laboratoriya ish.

Kerakli biomaterial: tuxum oqsili.

Kerakli jihozlar: 100 va 500 ml kimyoviy stakan, 250 va 500 ml silindrlar, kolba, voronka, shisha tayoqcha, filtr qog'ozi, sentrifuga, sentrifuga probirkalari.

Kerakli reaktivlar: distillangan suv, fiziologik eritma (0,9% NaCl).

Ishni bajarish tartibi. Tuxum qobig'ining ikki tomonidan teshikcha ochib, uning oqsili 500 ml li o'lchov silindriga o'tkaziladi va ustiga distillangan suv solib, shisha tayoqcha bilan aralashtirgan holda hajmi 300 ml ga yetkaziladi. Aralashma 30 daqiqa davomida xona xaroratida qoldiriladi. Bu muddat oralig'ida idishning tubida globulinlarning cho'kmasi paydo bo'ladi. Eritma filtr qog'ozidan o'tkazilganda filtr qog'ozda globulin, filtratda esa, albumin bo'ladi. Aralashmani sentrifugalaganda cho'kmaga globulin tushadi, supernatantga esa, albumin.

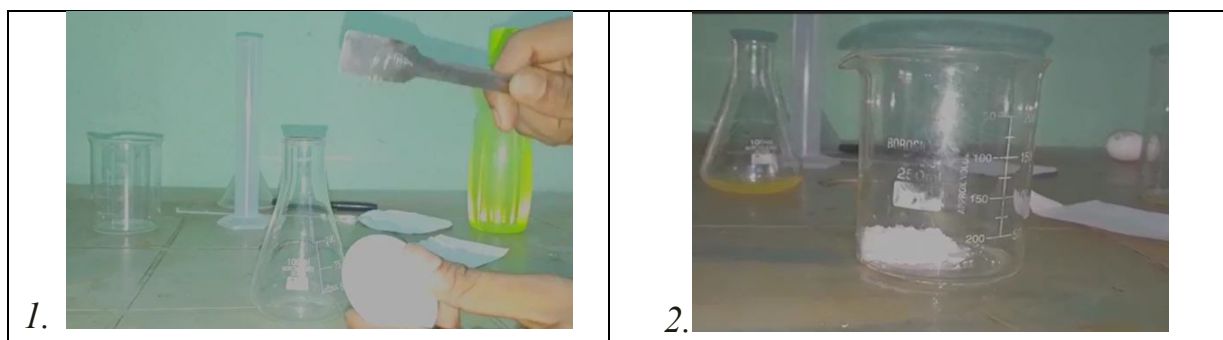
2- laboratoriya ish. Kerakli biomaterial: tuxum oqsili.

Kerakli jihozlar: 50 va 100 ml li o'lchamli silindrlar, shisha voronkalar, shisha tayoqchalar, vakuum ostida filtrlash uchun Byuxner voronkali kolba (Bunzen kolbasi), 50 ml tumshuqli shisha stakan, qog'oz filtrlar, universal indikator qog'ozi.

Kerakli reaktivlar: 2 ta yangi tuxum, ammoniy sulfat (to'yingan), Sulfat ammoniy (kukuni), 5 % li sirka kislota

Ishning borishi: 2 ta yangi tuxumni oqidan sarig'i ajratib olinadi va 100 ml li og'zi bekiladigan o'lchamli silindrga solinadi. Ustiga oldindan tayyorlab qo'yilgan sulfat ammoniyning to'yingan (757 g tuz 1L suvda eritib, suv hammomida qaynatish bilan tayyorlangan) eritmasidan teng hajmda solinadi, og'zi berkitiladi va yaxshilab chayqatiladi. Sulfat ammoniy bilan chala to'yintirilgan holatda avval globulinlar cho'kmaga tushadi. Cho'kmani taxlangan filtr qog'ozi bilan boshqa o'lchamli silindrga filtrlanadi. Tiniq filtrat ustiga ammoniy sulfatning maydalangan kukunidan 100 ml eritmaga 13,5 g tuz hisobi bo'yicha solinadi va shisha tayoqcha yordamida kristallar to'liq erib ketguncha uzoq vaqt aralashtiriladi. Bundan keyin ammoniy sulfatning 70 % li eritmasi hosil bo'ladi va albuminlar cho'kmaga tushadi. Hosil bo'lgan cho'kma Byuxner voronkasida filtrlanadi. Cho'kma ehtiyotlik bilan filtrdan ajratib olinadi, 50 ml li kimyoviy stakanga solinadi va eng kam miqdorda suvda eritiladi. Hosil bo'lgan eritmaga 4 % li sirka kislatasi eritmasidan aralashtirilib turilgan holda eritmani pH ni universal indikator qog'ozi bilan tekshirib turib, tomchilab solinadi. pH ning ko'rsatkichi 4,7-4,8 ga yetganda eritmaga ozginadan sulfat ammoniyning to'yingan eritmasidan aralashtirib turgan holda solinadi. Bu jarayon yo'qolmaydigan loyqa hosil bo'lguncha davom yettiriladi. Stakan toza shisha bilan yopiladi va sovutgichga qo'yiladi. Bir sutkadan keyin tuxum albuminni ninasimon kristallar holda cho'kmaga tushadi(1-rasm).

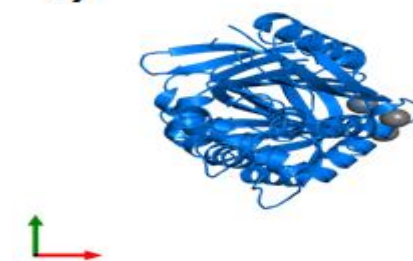
Ishni bajarish tartibi rasmlari sxemasi





1.1-rasm. a-albumin, b-globulin

b)





1. Topshiriq nazorat savollariga javob bering!

1. Oqsillarning asosiy shakllari?
2. Oqsillarning 4 ta sturukturasini bir-biridan farqlarini ayting?
3. Oddiy oqsillar, kimyoviy tarkibi, tuzilishi va funksiya
4. Albumin qanday moddalarda cho'kmaga tushadi?
5. Albumin qanday moddalarda eriydi?

2. Topshiriq "Bumerang" metodi asosida bajaring.

Talabalar kichik guruhlariga bo'linadi. O'qituvchi har bir guruhga vazifa yozilgan material tarqatadi. Har bir guruh talabalari berilgan vazifa bo'yicha o'z fikrlarini bayon qiladi va undan so'ng guruhlar orasida savol-javob ketadi.

1-guruhga beriladigan vazifa

1. albumin oqsili va xossalari
2. 1-labaratoriya ishini xulosalang.

2-guruhga beriladigan vazifa

1. Globulin oqsili va xossalari
2. 2-labaratoriya ishini xulosalang.

3-guruhga beriladigan vazifa

1. 1-va 2-labaratoriya ishini taqqoslang.
2. Quyidagi Sxemadan foydalangan holda albumin cho'kmaga tushadigan eritmalar berilgan variantlarni toping.



2-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Qonda glikoproteidlarni aniqlash

Darsning maqsadi: Qon yoki oqsillar aralashmasi tarkibidagi glikoproteidlarni aniqlash va ularga xos sifat reaksiyalarini bajarish.

Nazariy qism: Glikoproteinlar-oqsillarning karbonsuvlar va ularning hosilalari bilan birikishidan hosil bo'lgan makromolekulalar hisoblanadi. Ular jumlasiga biriktiruvchi to'qimani asosi hisoblangan- xondroitin sulfat kislota, gialuron kislota, interferonlar va qon zardobi tarkibida uchrovchi glikoproteidlarni kiritish mumkin. Bu murakkab oqsillarning funksiyalari ham xilma xildir. Glikoproteidlarga plazma tarkibidagi gaptoglobin, transferrin, trombin, fibrinogen, immunoglobulin kiradi. Glikoproteidlar murakkab oqsillardir, ularning proteid guruhlariga kiradi. Glikoproteidlar deyarli barcha to'qimalarda va tanadagi suyuqliklarda uchraydi, birgalikda **musinlar va mukoidlar** deb ataladi va himoya funksiyalarini bajaradi. Glikoproteidlarni uglevod qismi mukopolisaxaridlardan iborat bo'lganligi uchun **mukoproteinlar** deyiladi. Ularning asosiy vakili musin bo'lib ichki shilliq bezlar sekretida uchraydi. Ichki shilliq qavatdagi musin mexanik, kimyoviy, termik tasirlardan va proteolitik fermentlardan himoya qiladi. Konsentrlangan sulfat kislota geksozalar yoki pentoza bilan o'zaro aloqada bo'lganda, ular suvsizlanadi: furfural pentozalardan, oksimetilfurfural esa geksozalardan hosil bo'ladi. Ular konsentrlangan sulfat kislota ishtirokida timol yoki a-naftol bilan qizil kondensat mahsulotlarini beradi. Glikoproteidlar gidrolizlanganda aminokislotalar bilan birga glukoza unumlari- geksozalar, geksozaminlar, glukuron, neyramin va sirka kislotalarga ajraladi. So'lak glikoproteid tarkibida 40% oqsil, 60% uglevod uchraydi. Glikoprotein – u karbongidratga ega bo'lgan oqsil molekulalarining bir turi. Ayrim uglevodlar jarayon proteinin tarjima paytida yoki glikosilasyon deb nomlangan bir jarayonda posttranslasyonel o'zgarishlar sifatida paydo bo'ladi. Karbongidrat, oqsilning polipeptid yon zanjirlariga kovalent tarzda bog'langan oligosakkarid zanjiridir (glikan). -OH-shakar guruhlari tufayli, glikoproteinlar oddiy oqsillarga qaraganda ko'proq hidrofilikdir.

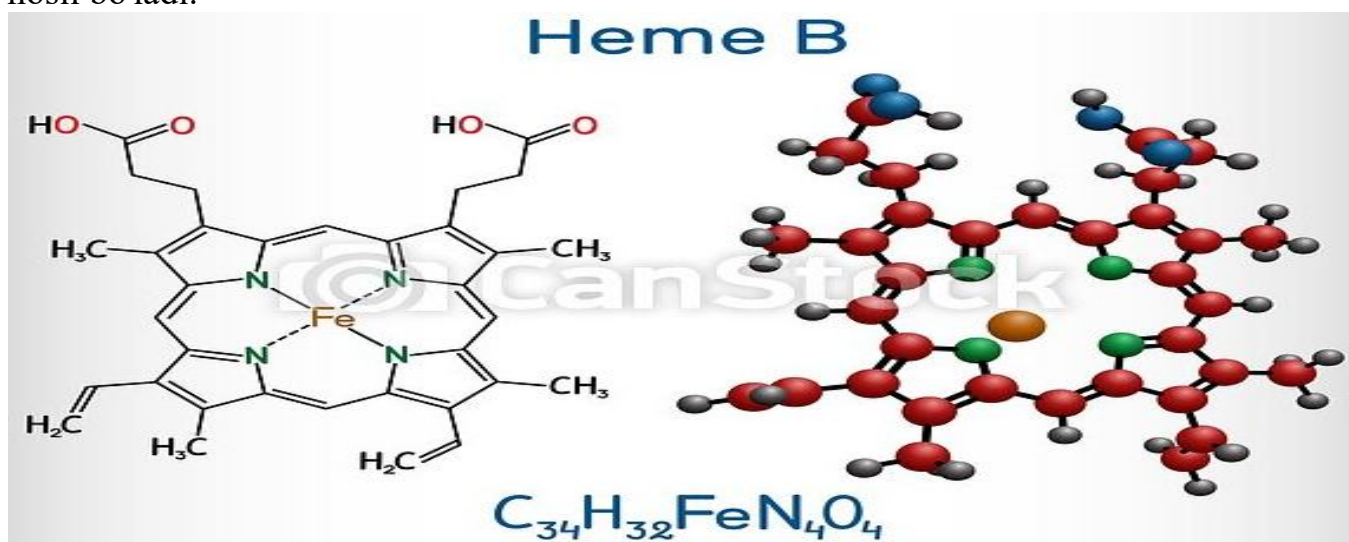
Kerakli biomaterial: qon.

Kerakli jihozlar : probirkalar, shisha tayoqcha, pipetkalar.

Kerakli reaktivlar: konsentrlangan H_2SO_4 , 1% timol eritmasi, konsentrlangan CH_3COOH ,



Ishni bajarish tartibi: Filtrlangan gidrolizatning 10 tomchisiga 2-3 tomchi 1% li timol eritmasi qo'shiladi, aralashtiriladi va probirkaning devoriga 20 tomchi konsentrlangan sulfat kislota tomiziladi. Chayqalganda, probirkaning timol bilan kondensatsiya hosil bo'lishi natijasida probirkaning pastki qismida qizil rang hosil bo'ladi.



2 - rasm.

2-ish.Bologik material: so'lak

Kerakli asboblari : Shisha tayoqchalar, probirkalar, tomizgichlar

Kerakli reaktivlar: 1% li sirka kislota, 10% li NaOH, 1% $CuSO_4$ konsentrlangan H_2SO_4 a naftolning spirtidagi 1 % li eritmasi,

Ishni bajarish tartibi: 1. Probirkaga 5-10 ml so'lak solib, shisha tayoqcha bilan aralashtirib turilgan holatda teng hajmda 1% li CH_3COOH dan qo'shilganda musin cho'kmasi hosil bo'ladi.

2. Musinni shisha tayoqcha bilan ushlab turilgan holatda probirkadagi suyuqlik olib tashlanadi.

3. So'ngra musin cho'kmasi suv bila yuvilib 2 qismga ajratiladi va ular bilan oqsil hamda uglevodga xos reaksiya qilinadi.

a) musin tarkibidaagi oqsilni ochish uchun probirkaga musin cho'kmasining bir qismi solinib ustiga aralashtirilib turilgan holatda 10% li NaOH dan cho'kma eriguncha qo'shiladi va Biuret reaksiyasi musinning oqsil tabiatli ekanligini tasdiqlaydi.

b) Musin uglevodlari naftol probasi yordamida ochiladi. Reaksiya H_2SO_4 ning geksozalari bilan hosil qilgan oksimetilfurfurolning a naftol bilan o'zaro tasirlashishiga asoslangan bo'lib, bunda ularning kondensatsiyalangan rangli unumi hosil bo'ladi.

d) musin cho'kmasining 2-yarmiga 10-20 tomchi a-naftolning spitdagi 1% li eritmasidan qo'shib aralashtiriladi va probirka devori bo'ylab, teng hajmda konsentrlangan sulfat kislotasi qo'shilganda suyuqliklar bo'lingan chegarasida asta sekin qizg'ishbinafsha halqa hosil bo'lishi, musin tarkibida uglevod komponenti borligini tasdiqlaydi. Probirka 1 soatda qoldirilganda bo'yalgan halqa oq fonda aniq ko'rinadi.



1. Topshiriq savollarga javob bering.

1. Oqsil gidrolizi nima va siz gidrolizning qaysi turlarini bilasiz?
2. Murakkab oqsillarning oddiy oqsillardan farqi nimada?
3. Glikoproteidlar nima va ularning uglevodlar guruhiga sifat reaksiyalari qanday?
4. Musin qaysi to'qimada uchraydi?
5. Glikoproteinlarning oqsil qismi nima deyiladi?

2. Topshiriqlar: Quyidagi jadvalni to'ldiring.

№	Murakkab oqsil nomi	Proteid guruhining kimyoviy tuzilishi	Ishlatilgan reaktivlar
1			
2			
3			
4			

3. Mashg'ulot davomida olingan xulosalarni daftarga yozing.

3-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

MUSKUL TO'QIMASIDAN OQSIL FRAKSIYALARINI AJRATISH.

Darsning maqsadi: Muskel to'qimasi tarkibidagi albumin va globulinni eritmaga o'tkazish, tuzlar ishtirokida cho'ktirish va ularni dializ usulida tozalash.

Nazariy qism: To'qimalardan oqsillarni ajratib olish uchun ushbu to'qima hujayralari dezintegratsiyalanadi, ya'ni ular bir-biridan ajratiladi va membranalaridan xalos qilinadi. Buning uchun to'qimalarni gomogenizatsiyalash, ularga ultratovush yordamida ta'sir etish yoki vaqti-vaqti bilan muzlatib eritishni takror - takror qo'llash kabi usullardan foydalaniladi. Shu yo'sinda to'qimalardan gomogenat tayyorlagandan so'ng oqsillarni eritmaga o'tkaziladi – ekstraksiyalanadi. Buning uchun ajratilayotgan oqsilning tabiatiga ko'ra bufer eritma va organik erituvchilardan foydalaniladi. Ular yordamida to'qimadan tayyorlangan gomogenatdan oqsillarning fraksiyalari alohida-alohida fraksiyalanadi. Bunda zamonaviy ultrasentrifugalash, elektroforez, xromatografiya va immunobiologiya usullardan foydalaniladi. Albumin va globulinlar tabiiy manbalarda eng ko'p tarqalgan oqsillar hisoblanadi. Ular odatda birgalikda uchraydi. Ularni ajratish suvda eruvchanligiga va mineral tuzlarda cho'kishiga qarab amalga oshiriladi. Albuminlar suvda va tuzlarning kuchli eritmalarida (tuzlarning 50 % li eritmasidan yuqori bo'lgan to'yingan eritmasida) eriydi. Globulinlar esa, faqat tuzlarning o'rtacha konsentratsiyasida (8-15 %li) eriydi. Tuzlarning juda yuqori va past konsentratsiyali eritmalarida globulinlarning eruvchanligi kamayadi. Mushak to'qimalaridan oqsillarni ajratish Miofibrillalar – qisqaruvchi mushak hujayralari uchun xos birikmalardir. Ular miozin va aktin kabi qisqaruvchi oqsillar, tropomiozin va troponin kabi boshqaruvchi oqsillardan iborat. Miofibrill oqsillari suvda erimaydi, ammo bu oqsillarni 0,5 mol tuz eritmasi yordamida ajratib olish mumkin. Sarkoplazmaning (mushak hujayrasi gialoplazmasi) ko'pchilik oqsillari suvda yoki kuchsiz tuz eritmasida eriydi. Bu fraksiyada mushak oqsillaridan tashqari boshqa a'zolarida uchraydigan oqsillar ham uchraydi. Mushak to'qimalariga 5% li kaliy xlorid eritmasi ta'sir ettirilganda miofibrill va sarkopolazma oqsillari ajraladi.

Kerakli biomaterial: mushak to'qimasi.

Kerakli jihozlar: sentrifuga, sentrifuga tarozisi, sentrifuga probirkalari, chinni hovoncha, shisha kukun, oddiy probirka va shtativlar, shisha tayoqcha, pipetka, filtr qog'ozi, doka va voronkalar,

Kerakli reaktivlar: kaliy xloridning 5% li eritmasi, natriy gidroksidning 0,1 M eritmasi, uchxlorsirka kislota (UXSK)ning 10% li eritmasi.

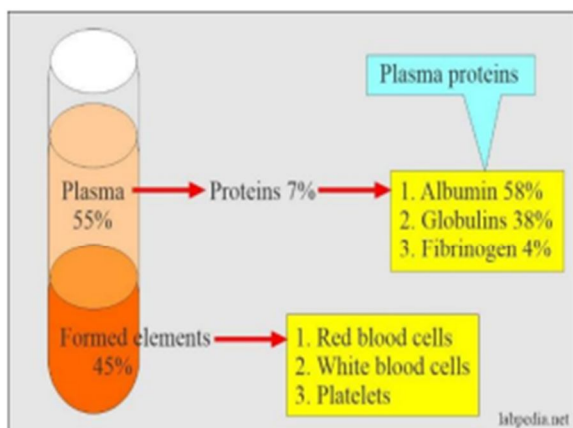
Ishni bajarish tartibi. Mushak to'qimasi yog'lardan, payli qismidan, mushak pardasidan ajratib, tarozida 2 g tortib olinadi va yaxshilab qaychi bilan maydalab, havonchaga solinadi. Uning ustiga 2 ml 5% li kaliy xlorid eritmasi va shisha kukuni solib, yaxshilab yanchiladi. So'ng aralashmaga yana 3 ml kaliy xlorid eritmasi qo'shib, 5 daqiqa davomida yanchishni davom ettiriladi. Shu yo'sinda aralashma gomogen holatga keladi, uni gomogenat deyiladi.

Gomogenat ikkita sentrifuga probirkalargao'tkaziladi, bunda shisha qum qoldiqlari havonchada qoladi. Probirkalardagi aralashmalar sentrifuga tarozisida ko'chiriladi va 5% li kaliy xlorid eritmasiyordamida muvozanatlanadi. So'ngra probirkalar sentrifugaga joylashtiriladi va 1000 g/daqiqa aylanish tezligida 5 daqiqa davomida aylantiriladi. Bunda

cho'kma usti suyuqligi (supernatant), ya'ni xaqiqiy gomogenat ikkita boshqa probirkalarga ko'chiriladi va yana muvozanat holatga keltiriladi, probirkalar tubidagi cho'kma esa, faqat shisha koldiqlaridan iborat bo'lganligi uchun tashlab yuboriladi. Supernatantli probirkalar

sentrifugaga joylashtirilib 4000g/daqiqa aylanish tezligida 15 daqiqa davomida aylantiriladi. Bunda hujayra bo'lakchalari, parchalanmagan hujayralar, biriktiruvchi to'qima tolalari cho'kmaga tushadi va u tashlab yuboriladi. Supernatant mushak oqsillarini ekstrakti hisoblanadi va uni keyingi tajribalarda oqsillarga xos reaksiyalarni bajarishda ishlatish uchun alohida idishga solib sovitqichga ko'chiriladi.

ajratib, tarozida 2 g tortib olinadi va yaxshilab qaychi bilan maydalab, havonchaga solinadi. Uning ustiga 2 ml 5% li kaliy xlorid eritmasi va shisha



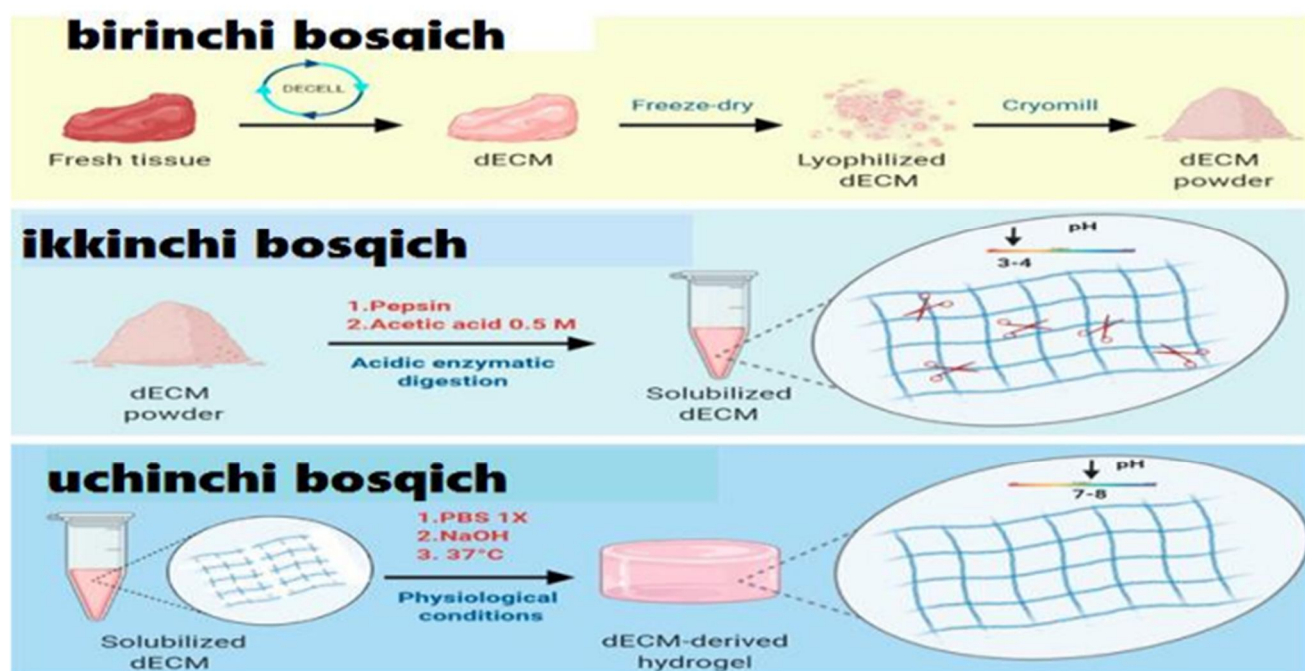
kukuni solib, yaxshilab yanchiladi. So'ng aralashmaga yana 3 ml kaliy xlorid eritmasi qo'shib, 5 daqiqa davomida yanchishni davom ettiriladi. Shu yo'sinda aralashma gomogen holatga keladi, uni gomogenat deyiladi. Gomogenat ikkita sentrifuga probirkalargao'tkaziladi, bunda shisha qum qoldiqlari havonchada qoladi. Probirkalardagi aralashmalar sentrifuga tarozisida ko'chiriladi va 5% li kaliy xlorid ertimasiyordamida muvozanatlanadi. So'ngra probirkalar sentrifugaga joylashtiriladi va 1000 g/daqiqa aylanish tezligida 5 daqiqa davomida aylantiriladi. Bunda cho'kma usti suyuqligi (supernatant), ya'ni xaqiqiy gomogenat ikkita boshqa probirkalarga ko'chiriladi va yana muvozanat holatga keltiriladi,(3-rasm.)



5-рasm.

Мускул то'qimasini tuzli aralashmasini dializ qilish.2-ish Dializ metodi katta oqsil zarrachalarini yarim o'tkazgich bo'lgan pardadan (sun'iy kolloid membranalar va tabiiy hayvon va o'simlik membranalari) o'ta olmasligiga asoslanadi. Boshqa molekulalar va ionlar bulardan osongina o'ta oladi. Dializ usuli yuqori molekulali birikmalarni tuzlar va boshqa moddalardan tozalash uchun foydalaniladi. Bu usul bilan tozalangan oqsil dializlangan deyiladi. Dializ uchun ishlatilgan asbob dializator deyiladi. Eng oddiy dializator bo'lib, distillangan suvli stakanga solingan sellofan yoki solloid xaltacha xizmat qiladi. Dializ tez va to'liq amalgam oshishi uchun stakan oqar suvga ulangan bo'lishi yoki stakandagi suv to'xtovsiz almashtirib turilishi lozim. Dializatorni tayyorlash. Sellofan 9-12 sm diametrli doira kesib olinadi. Uni xalta shaklida bukiladi. Hosil bo'lgan xaltacha shisha tayoqchaga boylanadi va stakanga tagi tegmaydigan qilib osiladi. Kichkina voronka yordamida dializatorga 10 ml tuzli aralashmaning filtratidan solinadi (solingan suyuqlik xaltachaning yarmidan oshmasligi kerak) va 1 litrli distillangan suv solingan stakanga joylashtiriladi. Shunadan keyin xar 5- 10 minut davomida stakandagi suvdan olib, unga sulfat ionlarini borligini (bariy gidroksid yordamida) va oqsilni yo'qligiga (biuret reaksiyasi yordamida) tekshirish uchun reaksiyalar o'tkaziladi. Stakandagi suv almashtirilgandan keyin yana shu reaksiyalar qilib ko'riladi. Agar reaksiya chiqsa, stakandagi suv 5-10 minut davomida almashtirilib, reaksiya chiqmaguncha amalgam oshiriladi. 1,5-2 soatdan keyin sulfat ionlari uchun olib borilgan reaksiya chiqmaydi. Bu dialilzning tugaganligidan darak beradi, ya'ni bunda dializatoridagi tuz to'liq stakandagi suvga chiqib ketgan bo'ladi. Shu paytda xaltachadagi tiniq bo'lgan filtrati loyqalanadi. Natijada distillangan suvda eriydigan globulinlar cho'kmaga tushadi. Xaltacha stakandan olinadi va uning ichidagisi qog'oz filtr orqali filtrlanadi. Filtrda globulinlar qoladi, albuminlar esa filtratga o'tadi. Ikkala tomonda ham oqsil borligi biuret reaksiyasi yordamida aniqlanadi.

6-rasm. Muskul to'qimasidan oqsilni ajratish sxemasi



Albuminlarni cho'ktirish uchun filtratga ammoniy sulfatning kukunidan eritma to'yingan holga kelguncha solinadi. Bunday sharoitda albuminlar cho'kmaga tushadi. Keyin quruq qog'oz filt yordamida filtrlanadi. Ammoniy sulfat bilan to'liq to'yintirilganda, eritmada oqsil qolmaydi. Buni tekshirish uchun filtratdan ozgina olib biuret reaksiyasini o'tkazib ko'rish kerak. Muskul oqsillarini tuzlash. Tuzli aralashmaning oqsillarini ajratish uchun tuzlash usuli ham qo'llaniladi. Bu usul albuminlar bilan globulinlarni tuzlarning turli konsentratsiyasida cho'kishiga asoslangan. Muskul to'qimasidan ajratib olingan tuzli aralashmaga ammoniy sulfatning to'yingan eritmasidan teng hajmda solinadi. Bunda dastlab globulinlar cho'kmaga tushadi. Eritma filtrlanadi va filtrat ammoniy sulfat qo'shib to'yintiriladi. Natijada albuminlar cho'kmaga tushadi



1. Topshiriq savollarga javob bering.

1. Dializ usulini ahamiyati nimada?
2. Albuminlarni cho'ktirish uchun qaysi reaktivdan foydalaniladi?
3. Dializator qanday tayyorlanadi?
4. Tajriba bajarish uchun kerakli jihozlarni alohida, reaktivlarni tayyorlang.

2. Topshiriq test savollariga javob bering.

1. Oqsillar denaturatsiyasi natijasida qanday o'zgarishlar ro'y beradi ?

- A) Oqsillarning strukturasi o'zgarmaydi
- B) Oqsillar rangi o'zgaradi
- C) Oqsillarning biologik vazifasi o'zgarmaydi

D) Oqsillar o'zgarmaydi

2.Oqsillarni sinflarga bo'linishi nimaga asoslanadi ?

A) Oqsil molekulasining shakliga

B) Ulardagi prostetik guruhlariga

C) Oqsillarning molekular massasiga

D) Oqsillarning funksiyalariga ko'ra

3.Oddiy oqsillar tartibi nimalardan iborat ?

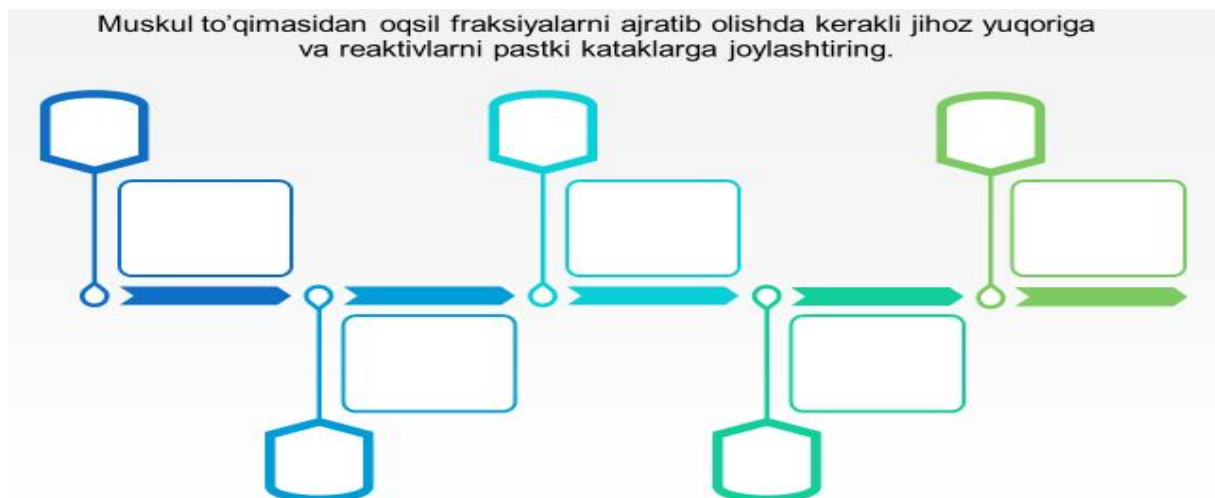
A) Aminokislotalardan

B) Aminokislota va boshqa moddalardan

C) Aminokislota va uglevodlardan

D) Aminokislota va lipidlardan

3.Topshiriq quyidagi **INSERT JADVALI** metodi yordamida ketma-ketlikka e'tibor berib bajaring.



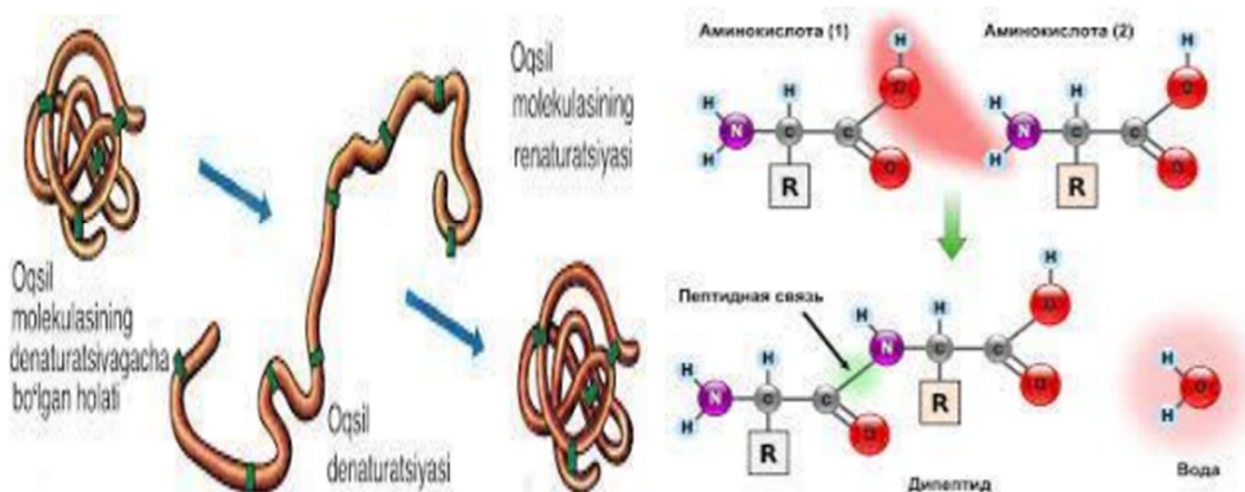
4-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Bug'doy unidan oqsillarni ajratish va ular tarkibni o'rganish

Darsning maqsadi: Bug'doy uni tarkibidagi oqsillarni ajratib olish, tarkibini o'rganish va ularga xos tajribalar o'tkazish

Nazariy qism: Oqsillar-yuqori molekulyar organik birikmalar, tirik hujayra strukturasi tuziladigan asosiy material hisoblanadi. To'qimalarda oqsilning yig'indi miqdori, ulardagi umumiy azot miqdorini 6,25 koeffitsientiga ko'paytirib topiladi. Barcha oqsil moddalar ikkita guruhga bo'linadi: oddiy (proteinlar) va murakkab (proteidlar). Oddiy oqsillar gidroliz natijasida faqat aminokislotalarga parchalanadi. Murakkab oqsillar tarkibiga esa aminokislotalardan tashqari oqsil tabiatiga ega bo'lmagan moddalar-nuklein kislotalar, lipidlar, pigmentlar, fosfat kislotalari, metallar va boshqalar kiradi. Aminokislota va oqsillar amfoter xarakterga egadir. Erkin amino-va karboksil gruppalar dissotsiatsiyasida ular qutublanadilar. Aminokislota, peptid va oqsillarga bo'lgan sifat reaksiyalari ikki guruhga bo'linadi: a) peptid va aminokislotalar bilan amalga oshadigan reaksiyalar; b) oqsil molekulalarining fizik-kimyoviy xususiyatlarini o'zgarishi bilan amalga oshadigan cho'ktirish reaksiyalari.

Bug'doy (arpa,suli)ni umumiy oqsillarini ajratib olish O'simlik oqsillarini ajratib olish uchun tadqiq qilinadigan obyekt tarkibidagi oqsil fraksiyasining xossasiga qarab turli erituvchilardan foydalaniladi. Odatda bug'doy, arpa va suli urug'lari tarkibidagi oqsillar NaOH ning 0,2 % li eritmasida yaxshi, NaOH ning shu konsentratsiyadagi 50-60 % li spirtida tayyorlangan eritmasida undan ham yaxshi eriydi. Shu o'simliklarning unini natriy ishqorini spirtli eritmasi yoki suvdagi eritmasi bilan ishlov berganda eritmaga albumin, globulin, prolamin va glyutelin oqsillarilari o'tadi. Prolamin va glyutelinlar tarkibida ko'p miqdorda prolin va glyutamin aminokislotalari bo'ladi. Mazkur reaksiyalarni amalga



osHIRISH uchun dastavval oqsillarni biologik materialdan ajratib olish zarur. O'simlik oqsilli eritmalarini tayyorlash. 40 gramm bug'doy unini kimyoviy kolbada 160 ml distillangan suvga solib, aralashtiriladi hamda kolba sovitgich shkafiga (1-20°C) bir sutkaga qo'yiladi. So'ng eritma aralashtiriladi, avval gigroskopik momiq paxta keyin esa qavatli qog'oz filtr orqali filtrlanadi. Eritma asosan albuminlarni tutadi. Eritma sovitgichda saqlanadi.

Kerakli biomaterial: bug'doy, arpa va suli unlari.

Kerakli jihozlar: shtativ, probirkala, pipetkalar, chinni hovoncha, idishchalar.

Kerakli reaktivlar: NaOH ning 0.2 % li 50-60% li spirtidagi yoki NaOH ning o'zini 0.2 % li eritmasi.

Ishning bajarilishi: 1- ish. 40 gramm bug'doy unini kimyoviy kolbada 160 ml distillangan suvga solib, aralashtiriladi hamda kolba sovitgich shkafiga (1-20°C) bir sutkaga qo'yiladi. So'ng eritma aralashtiriladi, avval gigroskopik momiq paxta keyin esa qavatli qog'oz filtr orqali filtrlanadi. Eritma asosan albuminlarni tutadi. Eritma sovitgichda saqlanadi

2-ish. Bug'doy (arpa, suli)lardan albumin oqsilini ajratib olish Bunda oldingi ishda (1-chi) bug'doy (arpa, suli)larning umumiy oqsillarini ajratib olish amalga oshirilgan bo'lib, ajratib olingan oqsilning tarkibi albumin, globulin, prolamin va glyutelinlardan iborat bo'ladi. Bu biomateriallar tarkibidagi albuminni ozmi-ko'pmi yuqori tozalik darajasida ajratib olish uchun ushbu ishni bajarish lozim bo'ladi.

Kerakli biomaterial: bug'doy, arpa va suli unlari.

Kerakli jihozlar: kolbalar, silkitib - aralashtiruvchi asbob, filtr qog'oz, voronka.

Kerakli reaktivlar: distillangan suv. 2l

Ishni bajarish tartibi. 25 g bug'doy yoki arpa, yoki suli uni olib kolbaga solinadi, uni ustiga 100 ml distillangan suv qo'shib 1 soat davomida yaxshilab aralashtiriladi. Aralashtirish jarayonini samarali bo'lishini ta'minlash uchun kolbadagi aralashmani silkitib - aralashtiruvchi asbobga o'tkaziladi. So'ng aralashmani sentrifugalanadi. Cho'kma tashlab yuboriladi, cho'kma usti suyuqligi esa filtr qog'oz orqali filtrlanadi. Filtrlangan tiniq eritma nisbatan toza holda bo'lgan albumin hisoblanadi. Chunki bunda globulin, prolamin va glutelinlar suvda erimaganligi sababli cho'kmaga tushadi.



Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. To'qimalarda oqsilning yig'indi miqdori qanday topiladi?
2. bug'doy, arpa va suli urug'lari tarkibidagi oqsillar qanday eritmalarda yaxshi eriydi?
3. Barcha oqsil moddalar necha guruhga bo'linadi?

4. Aminokislota, peptid va oqsillarga bo'lgan sifat reaksiyalarini to'liq izohlab bering

2. Topshiriq quyidagi jadvalda juftlikni toping.

1	Murakkab oqsillar	F	NaOH 0,2% li eritmasi	
2	Oddiy oqsillar	K	Ferritin	
3	Oqsillar yaxshi eriydi	C	NaOH % 0,2 % LI 50-60% li spirtidagi eritmasi	
4	Oqsillar juda yaxshi eriydi	D	o'simlik qiyg'os gullaganida alohida-alohida yoki mayda gullari bilan gul to'plamining hammasi kesib olinadi	

5-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Murakkab oqsillar tarkibini aniqlash

Darsning maqsadi: Fosfoprotein oqsili kimyoviy tarkibini o'rganish, sutdan kazein oqsilini ajratish va uning takibidagi qismlariga xos tajribalar bajarish.

Nazariy qism: Fosfoproteidlar oddiy oqsil va oqsil bo'lmagan qism - fosfor kislotasidan tashkil topgan murakkab oqsillardir. Fosfor kislotasi oqsil bilan gidroksiamin kislotalarning gidroksil guruhi - serin va treonin orqali bog'lanadi. Ushbu oqsillar guruhiga sut kazeinogen, tuxum sarig'i vitellin va boshqalar kiradi. Fosfoproteinlar embrionlarning rivojlanishi uchun ozuqaviy materiallardan biri bo'lib xizmat qiladi. Sut tarkibida oddiy oqsillardan: albumin, globulin uchrasa, murakkab oqsillar sinfiga mansub bo'lgan fosfoproteidlarning vakili kazein oqsili bor. Kazein sut oqsillarining 80% ini tashkil qiladi. Kazein nordon xossaga ega bo'lib, uning izoelektrik nuqtasi pH 6,7 atrofida bo'ladi. Sut tarkibidagi kazein kalsiy tuzlari bilan birikkan bo'lib, erigan holatda bo'ladi. Sut achiganda yoki kislota qo'shib nordonlashtirilganda, oqsilli quyqa (tvorog) hosil bo'lib, u cho'kmaga tushadi.

Kerakli biomateriallar: sut

Kerakli jihoz: voronkalar, filtrlar, probirkalar, shisha tayoqcha, pipetkalar, spiral lampa.

Kerakli reaktivlar: (1-ish) CH_3COOH , 1% CuSO_4 eritmasi, 10% NaOH eritmasi, 10% HNO_3 eritmasi, fenoltalein, molibden reaktivi, xlorid kislotaning 1% li eritmasi, distillangan suv, natriy gidroksidning 10% li eritmasi, nitrat kislotaning konsentrlangan eritmasi, molibden reaktivi (tayyorlash: 7.5g ammoniy molibdat 50 ml kons. nitrat kislotada eritiladi), mis sulfatning 1% li eritmasi. **11-rasm.**



1-ish. Ishning bajarilishi: 2 ml yangi sut olinib, teng miqdorda distillangan suv qo'shib suyultiriladi. 2 tomchi 10% sirka kislota qo'shiladi. Kazeinning pag'a pag'a cho'kmasi hosil bo'ladi. Cho'kma filtrlanib olinib, distillangan suv bilan yuviladi.

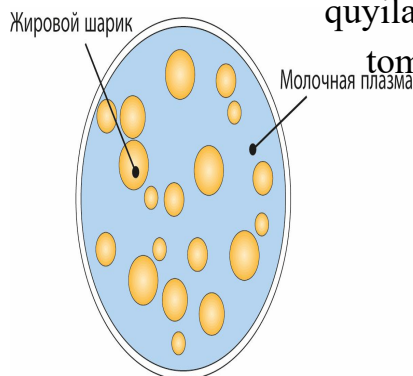
1. Kazeinni gidrolizi. Sutdan ajratilgan kazein probirkaga solinadi va unga 2 ml 10% natriy gidroksid eritmasi qo'shiladi. Qaytgan kondensator bilan asbest panjarasida 10-15 daqiqa davomida qaynatiladi, so'ngra probirkani sovutib, gidroliz mahsulotlari uchun reaksiya o'tkaziladi.

2. Oqsilni aniqlash. Protein biuret reaksiyasi bilan aniqlanadi. Probirkada gidrolizatning uch tomchisiga mis sulfatning 1% eritmasidan bir tomchi qo'shiladi. Pushti binafsha rang paydo bo'ladi.

3. Fosfatni aniqlash. Qolgan gidrolizat bir necha tomchi nitrat kislota eritmasidan bir necha tomchi bilan 1-2 tomchi fenolftalein ishtirokida (rang o'zgarguncha) kislotalanadi va quruq probirkaga suziladi. 5 tomchi filtrga 20 tomchi molibden reaktivi qo'shiladi va bir necha daqiqa davomida qaynatiladi. Suyuqlik sarg'ayadi, so'ngra sovutganda fosformolibden ammoniyni sariq cho'kmasi cho'kadi, bu esa gidrolizatda fosfat borligini ko'rsatadi:



2-ish. Hajmi 50 ml bo'lgan kimyoviy stakanga 3 ml sut va 7 ml distillangan suv quyiladi. Suyuqliklar yaxshilab aralashtiriladi va ustiga 10-15



tomchi 1% li xlorid kislota eritmasi tomiziladi. Kislota juda ehtiyotkorlik bilan tomchilab solinadi, chunki xlorid kislotaning ortiqcha miqdori kazein oqsili cho'kmasini eritib yuborishi mumkin. Oradan 3-5 daqiqa o'tgandan keyin kazein oqsilidan iborat cho'kma hosil bo'ladi. Cho'kma usti suyuqligi alohida idishga to'kib olinadi. Cho'kma ustiga uni tarkibidagi xlorid kislotadan ajratish

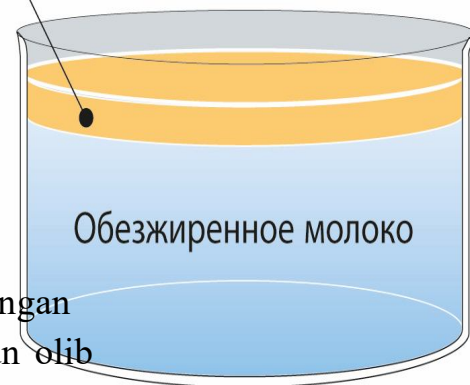
uchun 10 ml distillangan suv solib, 5 daqiqa qoldiriladi. Cho'kmaga qo'shilgan suv oldingi to'kib

cho'kma usti suyuqligi quyilgan idishga o'tkaziladi. Cho'kmaga takroran 10 ml distillangan suv solib, cho'kma tarkibidagi xlorid kislotaning ortiqcha qismi yuviladi va aralashma tingandan so'ng, uni ham cho'kma usti suyuqligi yig'ilgan idishga o'tkaziladi. Cho'kmani qog'oz filtr orqali filtrlanadi va filtrda 2-3 marta suv yugirtirib yuviladi. Filtrat ilgari cho'kma usti suyuqligi solingan idishga yig'iladi va keyinga ishlarda foydalanish uchun olib

qo'yiladi. Tarkibida kazein(+yog') bo'lgan cho'kmaga 1% natriy ishqori qo'shib eritiladi. Bunda kazein erib ketib yog' eritmada muallaq holda bo'lib qoladi. Suyuqlik namlangan qog'oz filtr orqali filtrlanganda yog'

filtr qog'ozda qolib ketib, kazein oqsili esa, filtrat tarkibida bo'ladi. Bu ajratib olingan aralashmani «kazein oqsili» deb nomlab alohida idishga solinadi va keyingi tajribalarda foydalanish uchun olib qo'yiladi. Yuqoridagi tajribalar davomida kazeinni ajratib olishda yig'ilgan suyuqliklarni birlashtiriladi va ularning tarkibidagi albumin hamda globulinlarni ajratib olish uchun natriy xlorning to'yingan eritmasidan yoki tuzning kukunidan barqaror cho'kma hosil bo'lgungacha qo'shib aralashtiriladi. Cho'kmani filtrlanadi va suv bilan yuvilgandan so'ng fiziologik eritmada eritiladi. Hosil bo'lgan aralashmani "sut

Слой сливок



Обезжиренное молоко

albumini va globulini” deb nomlab alohida idishga solinadi va keyingi tajribalarda foydalanish uchun olib qo‘yiladi.



1.Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

- 1.Fosfoproteinining o‘ziga xos xususiyatlar nima?
2. Fosfoproteinlar qanday ahamiyatga ega
- 3.sut tarkibidan kazein qanday ajratib olinadi?
- 4.Kazein tarkibidagi fosfat kislotani aniqlashda qaysi reaktivlar qo‘llaniladi?

2.Topshiriq.Keys stady metodidan foydalangan holda kichik guruhlariga bo‘lingan holda bajaring.



6-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Oqsillarni gel filtratsiya usuli yordamida tozalash.

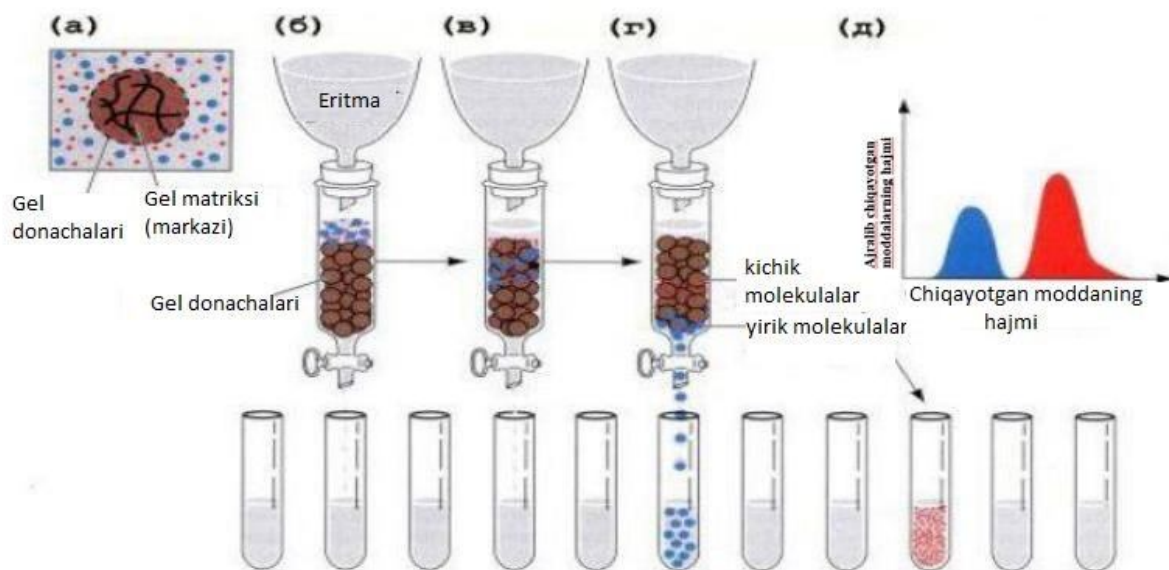
Darsning maqsadi: Oqsillarni gel filtratsiya usuli bilan tozalash, gel turlari bilan tanishish

Nazariy qism: Gel-filtratsiya (gel xromatografiya) – mazkur usul moddalarni ajratish katta molekulalar gelni ya'ni harakatsiz fazani ichiga kira olmasdan tashqarida qolishlari va harakatchan faza bilan kolonka bo'ylab pastki tomonga harakatlanishiga asoslangan. Tahlil qilinayotgan birikma molekulalarining kirib borish qobiliyati shishgan gelning zarralari tomonidan so'rilgan erituvchi darajasiga bog'liq. Gel zarralarining g'ovakligi va birikma molekulalarining kattaligi tarqatishda shishgan gel bilan to'ldirilgan ustun ustidagi moddalar hamiga bog'liq (gel zarralari ichida va tashqarisida erituvchi hajmi). Gel-filtratsiya uslubi moddalarni o'lchami, og'irligi, shakliga ko'ra ajratishga asoslangan. Bu uslub yordamida oqsillarni molekulyar og'irligiga ko'ra ajratish, oqsil fraksiyalarini tozalash, oqsil eritmalarini konsentrlash (quyultirish), tuzsizlantirish va oqsillarning molekulyar og'irliklarini aniqlash mumkin. Bu jarayonlarning barchasi «molekulyar elak» prinsipida amalga oshiriladi. «Molekulyar elak» vazifasini bajaruvchi gel donachalari bilan to'lg'izilgan kolonka orqali oqsil aralashmasi o'tkazilganda kichik molekulalar gel g'ovaklarida tutilib qoladi. Natijada ularning harakati sustlashadi. Yirik molekulalar gel ichiga kira olmaydi. Shu sababli, dastlabki fraksiyalarda yuqori molekulyar, keyingilarida esa kichik molekulyar oqsillar yig'iladi. Kichik hajmga ega bo'lgan molekulalar esa donalar ichiga erkin ravishda shimiladi. Keyinchalik gel ichiga kirib olgan moddalar elyuirlovchi suyuqlik tezligini oshirish orqali yuvib chiqariladi. Gel xromatografiyada ajratib olinishi kerak bo'lgan modda xususiyatidan kelib chiqqan holda, sefadeksni turli ko'rinishlaridan foydalaniladi. Gel - bu geterogen tizim bo'lib, unda harakatchan faza (odatda suvli) har doim statsionar yoki qattiq faza teshiklari ichida joylashgan bo'lib, gel matritsasi deb ataladi.

Kerakli asboblari: kolonka, menzurkalar, stakanchalar.

Reaktivlar: gel, buffer eritma, NaCl, etanol, distillangan suv.

Biomaterial: oqsil eritmasi.



14-rasm. Moddalarni gel — filtratsiya uslubida ajratishning sxematik tasviri
Ishning bajarilishi

1. Gel tanlash(sorbent tanlash).

Past bosim gel turlari

1. Agaroz-bog' orqali bog'langan b-D-galaktopiranoza va 3,6-angidrid-a-L-galaktopiranozaning o'zgaruvchan qoldiqlaridan hosil bo'lgan chiziqli polisaxarid. Erish harorati 95 ° C, gel harorati 45°C.
2. Dekstran bu polisaxarid, o'rtacha zanjir og'irligi 3 dan 20000 kDa gacha bo'lgan glyukozaning tarmoqlangan polimeri . Asosiy zanjir a-1,6 bog'lanish bilan bog'langan molekulalardan, yon shoxlar esa a-1,3 bog'lanishlar bilan bog'langan. Dekstran ba'zi sirka kislotali bakteriyalar tomonidan saxarozadan sintezlanadi.
3. Poliakrilamid (qisqartirilgan PAA) - akrilamid va uning hosilalariga asoslangan polimerlar va kopolimerlar guruhining umumiy nomi. Poliakrilamid makromolekulasining elementar birligi IUPAC qoidalariga ko'ra, asosiy nomi poli (2-propenamid) yoki poli (1-karbamoiletlen), umumiy formulasi (-CH₂CHCONH₂-) n.
4. Sefadeks, 5-Sefakril, 6- Sefaroza, 6- Superdex.

Yuqori bosimli gel turlari

1. Polimetakrilat
 2. Polistirol - bu stirolning polimerlanish mahsuloti (vinil benzol), chiziqli tuzilishdagi termoplastik polimer
- Gel sifatida suvda, tuzli, tuzsiz kislotali, ishqoriy eritmalarda erimaydigan, yuqori gidrofil, kuchli bo'kuvchi polimerlar qo'llaniladi. Shunday gellardan biri «Farmatsiya» nomli shved firmasining sefadekslaridir. Sefadekslar glyukozaning tabiiy polimeri — dekstringa epixlorgidrin ta'sir ettirib olinadi.

Bunga dekstrinning uzun zanjiri uchburchak g'ovak hosil qilib birikadi.

G'ovakning o'lchami epixlorgidrinning miqdoriga bog'liq. Sefadekslar G (G) harfi bilan belgilanib, «suvni yutish hajmi» bilan farqlanadilar.

Sefadekslarni bo'ktirishda odatda kuchsiz kislotali eritmalardan foydalaniladi, chunki kuchli kislotali muhit sefadekslarning glikozid bog'lariga ta'sir ko'rsatadi.

Barcha gellar tez bo'linadi, lekin bo'kish to'liq borishi uchun ularni ma'lum muddat eritmada ushlash lozim. Agar gel to'liq bo'kmagan bo'lsa, bu jarayon gel bilan to'ldirilgan kolonkada davom etadi. Natijada gel donachalari zichlashib eritmaning o'tishini qiyinlashtiradi. Ishlatib bo'lgach sefadeksni avtoklavda (100°C da, 40 min) sterilizasiya qilish mumkin.

Sefadeks turlari

Gel turlari	Molekulyar og'irligiga ko'ra ajratish qobiliyati, Daltonda	Quruq gelda g/suvni yutilishi	Bo'kkan gelning hajmi qu sm ³ /g, gelga nisbatan
G-10	700 gacha	1,0	2
G-15	1500 gacha	1,5	3
G-25	1000-5000	2,5	5
G-50	1500-30000	5,0	10
G-75	3000-80000	7,5	12-15
G-100	4000-150000	10,0	15-20
G-150	5000-300000	15,0	20-30
G-200	5000-600000	20,0	30-40

2.Namuna tayyorlash. To'g'ri tayyorlangan namuna kolonkalarining ishlash muddatini uzaytiradi. Buferning tarkibi taqsimlanishga ta'sir etmaydi. 34 mkm va undan kichik bo'lgan zarrachalarning namunasida qattiq qism bo'lmasligi kerak.

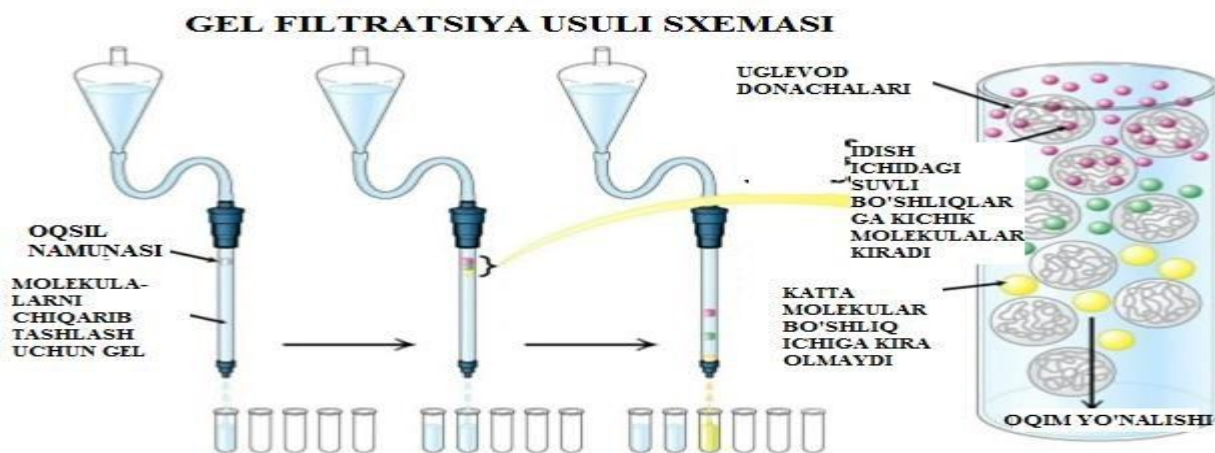
3.Kolonkani tayyorlash. Gel filtratsiyaning kolonkasini tayyorlashda kolonkaning to'g'ri to'ldirilishi hal qiluvchi qiymatga ega. Kolonkaning uzunligi ikki faza o'rtasidagi proporsional bo'luvchi hal qilish xususiyatiga ega.

Kolonkani mustaqil to'ldirishda quyidagi qoidalarga rioya etishingiz shart. Sefakril qavatlari uchun kolonka balandligi =min 50 sm, superdeks va suporoza

uchun kolonka balandligi = min 30 sm. Gelning hajmi namunaga qarab o'lchanadi. Har bir tajriba o'ziga xos yo'riqnoma asosida bajariladi.

4. Buffer tayyorlanishi. Bufer tanlanmasi taqsimlanish effektiga ta'sir etmaydi. Tanlangan buffer eritma namuna uchun faol va stabil bo'lishi kerak. Buferning konsentratsiyasi pH ni bir me'yorda saqlashda to'g'ri bo'lishi kerak. NaCl ning ion kuchi 150 mm da yuqori bo'lmasligi kerak. Bu ion markazidagi stabillikni saqlab turish uchun ahamiyatli.

5. Geldagi oqsil fraksiyalarini aniqlash. Poliakrilamid geli ustunchasida fraksiya qilingan oqsil fraksiyalari amidoshvars 10 V yoki 0.2 % li havorang qum bo'yoqlari yordamida bo'yaladi. Havo rang kumasining sezgirligi ancha yuqori bo'lishi bilan bir qatorda, uni gel ustunchalaridan yuvilishi qiyin va ancha vaqt talab qilinadi. Bo'yash uchun poliakrilamid geli ustuni amidoshvrs 10V ning 7% sirka kislotadagi, 0.1 % foizli eritmasi yoki methanol sirka kislotasi, suv (10:1:30) aralashmasidagi havorang kumasining 0.2% li eritmasida 1 soat davomida qoldiriladi. Natijada gel ustunchasi to'q rangga bo'yaladi, oqsilli joylar bo'yoqni mahkam bo'glab qoladi. Ortiqcha bo'yoqni metanolsirka kislotasi –suv (10:1:30) aralashmasida yuviladi. Bu aralashma bo'lmaganida tog'ridan-to'g'ri 70% sirka kislotasi bilan ham yuvish mumkin. Faqat bunda uzoqroq vaqt sarflanadi.



Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. Gel-filtratsiyaning ahamiyati nimada?
2. Gel-filtratsiya uslubi qaysi sohalarda qo'llaniladi?
3. Gel zarralarining g'ovakligi va birikma molekulalarining kattaligi nimaga bog'liq?

4. Gel sifatida nimalarni qo'llasak bo'ladi?

2. Topshiriq. Kichik guruhlarga A-guruh va B-guruh C-guruhga bo'linib, har bir guruhga vazifa beriladi.

A-guruh - **Kolonkani tayyorlash jarayonini ishlab chiqing.**

B-guruh - **Geldagi oqsil fraksiyalarini aniqlang.**

C-guruh - **Buffer eritma tayyorlang.**

7-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Oqsillarning gel elektroforezi

Darsning maqsadi: Oqsillarni gel-elektroforez usulida bir-biridan ajratishni o'rganish

Nazariy qism. Oqsillarni ajratish va ularning bir jinsliligini aniqlashda muhim o'rin tutadigan uslublardan biri elektroforezdir. Elektr zaryadiga ega bo'lgan moddalarning elektr maydonida anod yoki katod tomoniga siljishi elektroforez deyiladi. Musbat zaryadlangan oqsil katodga, manfiy zaryadlangani esa anodga tomon siljiydi. Oqsillarning elektr maydonida harakatlanishiga ularning molekulyar og'irligi ham ta'sir ko'rsatadi. Kichik molekulyar og'irlikdagi molekula ildamroq, kattasi vazminroq harakatlanadi. Natijada bir xil zaryadlanish darajasiga ega bo'lgan oqsillar molekulyar og'irligiga ko'ra ajratiladi. Elektroforezning 2 xil turi mavjud:

1. *Erkin elektroforez;*
2. *Zonali yoki tashuvchi muhitdagi elektroforez;*

Erkin elektroforez Tizelius tomonidan ishlab chiqarilgan bo'lib, bufer bilan to'ldirilgan V — simon elnektroforetik asbobda olib boriladi. Bu idishning bir uchiga «+», ikkinchi uchiga «—» zaryadlangan elektrod tushiriladi. Elektr toki yuborilganda eritmada oqsil molekulalari zaryadlariga ko'ra siljiydi. Hozirgi kunda erkin elektroforez deyarli qo'llanilmaydi, chunki unga nisbatan bir qator ijobiy xususiyatga ega bo'lgan, takomillashgan usullar kashf etildi. Shulardan biri zonali elektroforez bo'lib, bunda elektroforez qattiq muhitda olib boriladi. Qattiq muhit sifatida PAT, kraxmal, agar va filtr qog'ozidan foydalanish mumkin.

Zonali elektroforez erkin elektroforezdan quyidagi jihatlari bilan farqlanadi:

1. Zonali elektroforezni bajarish oson.
2. Kam miqdorda oqsil talab etiladi, masalan: qog'ozdagi elektroforez uchun 0,5 — 0,8 mg, PAT elektroforez uchun 100 — 200 mkg oqsil kerak bo'ladi.
3. Elektroforez jarayonida hosil bo'lgan oqsil fraksiyalarini tashuvchi muhitda bo'yab (ajratilgan oqsilni) aniq ko'rish mumkin.

4. Tashuvchi muhit yoki bufer eritmani o'zgartirish yo'li bilan oqsil aralashmasini fraksiyalarga ajratish mumkin, M: qon zardobining qog'ozdagi elektroforezida borat buferini (pH —8,9) qo'llab 5 fraksiya (albumin, alfa — 1, alfa —2, beta, alfa —globulin) olinsa, tris — EDTA buferini (pH —8,9) qo'llash orqali 9 ta fraksiya olish mumkin.

5. Zonali elektroforezda oqsillarni fraksiyalarga ajralishi tez boradi (ba'zi uslub bo'yash bilan birgalikda 1 —2 soatda bo'ladi).

6. Zonali elektroforez asbobi sodda tuzilgan va erkin elektroforez asbobiga nisbatan arzonga tushadi.

7. Tashuvchi muhitning o'zida ajratilgan oqsil fraksiyalariga substrat ta'sir ettirib fermentlar aktivligini aniqlash mumkin.

Shu bilan birga elektroforezning bir qator kamchiliklari ham mavjud. 1. Oqsillarning siljish tezligini to'g'ridan to'g'ri aniqlab bo'lmaydi.

8. Aniqlanayotgan oqsil va tashuvchi muhit o'rtasida salbiy bog'lanish vujudga kelishi mumkin. Bunda oqsil tashuvchiga adsorbsiyalanib qolishi kuzatiladi. Qog'ozdagi elektroforezda adsorbsiyalanish kuchliroq bo'lib PAT da bu hodisa deyarli kuzatilmaydi.

Zonali elektroforezning turlari. Qog'ozdagi elektroforez. Qog'ozdagi elektroforez keng tarqalgan usul bo'lib u maxsus filtr qog'ozda olib boriladi. Bu qog'oz yuqori gigroskopik bo'lishi, suvni shimishi natijasida uning og'irligi quruqligidagi og'irligiga nisbatan 180 — 200 marotaba oshishi shart. Elektroforez o'tkaziladigan asbobning turiga ko'ra elektroforez 4 soatdan 16 soatgacha davom etadi. Elektroforez qog'oz bo'yaladi va oqsilning ajralgan fraksiyalari aniq ko'riladi. Bo'yalgan filtr qog'ozni saqlab qo'yish mumkin. Agar ajratilgan oqsil miqdorini aniqlash lozim bo'lsa kerakli fraksiya qirqib olinib oqsil eritmaga o'tkaziladi va fotometrik yo'l bilan o'lchanadi.

Kraxmal gelidagi elektroforez. Ayrim uslubiy qiyinchiliklar bu elektroforezning keng tarqalishiga monelik qildi. Bunga sabab kraxmal gelini tayyorlash, uni gidroliz qilish ancha murakkab jarayon ekanligidadir. Lekin shunga qaramay kraxmal geli oqsilni ajratishda keng qo'llaniladi, chunki bu uslubga ko'ra oqsillar faqat zaryadlanish darajasiga ko'ragina emas, balki molekulyar og'irligiga ko'ra ham ajratiladi. Bu esa fraksiyalar sonini ko'paytiradi. M: qon zardobi oqsilidan ushbu uslub bo'yicha 8 - 10 ta fraksiya olish mumkin. Kraxmal gelidagi elektroforez oqsil gomogenligini bilishda aniq uslub hisoblanadi.

Agar gelidagi elektroforez. Zonali elektroforezni olib borishda agar geli tashuvchi muhit hisoblanadi. 1 — 1,5% li agar gelida oqsil erkin elektroforezdagi kabi harkatlanadi. Agar gelidagi elektroforezda qog'ozdagi elektroforezga nisbatan oqsillar tez fraksiyalarga uchraydi. Agar qatlamining tiniqligi oqsil fraksiyalarini yaxshi bo'yashni va fotometrik uslub aniqlashni osonlashtiradi. Shu bilan birga bunday sharoitda oqsil fraksiyalari «dum» hosil qilmaydi. Ajraladi.

Lekin agar gelini tayyorlashning murakkabligi uning keng qo'llanishini chegaralaydi. Agar tarkibida agaropektinning bo'lishi gelning sifatiga salbiy ta'sir qiluvchi faktorlardan hisoblanadi, chunki nordon agaropektin lipoproteidlari va kuchli ishqor oqsillar bilan kompleks hosil qilish xususiyatiga ega. Agar manfiy zaryadlanganligi sababli bufer kationlari va suv molekulasini anodga siljiydi. Elektroforezda bu oqim oqsil fraksiyalarini ham o'zi bilan birga siljishiga sabab bo'lishi mumkin. Bu hodisani tekshiriladigan oqsil aralashmasini gelli plastinkaning o'rtasiga tomizish yo'li bilan bartaraf etish mumkin. Bunday holat agarozada, atsetat — sellyuloza membranasidagi, filtr qog'ozdagi elektroforezlarda kuzatilmaydi.

Atsetat-sellyuloza membranasidagi elektroforez. Atsetat — sellyuloza membranasini juda yaxshi tashuvchi muhit bo'lib, bir qator ijobiy xususiyatlarga ega. Kraxmal va agar gellarini tayyorlash murakkab va ko'p vaqt talab etiladigan jarayon bo'lib, atsetat — sellyuloza membranasiga ishlov berish filtr qog'ozniki singari oson. Undan farqli o'laroq bu elektroforezda oqsil tez va yaxshi ajraladi. Bu elektroforezda faqat oddiy oqsillargina emas, balki glikoproteinlar ham yaxshi bo'yaladi, shunga ko'ra ularni miqdoriy jihatdan ham aniqlash mumkin. Atsetat— sellyuloza membranasidagi elektroforez yordamida qog'ozdagi elektroforezga nisbatan ko'proq, kraxmal gelidagiga nisbatan esa kamroq fraksiya olinadi. Ushbu elektroforez yordamida juda oz miqdordagi (0,1 — 10 ml distillangan suvda eritilgan 5 — 1000 mg) oqsillar aralashmasini fraksiyalarga ajratish mumkin, shunga ko'ra atsetat — sellyuloza membranasidagi elektroforez ajratib olingan oqsilning gomogenligini aniqlashda qo'l keladi.

Asboblari, reaktivlari: elektroforez asbobi, mikropipetka, shprits, shisha naycha uchun shtativ, fotopolimerlash uchun lampa, elektr toki manbai, biriktiruvchi simlar, tris, akrilamid, TEMED, HCl, BIS, riboflavin, saxaroza, ammoniy persulfat, glitsin yoki (alanin), bromfenol qumi (metilen yashili), toza sirka qaxrabosi, (KOH).

Eritma tayyorlash. Gel tayyorlash uchun asosiy eritmalar.

Nordon oqsillar uchun. A) ishqoriy eritma(pH=8.9):

1. 48,0 ml I N HCl;
2. 36,6 g tris;
3. 0,23 ml TEMED 100ml gacha distillangan suv bilan keltiriladi.
4. 48.0 ml I N HCl; 5. 5,98 g tris;
6. 0,46 ml TEMED 100 ml gacha distillangan suv solinadi.
7. 28.0 g akrilamid; 8.0,75 g BIS; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

9. 10 g akrilamid; 10.2,6 g BIS; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

11. 400 mg riboflavin 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

12. 40 g saxaroza; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

13. 0,14 g ammoniy persulfat; 100 ml gacha distillangan suv solinadi. 14. 6.0 g tris; 15.28,8g glitsin 1000 ml gacha distillangan suv solinadi. Ishlatishdan avval 10 marta suyultirilishi lozim!

Indikator — bo'yovchi eritma; 0.001 g bromfenol ko'ki; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

Fiksirlovchi — bo'yovchi eritma; 1 g maid qorasi 10 V; 100 ml gacha 7% sirka qahrobosi solinadi.

Ajratuvchi — quyultiruvchi eritma; 1000 ml 7% sirka qahrobosi

Ishqoriy oqsillar uchun A nordon eritma(pH=4.3); 5,8 ml 1N KOH; 17,2 ml toza sirka qahrobosi; 4.0 ml TEMED; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

B) nordon eritma(pH=7,8): 48.0 ml 1N KON; 2,87 ml toza sirka qahrobosi; 0,48 ml TEMED; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

C) nordon eritma: 60 g akrilamid; 0,4 g BIS; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

E) nordon eritma: 4 mg riboflavin; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

F) nordon eritma 40 g saxaroza; 100 ml gacha distillangan suv solinadi.

K) nordon eritma: 0,28 g ammoniy persulfat; 100ml gacha distillangan suv solinadi. Elektrod buferi eritmasi(pH=4,5;) 31,2 gr –alanin; 8,0 ml toza sirka; 1000 ml gacha distillangan suv solinadi.

Ishlatishdan avval 10 marta suyultirilishi lozim! Indikator — bo'yovchilari: 0,1g metilen yashili; 100 ml gacha distillangan suv solinadi. Ajratuvchi-quyultiruvchi eritma va fiksirlovchi — bo'yovchi eritmalar ishqoriy oqsillar uchun berilganidek qilib tayyorlanadi. «K» eritmada tashqari barcha eritmalarini muzlatkichda saqlash mumkin. «K» eritma bevosita ishlatishdan oldin tayyorlanadi.

Ishning borishi:

1. Muzlatkichda saqlanadigan eritmalar xona haroratiga keltiriladi. 2. Shisha naychalar gelni polimerlash uchun mo'ljallangan shtativga o'rnatiladi.

3. Pastki gel manomerini tayyorlash uchun asosiy eritma quyidagi nisbatda olinadi:

1 hajm A eritma+2 hajm C eritma+1 hajm dis. Suv+4 hajm K eritma

Vakkum nasos yordamida eritma havosi tortib olinadi, aks holda eritma tarkibidagi havo gelni mo'rtlashtiradi va polimerlanish jarayoni bir tekis bormaydi. Eritmalar yuqoridagi nisbatda olinganda ishqoriy muhit uchun 7%(pH=8,9), nordon muhit uchun 15%li (pH=4,3) gel hosil bo'ladi.

4. Shisha naychalarga 1,2—1,5 ml ajratuvchi gel monomer eritmasidan quyiladi. Gelning sirti tekis qotishi uchun monomer eritma ustiga 0,1 — 0,2 ml distillangan suv ehtiyotlik bilan shisha naycha devori orqali quyiladi, bunda monomer va distillangan suv ajralib ketmasligi kerak. 5. Polimerlanish 30 minut davom etadi. Bu jarayon tugaganligini suv bilan monomer gel o'rtasida hosil bo'lgan aniq chegaradan bilish mumkin. 6. Asosiy eritmalardan quyultiruvchi gel monomeri tayyorlanadi. Buning uchun: nordon oqsillar uchun ishqoriy oqsillar uchun

1hajm	B eritma	B eritma
2hajm	D eritma	F eritma
1 hajm	E eritma	
C eritma	4 hajm	F eritma
	E eritma	

Qotgan pastki gelning sirti quyultiruvchi gel eritmasi bilan chayib olinadi.

7. Ajratuvchi gel ustiga 0,1—0,15 ml quyultiruvchi gel eritmasi quyiladi.

8. 8. Shisha naychalar joylangan shtativ 260 — 500 Vtli ultrabinafsha lampasi ostiga qo'yiladi. Riboflavin ishtirokida boradigan fotopolimerlanish jarayoni 15-20 minut davom etadi. Polimerlanish jarayoni tugaganligini sarg'ish-yashil eritmaning xiralashishidan, gel bilan suv o'rtasida hosil bo'lgan aniq chegaradan bilish mumkin 9. Polimerlanish jarayoni tugagach gel ustidagi distillangan suv filtr qog'oz yordamida olib tashlanadi.

10. Oqsil eritmasini tayyorlash. Oqsil eritmasi buferga diffuziyalanib ketmasligini ta'minlash uchun, ajratilmoqchi bo'lgan oqsilni 8 marta suyultirilgan A eritmasida eritiladi. Oson diffuziyalanadigan, molekulyar og'irligi kichik bo'lgan oqsillarni saxaroza eritmasida eritiladi.

11. Shisha naycha asbobga o'rnatilib gel ustiga 0,10-0,25 ml oqsil eritmasi quyiladi. Naychaning bo'sh qolgan elektrod buferi yordamida, oqsil eritma bilan aralashib ketmasligini ta'minlagan holda to'ldiriladi.

12. Pastki idishga —4° C gacha sovutilgan bufer eritma solib, yuqori va pastki idishlar birlashtiriladi. Yuqoridagi idishga ham ehtiyotlik bilan sovuq bufer va 1-2 ml indikator bo'yog'i qo'shiladi. Asbob muzlatkichga o'rnatiladi va polyarligiga ko'ra tok manbaiga ulanadi. Dastlabki yarim soatda har bir shisha naychaga 2 mAdan tok kuchi berilishi kerak. Bu vaqtda elektrokimyoviy kontsentrirlanish jarayoni boradi, agar birdaniga katta tok kuchi yu borilsa

issiqlik ta'sirida broun harakati kuchayib oqsil bufer eritmaga chiqib ketishi mumkin. Oqsil molekulalari konsenrlovchi geldan o'tib ajratuvchi gel chegarasiga yetib kelgan tok kuchi har bir naycha uchun 5 mAgacha oshiriladi.

13. Elektroferez tugaganligini indikator bo'yog'i shisha naychaning pastki chegarasiga yetib kelganidan bilish mumkin.

14. Elektroforez tugagach shisha naychalar asbobdan chiqarib olinadi.

15. Naychadan gelni ajratib olish uchun suv to'lg'azilgan shprisdan foydalaniladi.

Buning uchun naycha va gel orasiga shpris ninasini spiralsimon yo'nalishda aylantirib suv yuboriladi. Shunda gel asta tashqariga chiqadi. 16. Gel fiksirlovchi bo'yoqda 1 soat ushlanadi.

17. Bo'yalgan gel bir necha marta distillangan suv bilan chayqaladi va ajratuvchi eritmaga solinadi. Bu jarayon ajratuvchi eritmaga bo'yoq chiqmaydigan bo'lguncha davom ettiriladi. Yuvish jarayoni tugaganligini gelning oqsilli fraksiyalari bo'yalib oqsil bo'lmagan qismining rangsizlanishidan bilish mumkin.

Gelni uzoq muddat saqlash lozim bo'lsa gel shisha plastinka ustida xona haroratida quritiladi. Quruq gelni bir necha yillab saqlasa bo'ladi. Quruq gel ajratuvchi eritmada 24 soat ushlansa u yana o'z holiga keladi.



1.Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. Gel-filtratsiya uslubi nimaga asoslangan?
2. Qattiq muhit sifatida nimalardan foydalanish mumkin.
3. Polimerlanish jarayoni tugaganligini qanday bilish mumkin?
4. Gelni uzoq muddat saqlash uchun nimalarga etibor beriladi?
5. Tashvchi muhitga nimalar kiradi?

2.Topshiriq. Zinapoya metodi yordamida 3 ta guruh bajaradi.

1-guruh Qog'ozdagi elektroforezni tahlil qilib bering

2-guruh. Atsetat-sellyuloza membranasidagi elektroforezni tahlil qilib bering

3-guruh. Agar gelidagi elektroforezni tahlil qilib bering.

Qog'ozdagi
elektroforez

Atsetat-sellyuloza
membranasidagi elektroforezni

Agar gelidagi
elektroforezni

8-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Achitqi nukleoproteidlarni ajratish

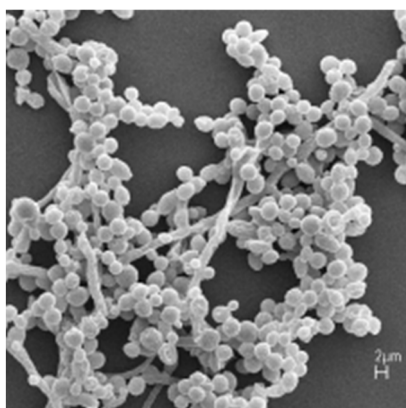
Darsning maqsadi: Achitqi va jigar tarkibida uchraydigan nukleoproteidlarni cho'ktirish usulida ajratib olish va ularga xos tajribalar o'tkazish.

Nazariy qism. Nukleoproteinlarni 5-10 % li sulfat kislota yordamida bir soat davomida gidrolizlaganda ular oqsil va nuklein kislotagacha parchalanadi. Nuklein kislota keyinchalik alohida nukleotidlarga va birinchi galda purin, pirimidin asoslariga hamda fosfat kislotaga aylanadi. Nukleoproteidlarni erkin holdagi parchalanish mahsulotlarini, shuningdek pentozani maxsus reaksiyalar yordamida aniqlash mumkin. Purin asoslarini kumush tuzlarini cho'kmasini hosil qilish, fosfat kislotani ammoniy molibdat, pentozani orsin va flyuroglisin bilan yuz beradigan sifat reaksiyasi yordamida aniqlash mumkin. Jigar, taloq, oshqozon osti bezi, buyraklar va achitqi nukleoproteidlarga boy hisoblanadilar. Ular ishqoriy eritmalarda erib, kislotali eritmalarda cho'kmaga tushadi. Dezoksiribonukleotidlar tuzli eritmalarda ham yaxshi eriydi.

Kerakli asbob: chinni hovoncha, pipetka, laboratoriya sentrifugasi, sentrifuga tarozisi, yog'och tayoqcha, stakan, silindr, shisha tayoqcha, sentrifuga probirkalari, oddiy kimyoviy probirkalar, o'lchagich silindr, mayda shisha bo'lakchalari.

Reaktivlar : 1 N NaCl ning eritmasi; difenilaminli reaktiv (tayyorlash: 1,0g difenilamin 100 ml 1 % li muzsirka kislotada eritilib, ustiga 2,8 ml konsentrlangan sulfat kislotasi qo'shiladi); 0,4 % li natriy ishqori eritmasi; 5 % li sirka kislota eritmasi; efir (dietil efir); 5% li sirka kislota eritmasi..

Biomateriallar: achitqi.



20-rasm. Nukleoproteidlarni achitqidan ajratib olish

Ishning bajarilishi: 5 g achitqi 1 ml dietil efiri va 1 ml suv bilan ho'llanadi va forfor havonchada shisha kukuni qo'shib, 0,4%- li natriy ishqori bilan eziladi (bunda natriy ishqoridan sekin-astalik bilan 5-10 ml chamasi solib turiladi). Hammasi bo'lib, 50 ml ishqor sarf bo'ladi. Achitqini 15-20 minut davomida to'xtovsiz ezib turiladi. Havonchadagi hosil bo'lgan massa filtrlanadi yoki 10 minut davomida sentrifugirlanadi (2500 G). Filtrat yoki sentrifugat stakanga quyiladi va unga tomchilatib 5%-li sirka kislotadan nukleoproteidlar to'liq

cho'kmaga tushguncha tomizilib turiladi (Odatda 10-15 ml eritma sarflanadi).
Cho'kma sentrifugalash usuli bilan ajratib olinadi. (20-rasm.)



21-rasm.



1.Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

- 1.Purin asoslarini qanday aniqlash mumkin?
2. fosfat kislotaniqanday aniqlash mumkin?
3. pentozani aniqlash mumkin.
4. Nukleoproteinlarni oqsil va nuklein kislotagacha parchalashda qaysi reaktivdan foydalanasiz?
5. Dezoksiribonukleotidlar qanday eritmalarda ham yaxshi eriydi?

2.Topshiriq. “Kungaboqar “ metodi yordamida Nukleoproteidlarga ta’rif bering.Har bir doirani to’ldiring.



9-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Jigardan nukleoproteidlarni ajratish

Darsning maqsadi: qoramolni talog'i, jigaridan umumiy nukleoprotein (UNP) va dezoksiriboprotein(DRP) larni ajratib olishga va ularning xossalariga oid nazariy bilimlarni muhokama qilish va kimyobiy reaksiyalar o'tkazish asosida mustahkamlash va tegishli xulosalarga kelish.

Nazariy qism: Nuklein kislotalari ishtirokida hayotiy jarayonlarning moddiy asosi bo'lgan oqsillar hosil bo'ladi. Har bir tirik organizm boshqa organizmlardan farqlanuvchi o'zining maxsus oqsillariga ega. Oqsillarning tuzilmaviy xususiyatlari DNK da "yozilgan" ("dasturlangan") va ular qator avlodlarga DNK molekulasi orqali uzatiladi. Boshqa tipdagi nuklein kislotalari ribonuklein kislotalari (RNK) bo'lib, oqsil biosintezini o'zini zaruriy va eng muhim komponentlari hisoblanadi. Shu sababli organizm oqsillar eng ko'p hosil bo'ladigan to'qimalarda RNK ni ko'p miqdorda saqlaydi. Nuklein kislotalar va nukleoproteidlarni o'rganish shu sababli muhimki, viruslar deyarli toza nukleoproteidlarning o'zi hisoblanadi. Ko'pdan ko'p virus kasalliklariga qarshi kurashni nuklein kislotalarning tuzilishi va xossalarini bilmasdan amalga oshirib bo'lmaydi. Ayniqsa saraton (rak) kasalligini kelib chiqish sabablari va davolash usullari katta qiziqish uyg'otadi, chunki bunda hujayraning nuklein kislotalari va oqsillari funksiyalarini izdan chiqishi yuz beradi, hamda bu jarayonda viruslarning bevosita ishtiroki bor. Nihoyat shu narsani ham e'tiborga olish lozimki, nuklein kislotalarning bo'lagi nukleotidlar moddalar almashinuvida muhim rol o'ynaydi Nukleoproteidlarning tarkibida gistonlar, protaminlar kabi oddiy oqsillar DNK va RNK bilan birikkan (konyugirlangan) tizimda uchraydi. Agar bunday murakkab oqsillar xlorid kislota ta'sirida gidrolizlansa, aminokislotalar hamda oqsil bo'lmagan oddiy moddalar erkin holda ajraladi. Oqsil bo'lmagan oddiy moddalar orasida, asosan, nuklein kislotalarning gidrolizati mahsulotlari uchraydi. Jigar, taloq, oshqozon osti bezi, buyraklar va achitqi nukleoproteidlarga boy hisoblanadilar. Ular ishqoriy eritmalarda erib, kislotali eritmalarda cho'kmaga tushadi. Dezoksiribonukleotidlar tuzli eritmalarda ham yaxshi eriydi.

Kerakli asbob: chinni hovoncha, pipetka, laboratoriya sentrifugasi, sentrifuga tarozisi, yog'och tayoqcha, stakan, silindr, shisha tayoqcha, sentrifuga probirkalari, oddiy kimyoviy probirkalar, o'lchagich silindr, mayda shisha bo'lakchalari.

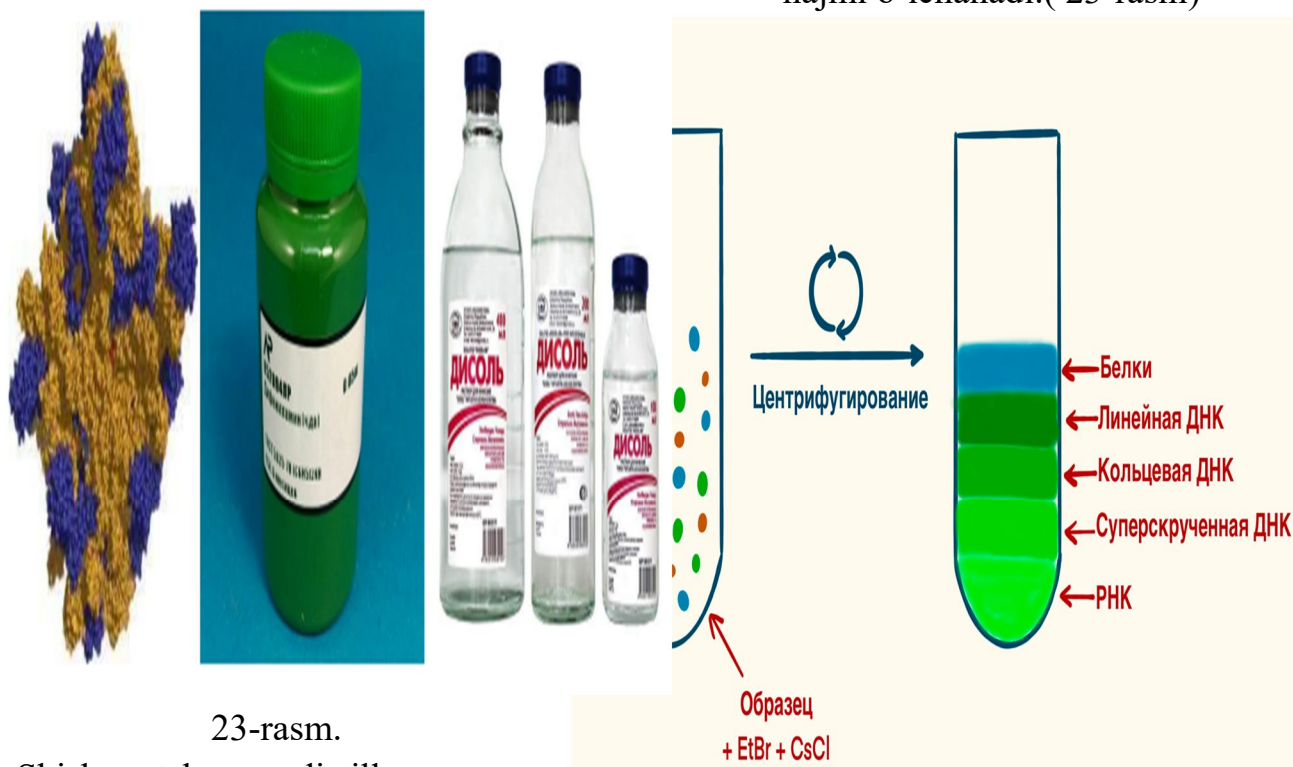
Reaktivlar : 1 N NaCl ning eritmasi; difenilaminli reaktiv (tayyorlash: 1,0g difenilamin 100 ml 1 % li muzsirka kislota eritilib, ustiga 2,8 ml konsentrlangan sulfat kislota qo'shiladi); 0,4 % li natriy ishqori eritmasi; 5 % li sirka kislota eritmasi; efir (dietil efir); 5% li sirka kislota eritmasi.

22-rasm_Jigardan nukleoproteidlarni ajratib olish.



Biomateriallar: mol yoki cho'chqaning muzlatilgan yangi jigari yoki talog'i.(22-rasm)

Ishning bajarilishi. 2-2,5 g taloq yoki jigarni mayda bo'lakchalarga bo'lib xovonchada 5% li NaCl va maydalangan shisha bo'lakchalari yordamida yaxshilab eziladi. Tuzli eritmani oz-ozdan solib boriladi. Jami 80 ml tuzli eritma sarflanadi. Taloq 12-15 daqiqa davomida gomogen massa hosil bo'lgunga qadar eziladi. Hosil bo'lgan massani probirkalarga solib, 10-15 daqiqa davomida sentrifugalanadi. So'ng sentrifugatni shisha silindrga solib hajmi o'lchanadi.(23-rasm)



23-rasm.

Shisha stakanga distillangan suv quyilib (suvning hajmi sentrifugadan 6 marta ko'p bo'lishi kerak) taxta tayoqcha yordamida sekinlik bilan aralashtirilgan holda ustiga sentrifugat quyiladi.

Dezoksiribonukleoproteidlar ip ko'rinishida cho'kmaga tusha boshlaydilar va tayoqchaga o'raladi. DNK ga xos sifat reaksiyasi.

DNK dezoksiribozalarga xos bo'lgan rangli reaksiyalar orqali aniqlanadi. Ko'pincha difenilamin bilan boradigan reaksiya qo'llaniladi

(C₆H₅-NH-C₆H₅). Difenilamin dezoksiriboza yoki DNK bilan ko'k rangli, riboza yoki RNK bilan yashil rangli birikma hosil qiladi.

Dezoksiribonukleoproteid cho'kmasining bir qismi probirkaga solinadi va 0,5-1ml NaOH qo'shiladi (cho'kma eriguncha). Eritmaga teng hajmda difenilamin reaktivi qo'shildi. Reaksiya boshida hosil bo'lgan cho'kma reaktivning keyingi porsiyalari yordamida eritiladi, so'ng 15-20 daqiqa davomida suv hammomida qizdiriladi. Natijada ko'k rang hosil bo'ladi.

Polipeptidlarni aniqlash reaksiyasi: Filtratdan 1 ml olib, unda Biuret reaksiyasi o'tkazib ko'rish kerak. Buning uchun filtrat ustiga 1 ml o'yuvchi natriy eritmasidan solinadi va 1-2 tomchi mis sulfat eritmasidan tomiziladn. Natijada qizil-binafsha yoki ko'k-binafsha rang hosil bo'ladi.

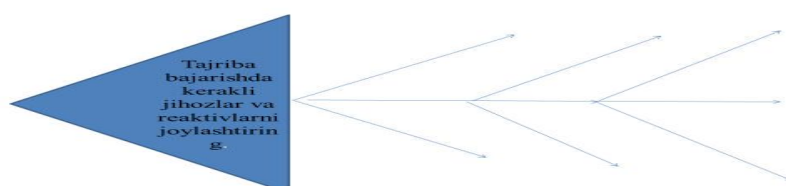
Purin asoslarini aniqlash reaksiyasi: 2 ml filtratga kontsentrangan ammiak eritmasidan ishqoriy muhit hosil bo'lguncha solinadi (bu jarayon lakmus qog'ozi bilan tekshirib turiladi). Uning ustiga 1 ml kumush oksidining ammiakli eritmasidan qo'shiladi. Bir necha minutdan so'ng purin asoslarining kumushli tuzining oq pag'a-pag'a cho'kmasi hosil bo'ladi



1.Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. Qanday moddalar oqsillar deb yuritiladi?
- 2 . Oqsillar qanday funksiyalarni bajaradi?
3. Oqsillarni tadqiq qilishda qanday uslublardan foydalaniladi?
4. To'qimalarni gomonegizatsiyasi deganda nimani tushunasiz, uning qanday xillari bor?
5. Differensial sentrifugalash yo'li bilan qanday tadqiqotlar o'tkaziladi?
6. Oqsillarni fraksiyalash va tozalash uslublari.

2.Topshiriq. Baliq skeleti metodi asosida topshiriqni bajaring.



10-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Piyoزدan DNK ni ajratish

Darsning maqsadi: Piyoزد gomogenatini tayyorlash, DNKni etanol tasirida cho'ktirish va DNKni eritmadan ajratib olish usullari bilan tanishish.

Nazariy qism: Turli o'simliklar, hayvonlar va mikroby hujayralaridan, hujayra komponentlaridan, to'qimalar ekstraktlaridan xilma-xil oqsil preparatlari ajratib olingan. Organizmning turli a'zo va to'qimalarida o'ziga xos oqsillar uchraydi. Har xil turga mansub o'simlik va hayvonlarning oqsillari ham bir-biridan farq qiladi, umuman oqsillarning turga xosligi tabiat qonunidir. Hujayra tarkibidagi DNK va RNKning umumiy miqdori uning funkstional holatiga bog'liq bo'ladi. Masalan, urug' hujayralari (spermatozoidlar)da DNK hujayra quruq massasining 60% ini, ko'pchilik hujayralarda 1-10, muskullarda esa 0,2 % bo'ladi. RNK ning miqdori esa odatda, DNK ga nisbatan 5-10 marta ko'proq bo'ladi. Jigar, oshqozon osti bezi, embrional to'qimalar kabi faol ravishda oqsil sintezlovchi to'qimalarda RNK/DNK nisbati 4 dan 10 gacha bo'ladi. Ajratib olingan va tozalangan DNK va RNK maxsus sharoitda kislota (DNK) va ishqor (RNK) bilan gidrolizlanadi; ko'pincha gidroliz polinukleotidlardagi fosfodiefir bog'larini uzadigan maxsus fermentlar – nukleazalar ishtirokida boradi. Nuklein kislotalarning fosfodiefir bog'lari gidroliz qilinganda ularning struktura monomerlari – azotli asos, pentoza va fosfat kislota qoldiqlaridan iborat mononukleotidlar ajralib chiqadi. DNK molekulasida purin asoslarining molyar soni pirimidin asoslarining molyar soniga teng bo'ladi. DNK molekulasida har bir tur uchun spetsifik harakterlanadi. DNK asosan yadroning asosiy moddasi hisoblanadi.

Kerakli asbob: shisha qum; xovoncha; mufel pech; tarozi; shisha voronka; martalik qog'oz salfetka; yog'och tayoqcha; shisha stakan, kimyoviy probirkalar.(23-



rasm)

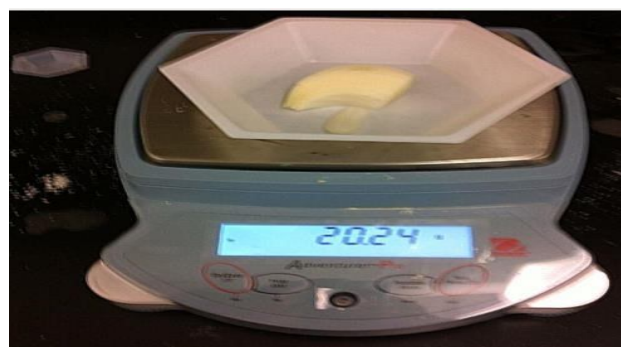
Reaktivlar : ohak; etanol; 5% NaCl; etil spirti yoki izopropilen spirti muzlatilgan holda, hech bo'lmasa yuzi muzlatilgan bo'lishi maqsadga muvofiqdir; disstillangan suv.

Biomateriallar: piyoz.

Ishning bajarilishi: O'tkaziladigan tajriba yordamida qurollanmagan ko'z bilan nuklein kislotalarni ajratishning oddiy va tezkor usuli amalga oshiriladi.

Piyozdan DNK ni ajratish: Ishni bajarish tartibi.

1. Taxminan 20 gramm sariq piyozni kesib oling.



2. Va taxminan 20 gramm kislota bilan yuvilgan qum va ohak qo'shiladi.

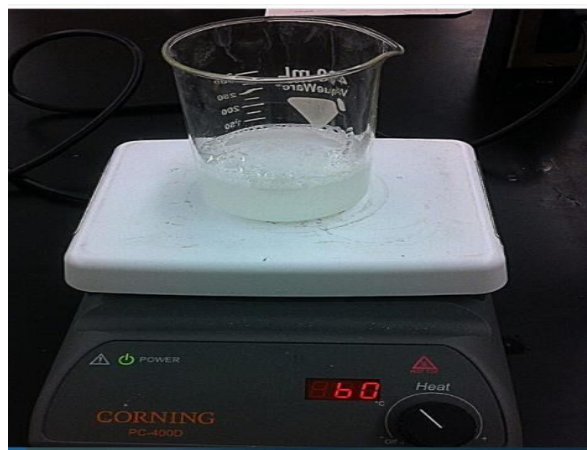


3. Mayda Shilimshiq holatga kelguncha

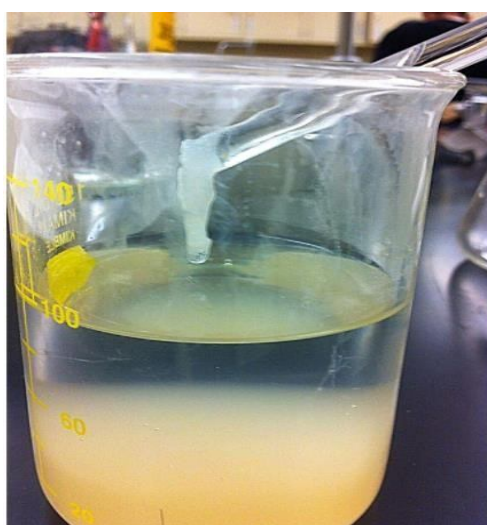
maydalanadi.



4. 10 gramm NaCl ni tortiladi. 100 ml suvda tuzni eritib oling. Piyoz gomogenati bilan stakanga 30 ml eritma qo'shing. 60°C haroratda 5 daqiqa davomida aralashtiring.

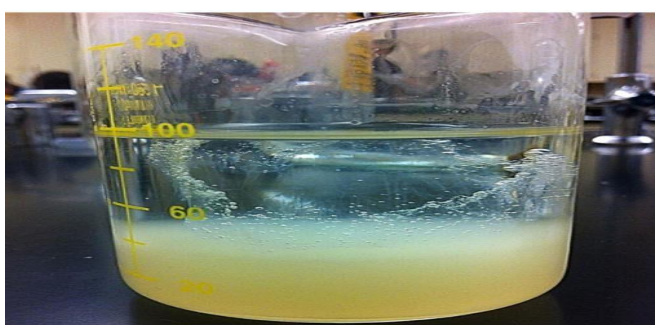


5. Doka yordamida suyuqlik qismi filtratdan ajratib olinadi.



6-Etanolni stakanning yon tomonidan asta-sekin quyding. Shunda hujayra ekstrakti eritma ustki qatlamiga

chiqadi, DNK eritma tagigiga cho'kmaga tushadi.



6. Eritmadan DNKni chiqarib olish uchun aralashtiruvchi tayoqchadan foydalaning. Tayoqcha eritma cho'kmasida sekin buraladi. Ehtiyot bo'ling suvli va etanolli qismlarni aralashtirib yubormang.



7. DNKni 95% etanol bo'lgan probirkaga o'tkazing.



1. Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. Hujayra tarkibidagi DNK va RNKning umumiy miqdori nimaga bog'liq bo'ladi?
2. Tajriba bajarishda DNK nimalardan ajratib olinib o'rganiladi?
3. DNK miqdori qaysi hujayrada ko'p miqdorda uchraydi?
4. DNKni ajratib olishda spirtning necha foizli eritmasi kerak?

2. Topshiriq. "Stikerli daraxt" metodi yordamida kerakli reaktiv va jihozlarni tanlab oling.



11-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Bukkal epiteliydan DNK ni ajratish

Darsning maqsadi: Bukkal epiteliy to'qimasidan DNKni ajratib olish usullari bilan tanishish.

Nazariy qism: DNK ning molekulyar massasi tirik organizmning murakkablik darajasiga bog'liq. Odam va boshqa yuksak organizmlarning hujayralaridagi xromosomalarda DNK giston va giston bo'lmagan oqsillar bilan bog'langan bo'ladi. Bunday komplekslar dezoksiribonukleo'troteidlari (DNK) deyiladi. Ajratib olingan va tozalangan DNK va RNK maxsus sharoitda kislota (DNK) va ishqor (RNK) bilan gidrolizlanadi; ko'pincha gidroliz polinukleotidlardagi fosfodiefir bog'larini uzadigan maxsus fermentlar – nukleazalar ishtirokida boradi. Nuklein kislotalarning fosfodiefir bog'lari gidroliz qilinganda ularning struktura monomerlari – azotli asos, pentoza va fosfat kislota qoldiqlaridan iborat mononukleotidlari ajralib chiqadi. Molekuladagi vodorod bog'larini uzuvchi tashqi muhitning barcha ta'sirlari DNK ni denaturatsiyalaydi. Denaturatsiya harorat, kimyoviy moddalar ta'sirida bo'lishi mumkin. Denaturatsiyalovchi agentlardan eng kuchlisi isitishdir. DNK isitilganda uning ikki zanjiri bir-biridan ajraladi, ya'ni yechiladi. Bu hodisa pastroq harorat oralig'ida bo'lgani uchun yumshash deyiladi. DNK ning 50 % i denaturatsiyalangan haroratga yumshash deb ataladi. Tez qizitish usulida denaturatsiyalangan, ya'ni ikki zanjirga ajratilgan DNK sekin sovutilsa, ajralgan zanjirlar qaytadan birikib, qo'sh zanjirli DNK ni hosil qiladi. Bu hodisa renaturatsiya deb ataladi.

DNKni bukkal epiteliydan ajratish. O'tkaziladigan tajriba yordamida qurollanmagan ko'z bilan nuklein kislotalarni ajratishning oddiy va tezkor usuli amalga oshiriladi.

Kerakli asbob: xovoncha; mufel pech; tarozi; shisha voronka; bir martalik qog'oz salfetka; yog'och tayoqcha; shisha stakan, kimyoviy probirkalar.

Reaktivlar : shisha qum; etanol; 5% NaCl; etil spirti yoki izopropilen spirti muzlatilgan holda, hech bo'lmasa yuzi muzlatilgan bo'lishi maqsadga muvofiqdir; sovun eritmasi; kimyoviy buyoq eritmasi; disstillangan suv.

Biomateriallar: og'iz bo'shlig'i shilliq qavati

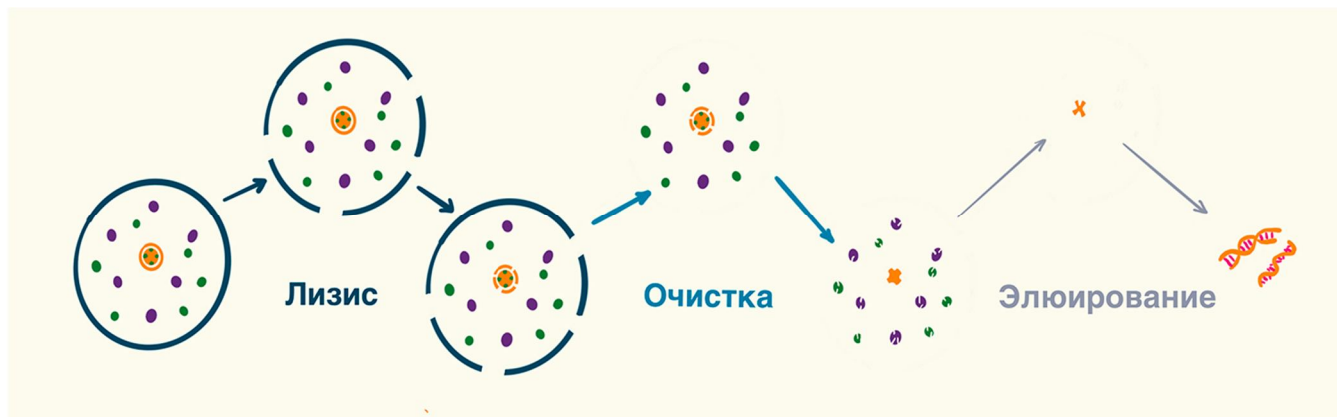
Ishning bajarilishi: Bukkal epiteliydan DNK ni ajratish_60 ml 5% NaCl eritmasi yordamida og'iz bo'shlig'ida 1 daqiqa davomida chayqaladi. Hosil bo'lgan eritmani kimyoviy stakanga solinadi. Ko'pirtirmasdan eritma ustiga sovun eritmasidan 3 ml solinadi. Alohida stakanda 100 ml spirt ustiga kimyoviy bo'yoq solinadi. Bukkal to'qimaning sovunli eritmasi ustiga spirtli bo'yoqni ehtiyotkorlik bilan stakan devor

BUKKAL EPITELIY og'iz shilliq qavati epiteliysi



bo'ylab solinadi. Natijada alohida ikki qatlamli eritma hosil bo'ladi. So'ng hosil bo'lgan eritmani 2,5 daqiqaga qoldiriladi. Vaqt o'tgach stakanga yog'och tayoqcha solinganda stakandagi aralashma yopishqoq holga keladi.

Og'iz shilliq qavatidan bukkal epiteliyni ajratib olish



Suyuqliklar chegarasida DNK cho'kishi jarayonini oq ipsimon cho'kma sifatida kuzatish mumkin. Ularni yog'och tayoqchaga olish mumkin. Eritmadan olingan yog'och tayoqcha quriganidan so'ng ko'rinmaydi, suvda yaxshi eriydi. Olingan DNK eritmasida sifat reaksiyasi o'tkaziladi va olingan natijalar kuzatish daftariga qayd etiladi.



1. Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. DNK qanday sharoitda gidrolizlanadi?
2. RNK qanday muhitda gidrolizlanadi?
3. Fosfodiefir bog'larni uzishda qaysi fermentlar ishtirok etadi?
4. Tajribada DNK ni cho'kma holda ajratib olish uchun qaysi reaktivlar kerak?

2. Topshiriq. Nima uchun og'iz bo'shlig'i shilliq qavati bukkal epiteliysini ajratib olish uchun NaCl eritmasidan foydalandingiz. **FSMU METODI** yordamida tahlil qilib bering.



12-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Nukleoproteidlarni gidroliz qilib, gidroliz mahsulotlarini ajratish

Darsning maqsadi: Nukleoproteidlarni gidroliz qilib hosil bo'lgan mahsulotlarni sifat reaksiyalari orqali aniqlash.

Nazariy qism : Nukleoproteidlar hujayralarning yadrosi va protoplazmasida uchraydi. Bu oqsillar hujayra yadrosining tarkibiy qismi bo'lib, hujayraning bo'linishida va irsiy belgilarni ko'chirilishida muhim ahamiyatga ega. Nukleoproteinlar oddiy oqsillardan va nuklein kislota qoldiqlaridan tashkil topgan. Nuklein kislotalar bu murakkab oqsillarning nooqsil tabiatli qismi hisoblanadi. Tabiatda nukleoproteinlarning bir-biridan o'zlarining tarkibi, kattaligi, fizik-kimyoviy xossalari bilan farqlanadigan ikki xili: dezoksiribonukleoprotein (DNP)lar va ribonukleoprotein (RNP)lar uchraydi. Hujayrada sintezlanadigan oqsillarning tabiati birinchi navbatda DNPga, aniqrog'i, DNKga bog'liq, tirik organizmlarning xususiyatlari, ularning subhujayraviy organellalari, hujayralari va, umuman, butun organizmning tuzilishi sintezlanadigan oqsillarning xossalari bilan belgilanadi, deb e'tirof etishga to'liq asos bor. DNK irsiy belgilarni saqlaydi. Nukleoproteinlar va ularga mos tarzda nuklein kislotalari bilan juda murakkab biologik jarayonlar bevosita bog'liqdir, ular jumlasiga mitoz, meyoza, embrional va xatarli o'sish va boshqalarni kiritish mumkin. Ko'p eukariot organizmlarning hujayralarida yadro interfaza bosqichida bo'lganda DNK va oqsil molekulasidan iborat bo'lgan filament deb nomlangan qalinligi o'zgarib turadigan ipchalar (o'rtacha 10 nm, kamdan kam 2 nm) hosil bo'ladi. Filamentlarning qalinligi qo'sh zanjirli DNK strukturasi atrofida oqsilning bor yoki yo'qligiga bog'liq bo'lsa, uning uzunligi DNK ning molekular massasi bilan belgilanadi.

Kerakli jihozlar: shisha hovoncha, shisha voronka, 1 L li tumshuqli laboratoriya shisha stakani, dializ qilish uchun kolloid xaltacha, doka.



Reaktivlar : a) xlorid kislota preparati, 6 N eritma, b) xlorid kislota, 0,1 N eritma, d) Whatman №1 xromatografik qog'oz yoki purin va pirimidin asoslarining standart

eritmaları f) I va II erituvchi tizimlar; g) ishlab chiqaruvchi kumush nitrat - natriy dixromat; h) simob ishlab chiqaruvchisi.



kislota eritmasi qo'shiladi. Naycha muhrlanib, 3 soat davomida 100°C haroratda pechga qo'yiladi, hosil bo'lgan gidrolizat vakuumli eksikatorida (qattiq KOH ustida) quriguncha bug'lanadi. Qoldiq eritmani olish uchun shunday miqdorda 0,1 n xlorid kislota eritmasida eritiladi (gidroliz uchun olingan DNK miqdorini hisobga olgan holda). 12X40 sm o'lchamdagi to'rtta xromatografik qog'ozni oling, boshlang'ich chiziqning o'rtasiga sinovdan o'tgan 5 ml gidrolizat, yon tomonlariga esa purin va pirimidin asoslarining standart eritmaları surtiladi. Guanin eritmasi faqat №4 varaqqa qo'llaniladi. №1 va 2-xromatogrammlar I erituvchi sistemali idishlarga, №3 va 4 - II tizimli idishlarga joylashtiriladi. Xromatografiya erituvchi jabhasi kamida 20 sm ko'tarilguncha davom ettiriladi (I tizimda bu taxminan 3 soat, II tizimda - 22-24 soat). Xromatogrammlar quritiladi (yuqoriga qarang) va ultrabinafsha nurlar bilan ko'rib chiqiladi. Azotli asoslarning dog'lari grafit qalam bilan tasvirlangan, shundan so'ng №1 va 2 xromatogrammlar simob ishlab chiqaruvchisi bilan, №3 va 4 varaqlar esa kumush nitrat ishlab chiqaruvchisi - natriy dixromat bilan ishlanadi. Jadvaldan foydalangan holda birikmalarni aniqlang. 3 ularning identifikatsiyasini amalga oshiradi.



1. Topshiriq. Nazorat savollariga javob bering.

1. Nukleoproteinlarning tarkibi qanday moddalardan iborat?
2. Nukleoproteinlarning qanday turlari bor?
3. Nukleoproteinlarning kimyoviy tarkibi, tuzilishi va funksiyasi ?
4. filament nima?
5. Filamentlarning qalinligi nimaga bog'liq?

2. Topshiriq. Kichik Keys

Nukleoproteidlar hujayralarning yadrosi va protoplazmasida uchraydi. Bu oqsillar hujayra yadrosining tarkibiy qismi bo'lib, hujayraning bo'linishida va irsiy belgilarni ko'chirilishida muhim ahamiyatga ega. Nukleoproteinlar oddiy oqsillardan va nuklein kislota qoldiqlaridan tashkil topgan. Nukleoproteinning aynan qaysi tarkibiy qismi eng muhim va irsiy belgilar doimiylikini saqlaydi?

13-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

Nuklen kislotalarning gel-elektroforezi

***Darsning maqsadi:** Dezoksiribonuklein kislotalarni poliakrilamid gelida elektroforez qilish yo'li bilan fraksiyalash*

Reaktivlar va materiallar: DNK elektroforezi uchun quyidagi asbob va reaktivlar bizga zarur bo'ladi; spektrofotometr, mikrofotometr (MF-4), elektroforez asbobi, 20-50 ml li shisha shpris, o'lchov kolbalari (100; 1000 ml li), ichki diametri 5-6 mm, uzunligi 7-8 sm li shisha naychalar, pipetkalar (0,1; 0,1 va ml li), pH-metr, sianogum-41 yoki akrilamid va N1N1-metilen bisakrilamid, TEMED - tetrametil etilendiamin, ammoniy persulfatning 10% li eritmasi, saxarozaning 40% li eritmasi, bromfenol ko'kning 0,25% li eritmasi, tris asetat buferi (pH 7,8), perxlorat kislotaning 0,5 N eritmasi, sirka kislotaning 1 M eritmasi, metilen ko'kning (0,4 M) asetat buferidagi (pH 4,7) 0,2% li eritmasi.

Ishni bajarish tartibi. Nuklein kislotalarni fraksiyalash uchun ko'pincha saxaroza zichlik gradientida ultrasentrifugalash, xromatografik, elektroforetik usullar ko'p qo'llaniladi. Bu usullar ichida poliakrilamid gelidagi elektroforez usuli diqqatga sazovor. Bu usulning afzalligi shundaki, birinchidan, sintetik gel g'ovaklarining o'lchamlarini boshqarish mumkin, ikkinchidan, birdaniga bir vaqtning o'zida tekshirilayotgan aralashmani ko'p miqdorda fraksiyalash mumkin. Tarkibida 2,4% akrilamid bo'lgan poliakrilamid gelidagi elektroforez umumiy DNK ni molekulyar massasiga qarab turli fraksiyalarga ajratishga imkon beradi.

Gel tayyorlash. Gel tayyorlash uchun 95% li akrilamid va 5% li N1N1-Metilenbisakrilamid aralashmasidan iborat bo'lgan sianogum-41 preparati ishlatiladi. Biror ob'ektdan ajratib olingan umumiy DNK ni fraksiyalash 2,4% li akrilamiddan tayyorlangan poliakrilamid gelida olib boriladi. Buning uchun 2,5 g sianogum-41 yoki 2,4 g akrilamid, 0,13 g N1N1-metilenbisakrilamid 33 ml trisasetat buferida (pH 7,8) eritilib, uning ustiga 50 ml distillangan suv, 0,08 ml TEMED qo'shiladi. Tayyorlangan suyuqlik yaxshilab aralashtirilgach, 10% li 0,8

ml ammoniy persulfat eritmasi qo'shiladi va eritmaning hajmi 100 ml ga yetkazilib aralashtiriladi. Tayyor bo'lgan aralashma elektroforez olib boriladigan ichki diametri 5-6 mm, uzunligi 7-8 sm li shisha naychaga havo pufakchalari kiritilmasdan quyiladi. Polimerlanish prosessi kislorodsiz muhitda olib borilishi kerak. Buning uchun polimerlanuvchi aralashma ustiga ohistalik bilan bufer eritma quyiladi va qatlam hosil qilinadi. Elektroforetik kamera kyuvetalariga bufer 1:2 nisbatda suyultirilgandan so'ng quyiladi. Gelga fraksiyalanadigan umumiy DNKni tomizish-Gel polimerlangandan so'ng, uning ustiga tarkibida DNK bo'lgan 20% li 0,010,05 ml saxaroza eritmasi (buning uchun ma'lum miqdordagi 40% li saxaroza eritmasi teng miqdordagi DNK eritmasi bilan aralashtiriladi) va 0,25% li 0,01 ml bromfenol ko'ki tomiziladi. Saxaroza DNK eritmasining zichligini oshirib, uning elektrod buferi bilan qisqa vaqt ichida aralashib ketishiga qarshilik qiladi. Natijada elektrodlarga kuchlanish berilganda DNK gel ustuniga o'tadi. Tekshirilayotgan eritmadagi DNK konsentratsiyasi quyidagicha aniqlaniladi: 0,1 ml DNK eritmasiga 5 ml 0,5 N perxlorat kislota qo'shib, qaynab turgan suv hammomida 20 minut gidrolizlanadi.

Shundan keyin gidrolizatning optik zichligi spektrofotometrda (270 va 290 nm da) aniqlanadi. DNKning miqdori esa quyidagi formula yordamida hisoblab topiladi: $C_{\text{mkg/ml}} = [(E_{270} - E_{290}) / 0.19] * 10.5$ bu yerda: C - DNK konsentratsiyasi; E - tarkibida 1 mkg DNK bo'lgan eritmaning optik zichligi; 0,19 - 1 mkg/ml DNKdagi fosforning spektrofotometrik ko'rsatkich koeffitsienti; 10,5 - nazariy hisoblangandagi fosfor miqdorini DNK ga o'tkazish uchun ko'paytuvchi.

Elektroforez va elektrofotogrammada DNK ni topish- Elektroforezning har bir ustuniga 5 mA tok kuchi beriladi. Tajriba 0 - 3°C da 60 minut davomida olib boriladi. Elektroforez tamom bo'lgandan so'ng gel ustidagi shisha naychalar chiqarilib, fiksasiya qilinadi va bo'yaladi. 1M sirka kislota yordamida fiksasiyalash uchun 15 minut sarflanadi; gel ustunchalarini bo'yash uchun metilen ko'kining 0,4 M asetat buferidagi (pH 4,7) 0,2% li eritmasida 4 soat tutib turiladi. Ortiqcha bo'yoq bir necha marta suv bilan yuviladi. Olingan elektroforegrammalar millimetrli qog'ozga chiziladi, rasmi olinadi va mikrofotometr (MF-4) yordamida densitometrlanadi. Har bir fraksiyaga to'g'ri kelgan cho'qqi (pik) sathi quyidagi formula yordamida hisoblab topiladi: $A = (lgh/2) * a$ Bu yerda: A - shartli birlikdagi DNK fraksiyasining miqdori; h – pik balandligining o'nli logarifmi; a - pikning asosi (mm da). Hamma fraksiyalar uchun olingan A ning qiymatlari yiqindisi shartli birlikda ifodalangan DNK ning umumiy miqdorini tashkil etadi, bunga asoslanib har bir fraksiyaning prosent nisbatlarini hisoblab topish mumkin.



1.Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. Poliakrilamid gelidagi elektroforez usulning afzalligi nimada?
2. DNKning miqdori qaysi formula yordamida hisoblab topiladi?
3. Gel tayyorlash uchun qaysi preparatlardan foydalanadi?

2. Topshiriq. Kichik keys.

DNK elektr maydonida harakatlanishiga ularning molekulyar og'irligi ham ta'sir ko'rsatadi. Kichik molekulyar og'irlikdagi molekula ildamroq, kattasi vazminroq harakatlanadi. Natijada bir xil zaryadlanish darajasiga ega bo'lgan nukleotidlar molekulyar og'irligiga ko'ra ajratiladi. Elektroforez va elektrofotogrammada DNK ni aniqlashdan maqsad nima, qaysi sohalarda qo'llaniladi?

14-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

PZR usuli bilan tanishish

Darsning maqsadi: Polimer zanjir reaksiyalar borish mexanizmini o'rganish.

Nazariy qism: Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) bu DNK ma'lum qismining ko'plab marotaba (million yoki milliard) nusxasini olish uchun qo'llanadigan, keng tarqalgan laborator usul hisoblanadi. Bu DNK qismi tajriba o'tkazuvchini qiziqtirgan har qanday soha bo'lishi mumkin. Misol uchun, bu tadqiqotchi funksiyasini aniqlashni maqsad qilgan gen yoki sud-tibbiy ekspertizasida jinoyatni ochish uchun qo'llanadigan genetik ashyoviy dalil bo'lishi ham mumkin. Odatda PZRning maqsadi DNKning kerakli qismini tahlil qilish yoki boshqa maqsadlar uchun yetarli darajada hosil qilishdir. Misol uchun, PZR orqali ko'paytirilgan DNK keyingi tajribalar, masalan, ketma-ketlikni aniqlash, gel elektroforez yoki klonlash uchun yuborilishi mumkin. PZR biologiya va tibbiyotning ko'plab sohalari, xususan, molekulyar biologiya, tibbiy tashxislash va hatto ekologiyaning ayrim sohalarida ham qo'llanadi.

Organizm hujayrasidagi DNK replikatsiyasi kabi, PZR jarayonida ham yangi DNK zanjirlarini hosil qilish uchun andoza DNK va DNK polimerazalarning bo'lishi talab etiladi. PZRda odatda **Taq polimeraza** deb nomlangan DNK polimerazasi qo'llanadi, bu issiqlikka chidamli bakteriyalardan (*Thermus aquaticus*) ajratib olinadi.

T. aquaticus issiq buloqlar va gidrotermal tuynuklarda yashaydi. Uning DNK polimerazasi issiqlikka juda chidamli va 70°C (bu haroratda odam yoki *E. coli* DNK polimerazasi nofunktsional holatda bo'ladi) atrofida eng faol holatda bo'ladi. Bu haroratga chidamli Taq polimeraza PZR uchun juda mos keladi. Ko'rib

turganimizdek, PZRda yuqori harorat andoza DNKni **denaturatsiyalash** yoki uning zanjirlarini ajratish uchun takroriy ravishda qo‘llanadi.

PZR praymerlar

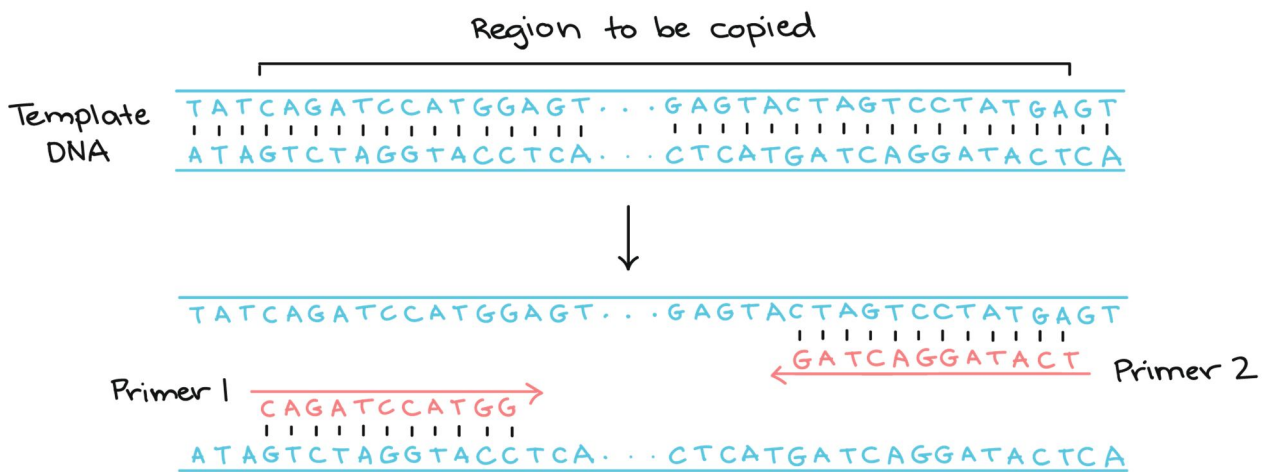
Boshqa DNK polimerazalar singari *Taq* polimeraza ham faqatgina qisqa nukleotidlar ketma-ketligi, ya’ni **praymerlar** mavjud bo‘lgandagina DNK sintezini boshlashi mumkin. PZR reaksiyalarida tajriba o‘tkazuvchi praymer yordamida nusxasi olinishi yoki ko‘paytirilishi kerak bo‘lgan DNK qismini belgilaydi. PZR praymerlari qisqa bir zanjirli DNK bo‘laklari bo‘lib, odatda 20 ta nukleotiddan iborat. Har bir PZR reaksiyasida ikkita praymer ishlatiladi va ular nishon (nusxalanishi kerak bo‘lgan) qismga yon tomonlaridan birikishga moslashtirilgan. Bunda praymerlar ketma-ketligi andoza DNKning qarama-qarshi zanjiriga, ya’ni nusxasi yaratilishi kerak bo‘lgan qismning chetki uchi (qirrasi)ga bog‘lanadi. Praymerlar andozaga komplementar asos juftlashuvi orqali bog‘lanadi. PZR biologiya va tibbiyotning ko‘plab sohalar, xususan, molekulyar biologiya, tibbiy tashxislash va hatto ekologiyaning ayrim sohalarida ham qo‘llanadi.

Taq polimeraza

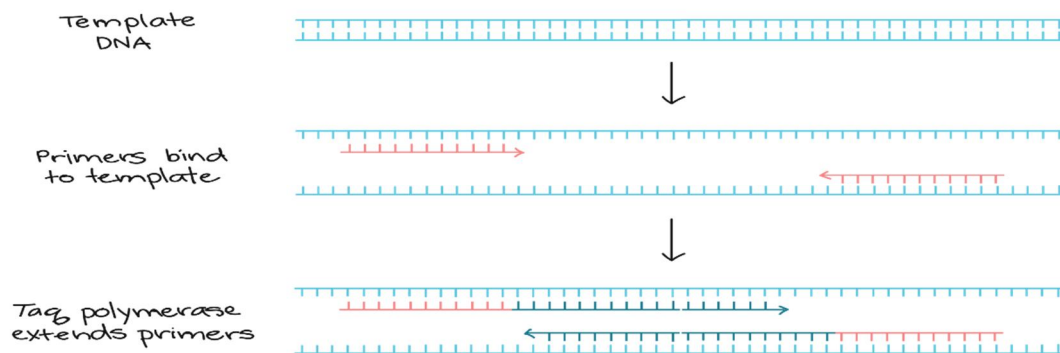
Organizm hujayrasidagi DNK replikatsiyasi kabi, PZR jarayonida ham yangi DNK zanjirlarini hosil qilish uchun andoza DNK va DNK polimerazalarning bo‘lishi talab etiladi. PZRda odatda **Taq polimeraza** deb nomlangan DNK polimerazasi qo‘llanadi, bu issiqlikka chidamli bakteriyalardan (*Thermus aquaticus*) ajratib olinadi. *T. aquaticus* issiq buloqlar va gidrotermal tuynuklarda yashaydi. Uning DNK polimerazasi issiqlikka juda chidamli va 70°C (bu haroratda odam yoki *E. coli* DNK polimerazasi nofunktsional holatda bo‘ladi) atrofida eng faol holatda bo‘ladi. Bu haroratga chidamli Taq polimeraza PZR uchun juda mos keladi. Ko‘rib turganimizdek, PZRda yuqori harorat andoza DNKni **denaturatsiyalash** yoki uning zanjirlarini ajratish uchun takroriy ravishda qo‘llanadi.

PZR praymerlar

Boshqa DNK polimerazalar singari *Taq* polimeraza ham faqatgina qisqa nukleotidlar ketma-ketligi, ya’ni **praymerlar** mavjud bo‘lgandagina DNK sintezini boshlashi mumkin. PZR reaksiyalarida tajriba o‘tkazuvchi praymer yordamida nusxasi olinishi yoki ko‘paytirilishi kerak bo‘lgan DNK qismini belgilaydi. PZR praymerlari qisqa bir zanjirli DNK bo‘laklari bo‘lib, odatda 20 ta nukleotiddan iborat. Har bir PZR reaksiyasida ikkita praymer ishlatiladi va ular nishon (nusxalanishi kerak bo‘lgan) qismga yon tomonlaridan birikishga moslashtirilgan. Bunda praymerlar ketma-ketligi andoza DNKning qarama-qarshi zanjiriga, ya’ni nusxasi yaratilishi kerak bo‘lgan qismning chetki uchi (qirrasi)ga bog‘lanadi. Praymerlar andozaga komplementar asos juftlashuvi orqali bog‘lanadi.



Praymerlar andozaga bog'langach, ular polimerazalar tomonidan uzaytiriladi va ularning o'rtasida joylashgan qismning nusxasi yaratiladi.

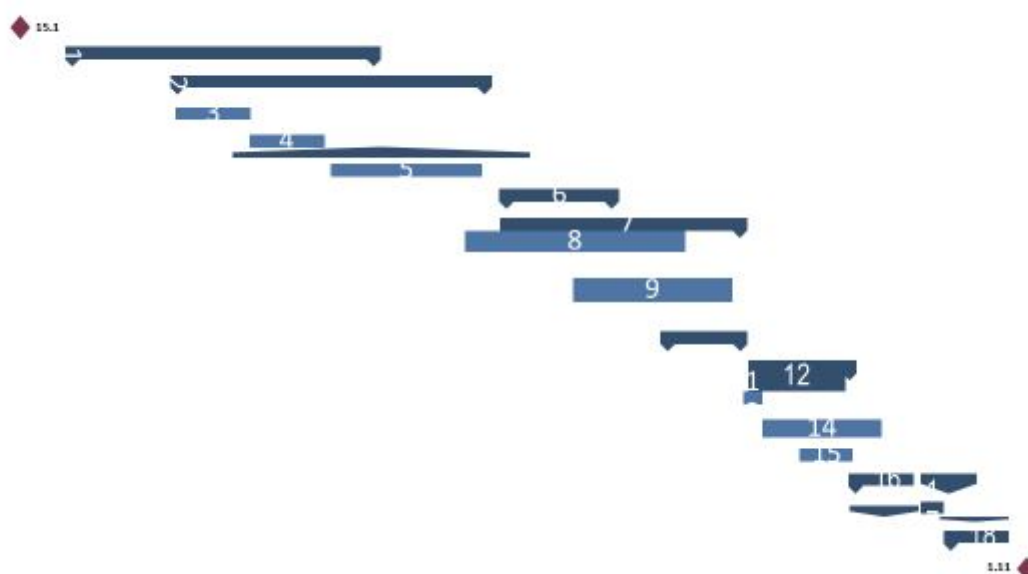


1. Topshiriq nazorat savollariga javob bering.

1. PZR odatda qanday nomlanadi?
2. PZR ning maqsadi nima?
3. PZR reaksiyasi necha bosqichda boradi?

2. Topshiriqlar. Tajribani tavsiflang, rasm chizing, xulosa chiqaring.

Polimeraza zanjir reaksiyalari shu tasvir orqali izohlang



1.

15-LABORATORIYA MASHG'ULOTI

**Polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida DNK bo'laklarini ko'paytirish
(virtual)**

Darsning maqsadi: Polimeraza zanjir reaksiyalari haqida umumiy nazariy va amaliy bilimlarni egallash.

Nazariy qism. Gen injinerligi paydo bo'lgandan boshlab biologik kimyo va molekulyar genetikaning turli sohalarida ko'plab olimlarning tadqiqotlari tufayli rivojlandi. Shu bilan birga uzoq vaqt makro molekulaning asosiy sinfi bo'lib

oqsillar hisoblangan genlarni ham oqsil tabiatli deb hisoblangan. Biroq 1944-yilda irsiy axborotni tashuvchi DNK molekulasi ekanligi isbotlandi. Uning qo'sh spiral strukturasini 1953-yil Votsin va Krik tomonidan kashf etilgan. Bu kashfiyotlar nuklen kislotalarni jadallik bilan o'rganishga imkon berdi. Molekulyar genetikaning jadallik bilan rivojlanishi virus va plazmid DNK molekulalarini yuqori tozalangan preparatini ajratish metodlarini ishlab chiqishga olib keldi. Ularni hujayralaraga biologik faol shaklda joylashtirish imkoniyati tug'ildi. Bu bilan DNK replikasi va ma'lum gen ekspressiyasi ta'minladi. DNKni o'rganish, reaksiyalarini katalizlovchi fermentlar 70-yillarga kelib ochildi. Rekombinant DNK ni olish texnologiyasining eng muhim metodlaridan biri polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) hisoblanadi. Hozirgi kunda PZR ham ilmiy tadqiqotlarda amaliy masalalarni yechishda (genotiplash, yuqumli kasalliklar diagnostikasi, sud-tibbiyot ekspertizasi va boshqalarda) keng qo'llaniladi. PZR metodi prinsipini Keri Mullis ("Cetus" firmasi AQSH) 1983-yilda chiqilgan. Buning uchun u Nobel mukofotiga sazavor bo'lgan. PZR molekulyar biologiyani eksperimental metodi bo'lib, DNKni ma'lum qismlarini in vitro sharoitida termostabil DNK – polimeraza yordamida fermentativ nusxalarini olinadi, ya'ni DNK ning selektiv amplifikatsiyasi olinadi. Bu metod namunadagi DNK fragmentini (ba'zan RNK) kam miqdorda bo'lganda ham ko'paytirish imkonini beradi. PZRning bir nechta turlari mavjud: - qaytar transkripsiya bilan tutash PZR; - uyachali PZR; - miqdoriy PZR; - PZR in situ; - multipleks (multipraymerli) PZR; - assimetrik PZR; - qaynoq startli PZR; - DNKning katta fragmentlarini yuqori aniqlik bilan amplifikatsiyalash; - Allel spetsifik PZR; - Matriksni metillanishiga sezgir PZR; - Immuno PZR, kabi turlaridan foydalanilmoqda.

Kerakli reaktivlar: 3,8% li natriy sitrat, DNK ajratish uchun DiatomTM DNA Prep 200 reagentlar to'plami («Izogen laboratoriyasi»), PZR o'tkazish uchun GenePakTM PZR Core liofilizatsiyalangan reagentlar to'plami, "Sintol" firmasining real vaqtdagi PZR o'tkazish uchun reagentlar to'plami, agaroz, bromfenol-ko'ki, etidium bromid, marker (100 j.n., Sintol), TBE bufer uchun tris, bor kislotasi va EDTA, 70% va 96% li etil spirti, dNTP, PCR Diluent (PCR erituvchi), PCR Oil (PCR uchun yog').

Kerakli jihozlar: 1. PZR- amplifikator– Applied Biosystems 9700;
2. Real vaqtdagi (Real-time PCR) PZR-amplifikator– Applied Biosystems 7500,

AQSH PZR reaksiya aralashmasining komponentlari:

1) praymerlar-bu uzunligi 15-30 juft oligonuklotidlar bo'lib, DNK ning nishonlari uchastkasiga komplementar (analizning spetsifligi va sezgirligi). Praymerlarning tanlanganligiga bog'liq. Praymerlar spetsifik bo'lishi lozim, ular dimer va tugunlar (biri-biri bilan yoki qarama-qarshi uchlari bilan birikib) hosil qilmasligi lozim, praymerni ulash sohasi mutatsiya sohaslaridan tashqarida bo'lishi kerak (deletsiya yoki inversiya)

2) Taq polimeraza – DNK polimeraza. Bu termostabil ferment bo'lib, komplementarlik prinsipiga asosan 3' - uchini uzayishini davom ettiradi.

3) Dezoksinukliotedtrifosfatlar (ATF, GTF, STF, TTF) bu aralashma taq polimeraza tomonidan qurilish materiali sifatida ishlatiladi.

4) Bufer – bu ma'lum miqdordagi kationlar va anionlar aralashmasi bo'lib, reaksiyani o'tishi uchun optimal sharoitni va stabil pH ko'rsatgichini ta'minlaydi.

5) Analiz qilinayotgan namuna – bu keyinchalik nishon bo'lib, xizmat qiladigan DNK uchastkasi mavjud bo'lgan preparat.

Ishni bajarish tartibi:

PZR amplifikatsiyasini reagentlar to'plami bilan o'tkazish quyidagi ketma-ketlikda amalga oshirildi:

1. Reaksiya o'tkazishdan oldin muzlatgichdan kerakli miqdorda Master Miks probirkalari olindi.
2. Master Miks probirkalarini (+), (-) tarzida belgilandi – nazorat va tekshirilayotgan namuna.
3. Hamma probirkalarga – nazorat va tekshirilayotgan namunalarga PSR eritmasidan (Diluent) 10 mkl solindi. Probirkadagi aralashmani ataylab eritish shart emas.
4. Hamma probirkalarga 2,5 mkl dan praymerlar solindi. Praymerlar konsentratsiyasi 0,1-0,5 mkM.
5. Master Miks probirkalariga 5 mkl dan DNK solindi. (-) nazoratga distillangan suv solindi.
6. Probirkalarni og'zini yopgan holda PSR-amplifikatoriga qo'yildi va tegishli amplifikatsiya dasturi tanlandi. Amplifikatsiya PSR- amplifikator (Applied Biosytems 9700) uskunasi o'tkazildi.

CYP21genini amplifikatsiya qilish uchun ishlatilgan

praymerlar: Forward (U1-F) 5'-

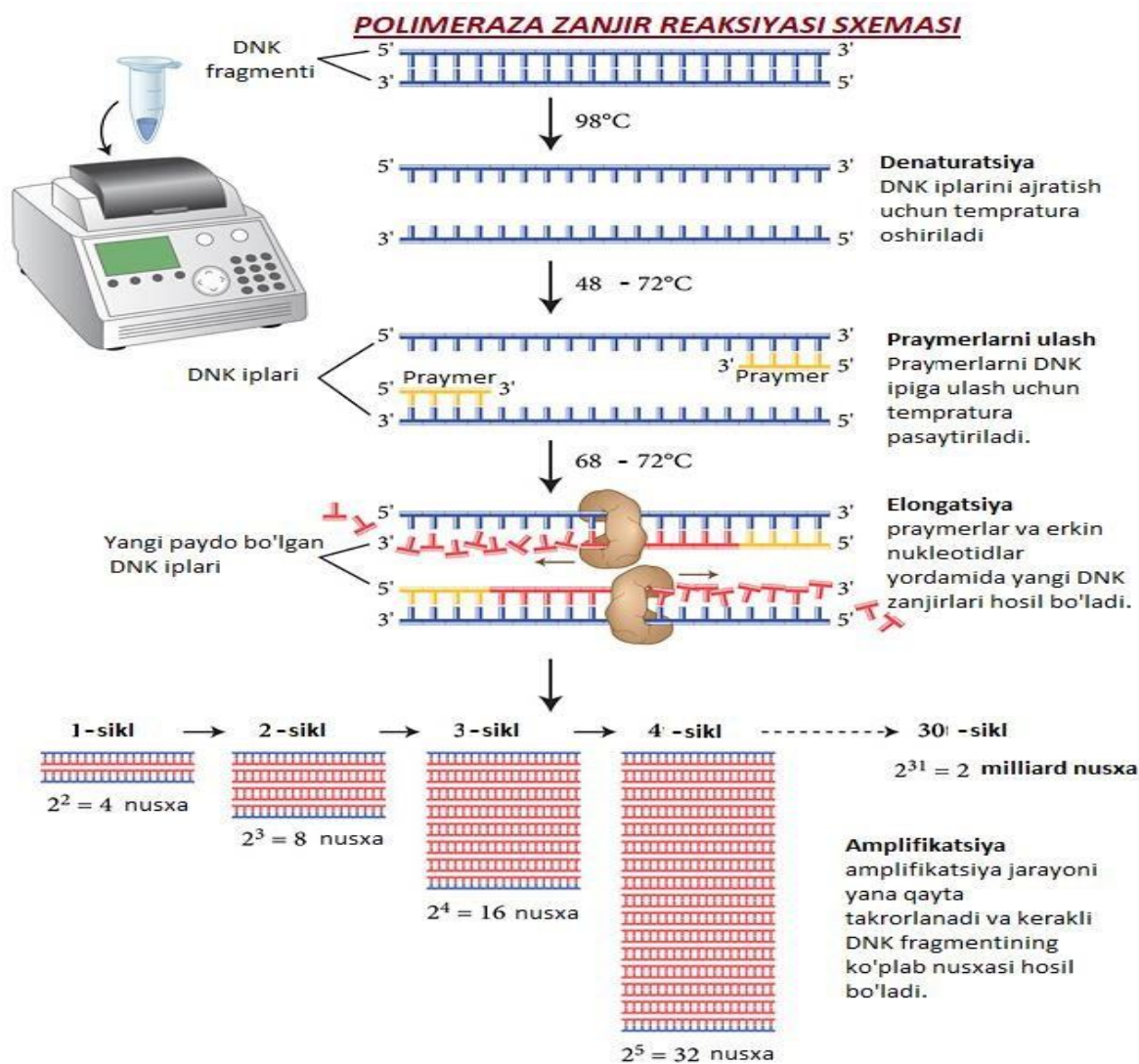
GAGTACCTTGGAGGGCCTGCT-3'; Reverse (F3-R) 3'-

GCTACACTCCAGCGTCTGAGG-5'.

PZR bir necha bosqichda amalga oshiriladi:

1-bosqich denaturatsiya. Yuqori harorat ta'sirida DNK denaturatsiyasi hisoblanadi. DNKning kerakli kesigini amplifikatsiyalash reaksiyon aralashmaga 2 yoki undan ortiq praymerlarni qo'shish bilan amalga oshiriladi, bu praymerlar aynan kesikning uchki sohalariga komplementar bo'lishi kerak, bu esa butun DNKdan emas balki kerakli genlardan nusxa olishni ta'minlaydi. Reaksiyani tugashi bilan DNK yana denaturatsiyaga uchraydi va sikl takrorlanadi. Bu siklni ko'p marotaba takrorlash reaksiyon aralashmani nishon DNK molekulalari bilan boyishiga olib keladi, bu reaksiya zanjirli reaksiya bo'lib, har keyingi siklda matritsa bo'lgan holda faqat dastlabki, DNK emas balki oldingi sikllarda sintezlangan yangi DNK molekulalari ham xizmat qiladi. Shundan so'ng reaksiyon aralashmaga DNK polimeraza va dNTFlar qo'shiladi, ular praymerlarda

polimerazasiya reaksiyasini ta'minlaydi. PZRning o'tishi haroratni o'zgartirish bilan boshqariladi: - DNK denaturatsiya harorati – ixtiyoriy yuqori molekulyar genom DNK uchun denaturatsiya harorati – 95° C qilib belgilangan. Amplifikatsiya mahsulotlari va “praymer matritsa” komplekslari uchun harorat pastroq bo'ladi.



2-bosqich. Praymerni ulash. Bu praymer oligonukliotining bir zanjirli DNK matritsasi bilan bog'lanishini ta'minlaydigan harorat. Bu harorat har bir konkurent praymer uchun odatda 55-60° C yoki turlicha bo'ladi.

3-bosqich. Elongatsiya. Bu bosqichda harorat foydalanilayotgan ferment tipiga bog'liq.

Toq polimerazaning fermentativ faolligi uchun optimal harorat 72° C. PZR yuqori analitik va diagnostik sezgirlikka yuqori spetsifiklik natijalarni tez olish va reaksiya o'tkazish jarayonining universalligi bilan farqlanadi.

Natijada o'rganilayotgan DNK fragmenti ikki hissa ko'payadi va bu bosqichlar yana boshidan boshlanadi. Sikl bir necha marta takrorlanadi. O'rganilayotgan DNK fragmenti soni 4 soat ichida 1.074.741.764 ga yetadi.



1.Topshiriq.Nazorat savollariga javob bering.

- 1.Praymer tarkibida nechtagacha nukleotid bo'ladi?
- 2.PZR reaksiyasi necha bosqichda boradi?
3. PZR o'tkazish uchun qanday reagentlar to'plami kerak?
- 4.Tajriba bajarishda qaysi buffer eritmadan foydalaniladi?
5. Analiz qilinayotgan namunadan keyinchalik nima sifatida foydalanish mumkin?

2.Topshiriq. Kichik keys.PZR Reaksiyani tugashi bilan DNK yana denaturatsiyaga uchraydi va sikl takrorlanadi. Bu siklni ko'p marotaba takrorlash reaksiya aralashmani nishon DNK molekulalari bilan boyishiga olib keladi, bu reaksiyada nishon DNK deganda nimani tushundingiz.

X. TAVSIYA ETILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI (LIST OF RECOMMENDED LITERATURE)

Asosiy adabiyotlar

1. Д. Нильсон, М. Кокс. Основы биохимии. Лелинджера. Москва, БИОНОМ. Лаборатория знаний, 2011
2. M.N. Valixonov. Biokimyo. Toshkent. "Universitet", 2009
3. To'raqulov Yo.H. Biokimyo. Toshkent. O'zbekiston, 1996
4. Sulliyeva S.X, Zokirov Q.G' Biolimyo va molekulyar biologiya (2-qism) Termiz. "TerDU" nashriyoti 2022

Qo'shimcha adabiyotlar

5. Mirziyoyev Sh. M. Buyuk keljagimizni mard va oliyjanob xalqimiz bilan birga quramiz.-Toshkent. "O'zbekiston", 2017.-488-b.
6. Березов Т. Биологическая химия. Москва, 2000
7. Кольман Яю Рём Кюю Наглядная биохимия. Москва, 2000
Северин Е.С. Биохимия. Москва, "ГЕОТАРМЕД", 2004

Axborot manbalari:

1. www.gov.uz – O‘zbekiston Respublikasi hukumat portal
2. www.lex.uz – O‘zbekiston Respublikasi Qonun hujjatlari ma’lumotlari milliy bazasi
3. <http://www.natlib.uz>
4. <http://ek.uzmu.uz>
5. <http://www.lib.mn>
6. www.biohimija.ru
7. www.meduniver.com
8. www.xumuk.ru
9. www.pedagog.uz
10. terdu.arm.uz
11. tersu.uz
12. <http://unlibrary.uz>

XULOSALAR.

TAKLIF VA TAVSIYALAR.

TAVSIYA ETILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI

Rahbariy adabiyotlar:

1. Mirziyoev Sh.M. Buyuk kelajagimizni mard va olijanob xalqimiz bilan birga quramiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017
2. Mirziyoev Sh.M. Qonun ustuvorligi va inson manfaatlarini ta'minlash-yurt taraqqiyoti va xalq farovonligining garovi. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017
3. Mirziyoev Sh.M. Erkin va farovon, demokratik O'zbekiston davlatini birgalikda barpo etamiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2016
4. Mirziyoev Sh.M. Tanqidiy tahlil, qat'iy tartib-intizom va shaxsiy javobgarlik- har bir rahbar faoliyatining kundalik qoidasi bo'lishi kerak. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017

Asosiy adabiyotlar

1. D.Nelson, M.Koks. Основы биохимии Lenindjera. Moskva, BINOM. Laboratoriya znaniy, 2011.
2. To'raqulov Yo.H. Biokimyo va molekulyar biologiya. Toshkent. "O'zbekiston", 1996.
3. Valixanov M.N., Dalimova S.N., Umarova G.B., P.Mirxamidova, Biologik kimyo va molekulyar biologiya (2-qism Molekulyar biologiya) Toshkent, "Navro'z" 2015
4. M.N.Valixanov, Biokimyo Toshkent "Universitet". 2009

Qo'shimcha adabiyotlar

1. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. Москва «Высшая школа» 2000
2. Ленинжер А. Основы биохимии. 3-том, М., Мир, 1984.
3. Филипович Ю. Основы биохимии. М., ФЛИНТА, 1999.
4. Березов Т. Berezov T. Биологическая химия. М. 2000
5. Колман Я. Рём К. Наглядная биохимия. М., 2000
6. Северсин Е. С. Биохимия. М., ГЕОТАр-МЕДЮ 2004.
7. Шапиро Д.К. «Пратикум по биологической жимии», М., «Высшая школа». 2004

8. R.P.Igamnazarov, M.M.Abdullayeva. Biokimyodan laboratoriya mashg'ulotlari. Toshkent. "Universitet" 2015

9. Oliy ta'lim jarayonida zamonaviy pedagogik texnologiya asosida o'quv faoliyatini tashkil etish uslub va vositalari. Toshkent Davlat Texnika universiteti, Toshkent. 2007 yil.

Internet saytlari:

1. www.biohimija.ru
2. www.meduniver.com
3. www.xumuk.ru
4. www.pedagog.uz