

**O`ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIIY VA O`RTA MAXSUS TA`LIM VAZIRLIGI**

**MIRZO ULUG`BEK NOMIDAGI
O`ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI
JIZZAX FILIALI**

**Mustafakulov M.A.
Qarshiboyev Z.Z**

**“BIOKIMYO VA MOLEKULYAR BIOLOGIYA” FANIDAN
LABORATORIYA ISHLARI**

USLUBIY QO`LLANMA

JIZZAX 2022

Ushbu uslubiy qo'llanma M.Ulug'bek nomidagi O'zbekiston Milliy universiteti Jizzax filiali Biotexnologiya va amaliy matematika fakulteti Biokimyo kafedrasida mavjud labortoriya amaliyoti sharoitlari asosida talabalarni "Biokimyo va molekulyar biologiya" o'quv kursining amaliy laboratoriya mashg'ulotlari mazmuni bilan tanishtirish hamda nazariy bilimlarni mustahkamlash uchun tayyorlangan.

Mazkur qo'llanmada zamonaviy keng qo'llaniladigan biologik materialda o'tkaziladigan laboratoriya tadqiqotlarining biokimyoviy uslublar yoritilgan. Har bir uslubning ta'rifi o'z ichiga tadqiqotning borishi va mohiyati haqida ma'lumotni qamrab olgan. Uslubiy qo'llanma Oliy o'quv muassasa talabalariga mo'ljallangan.

Данное методическое пособие подготовлено на основе имеющихся условий учебной лаборатории кафедры Биохимии Биологического факультета Национального университета имени М.Улугбека для ознакомления с содержанием практических и лабораторных занятий учебного предмета «Биохимия и молекулярная биология», а также укрепления полученных теоретических знаний.

В данном методическом пособии освещены методы биохимических исследований, проводимых на различном биологическом материале. Описание каждой работы включает сведения о принципе и порядке проведения работы. Методическое пособие рассчитано на студентов высших учебных заведений.

This tutorial was prepared to introduce students with the content of the practical sessions of the training course "Biochemistry and molecular biology" and the strengthening of theoretical studies in the laboratory practice of Biochemistry Department of Biology at the National University of Uzbekistan named after M. Ulugbek.

This tutorial highlights clinical methods of laboratory research conducted with blood, urine and other biological materials. The explanation of each method includes data on the course and meaning of the study and the clinical and diagnostic significance of the test is given.

The manual is intended for students of higher education institutions.

Tuzuvchilar:

Taqrizchilar:

Маматова З.А.	Mirzo Ulug'bek nomidagi O'zMU Biologiya fakulteti Odam va hayvonlar fiziologiyasi kafedra mudiri, b.f.n., dotsent
Dalimova D.A.	O'zbekiston Respublikasi Innovatsiya Vazirligi qoshidagi Ilg'or Texnologiyalar Markazi laboratoriya mudiri b.f.n.

Uslubiy qo'llanma O'zMU JF uslubiy Kengashining 2022 yil __ oyi majlisida muhokama qilinib nashrga tavsiya etilgan (bayonnoma №__)

Kirish

“Biokimyo va molekulyar biologiya” umumiykasbiy fanlar blokiga kiritilgan kurs hisoblanib, 3- va 4-semestrlarda o'qitilishi maqsadga muvofiq. Mazkur fandani olingan bilimlar esa “Immunologiya”, “Biofizika”, “O'simliklar fiziologiyasi”, “Biotexnologiya”, “Fiziologiya” hamda ixtisoslik fanlaridan laboratoriya mashg'ulotlarini bajarishda keng qo'llanilib, bo'lg'usi mutaxassislarda ko'nikma va malaka shakllanishida muhim o'rin tutadi.

«Bu fanning asosiy vazifasi talabalarga biologiyaning biokimyoviy negizi, uning tarkibiy qismlari, umumbiologik qonunlar va kategoriyalar, biologik hodisa va jarayonlar mohiyati, biokimyoviy tizimlar va ularning amal qilish qonuniyatlari, biokimyoviy jarayonlarni jamiyatni iqtisodiy rivojlanishidagi o'rni kabi masalalarni qamrab oladi. Jamiyatda mavjud iqtisodiy qonunlarni bilish va ularning amal qilishiga ongli munosabatda bo'lishda, mamlakatni demokratlashtirish va iqtisodiyotni bozor tamoyillari asosida isloh qilish jarayonlarining mohiyatini tushunishda talabalarni zarur bo'lgan bilimlar bilan qurollantiradi.

Ushbu fan bo'yicha talabalarning bilim, malaka va ko'nikmalarni mustahkamlashda o'tiladigan laboratoriya mashg'ulotlarining ahamiyati katta. Ushbu uslubiy qo'llanmaga “Biokimyo va molekulyar biologiya” faniga oid 29 ta laboratoriya ishlari kiritilgan bo'lib, ular fanning namunaviy dasturida ko'rsatilgan vazifalarni to'liq qamrab olish bilan birga talabalar oladigan nazariy bilimlarni o'tkaziladigan tajribalar asosida mustahkamlab, ularda davlat talim standartiga mos bilim, malaka va ko'nikmalarni shakllantirishga xizmat qiladi.

BIOKIMYO QISM

1 – laboratoriya mashg`uloti

Laboratoriya mashg`ulot darsiga kirish va laboratoriya texnikasi bilan tanishtirish.

Kafedra laboratoriyalarida ishlash xavfsizlik qoidalar

Kafedrada olib boriladigan ishlar elektr toki, gaz, zaxarli reaktivlar, portlash xavfi bo`lgan uskunalar, shisha idishlar, asboblarni bilan amalga oshirilganligi sababli maxsus qonun-qoidalarga rioya qilish talab etiladi. Ushbu qonun – qoidalarga rioya qilish nafaqat shaxsiy xavfsizlikni, balki atrofdagi insonlarni xavfsizligi uchun ham zarur.

Qat'iy ta'qiqlanadi:

1. O`quv laboratoriyalarda xalatsiz ishlash.
2. O`quv laboratoriyalarida chekish va ovqat iste'mol qilish.
3. Stol ustiga portfel va sumkalarni qo`yish.

Laboratoriya xonalari yoriq bo`lib, poli linolium bilan qoplangan bo`lishi kerak. Laboratoriya stollariga o`tkazilgan elektr ma'nasi va gaz o`tkazgichlari linolium yoki plastik materiallar bilan qoplangan bo`lishi kerak.

Kimyoviy reaktivlar bilan ishlash uchun texnika xavfsizligi yo`riqnomasi

Xavfsiz holda ishlash va baxtsiz hodisalarni oldini olish maqsadida quyidagi texnika xavfsizligi qoidalariga rioya qilish darkor.

1. Zaxarli moddalar bug`i va gaz bilan ishlash faqat mo`rili shkaflarda olib boriladi.
2. Gaz va elektr ma'nbalarini sozligini doimiy ravishda kuzatib borish lozim.
3. Yonib turgan gaz ma'nbalarini qoldirib ketish man etiladi. Faqat laboratoriya mashg`ulotlari vaqtidagina yoqish mumkin.
4. Ish joyi toza va ozoda bo`lishi kerak.

Zaxarli va o`yuvchi kimyoviy moddalar bilan ishlash vaqtida:

1. Kislota, asoslar va formalinni quyish paytida voronkadan foydalanish, ko`zoynak taqish va rezina qo`lqop kiyish zarur.
2. Zaxarli moddalarni shkaflarda va qutilarda saqlash mumkin emas.
3. Zaxarli moddalarni butun idishlarda, ustiga nomlari yozilgan holda saqlash zarur.
4. Zaxarli gazlarni hidlashdan ehtiyot bo`lish zarur.
5. Kislotali eritma tayyorlashda kislota suvga quyilish kerak. Aksincha qilish man etiladi.
6. Kislota, asoslar va boshqa moddalar bilan kuygan taqdirda zudlik bilan sovuq suvda uzoq muddat yuvib, so`ngra tibbiy bo`limga murojat qilish kerak.
7. Kimyoviy kuyish vaqtida kaliy permanganatning 2% eritmasi bilan yuvib tashlash lozim bo`ladi. So`ngra ushbu eritmadan jaroxatlangan yuzaga marli yordamida kompres qilish lozim bo`ladi.
8. Kislota bilan kuyish paytida natriy gidrokorbanatning 1% li eritmasi bilan, asoslar bilan kuyganda 1% li sirka kislota bilan yuvish kerak. Kislota yoki asos ko`zga tushgan taqdirda 2% li borat kislota eritmasi bilan yuvish darkor.

Elektroasboblarni ishlash uchun texnika xavfsizligi yo`riqnomasi

1. Asbob – uskunalarni ishlashga faqatgina asbobning pasportini o`rganib chiqqan, elektroasboblarning ekspluatatsion qoidalarini, qamda kimyoviy moddalar bilan ishlash qoidalarini biladigan shaxslarga ruxsat beriladi.
2. Indikasiya "ko`zchasi" yonmayotgan asbob bilan ishlash man etiladi.
3. Elektroasboblarni ustiga ventilyatsiyaga to`squinlik qiladigan predmetlarni qo`yish, asboblarning ichiga tushib ketishi natijasida qisqa tutashuv vujudga keltiruvchi metal buyumlarni qo`yish ta'qiqlanadi.
4. Asboblarni ishlash paytida yerga ulangan himoyalovchi sim bilan ta'minlangan bo`lishi kerak. Yerga ulangan himoyalovchi sim ("Zazemlenie") ning sifatini ham vaqti-vaqti bilan tekshirib turish kerak.
5. Elektromagnitga ulanib turgan asbobda ta'mirlash ishlarini olib borish ta'qiqlanadi.
6. Izolyatsiyasi buzilgan elektroasboblarni ishlatish ta'qiqlanadi.
7. Tok o`tadigan qismlarga ho`llangan qo`lning tekkizish mumkin emas.

2 – laboratoriya mashg`uloti

Eritmalar klassifikatsiyasi va ularni tayyorlash

Ishning maqsadi: Eritma, erituvchi, eritmaning konsentratsiyasi, erigan moddaning massa ulushi, molyar konsentratsiya, normal konsentratsiya, molyal konsentratsiya, eritmaning titri, eruvchanlik, to`yingan eritma, diffuziya, osmos, osmotik bosim, gipertonik eritmalar, izotonik eritmalar, gipotonik eritmalar, plazmoliz hodisalari bilan tanishish.

Ishning nazariy asoslari

1. Eritmalarning umumiy xarakteristikasi

Ikki yoki bir necha komponentdan iborat qattiq yoki suyuq gomogen sistema **eritma** deb ataladi. Tabiatda va texnikada eritmalarning ahamiyati katta. Tabiatdagi barcha suvlar eritmalar hisoblanadi. Ko`pchilik kimyoviy reaksiyalar eritmalarida boradi.

Eritmalar ikki yoki undan ortiq komponentlar (tarkibiy qismlar) va ularning o`zaro ta`sir mahsulotlaridan tarkib topgan bir jinsli (gomogen) sistemalaridir. O`z agregat holatini eritmaga o`tkazadigan modda **erituvchi** hisoblanadi. Eritma bir jinsli sistema bo`lgani uchun ko`z va mikroskop bilan eritma ichidagi erituvchi va erigan modda zarrachalarini ko`rib bo`lmaydi. Eritma tarkibini o`zgartirish mumkin. Masalan, sulfat kislotasi yoki nitrat kislotani suv bilan har qanday nisbatda aralashtirish mumkin. Sulfat kislotaning suvda erishi hech qanday chegaraga ega emas. Spirt ham suvda shunday eriydi.

Moddalar chegarasiz eriganida eritmada erigan moddalarning foiz miqdori 0 dan 100 % gacha bo`ladi. Bunday hollarda eruvchi va erituvchi orasidagi ayirma yo`qoladi; bulardan istalganini erituvchi deb qabul qilish mumkin

Lekin juda ko`pchilik moddalar ayni temperaturada ma`lum chegaraga qadar eriydi. Masalan, uy temperaturasida osh tuzining suvdagi eritmasida NaCl ning miqdori hech qachon 26,48% dan ortmaydi.

Eritmalar tarkibning o'zgaruvchanligi ularni mexanik aralashmalarga yaqin deb qarashga imkon beradi. Lekin ularning bir jinsliliigi va ko'p xollarda eruvchanlikning ma'lum chegaradan oshmasligi eritmalarini kimyoviy birikmalarga yaqinlashtiradi. Shunday qilib, **eritma mexanik aralashma bilan kimyoviy birikma orasidagi oraliq holatni egallaydi.**

Agregat holatiga ko'ra eritmalar suyuq, qattiq va gazsimon bo'ladi. Suyuq eritmalarga misol tariqasida tuzlarning suvdagi eritmalarini ko'rsatish mumkin; qattiq eritmalarga nikel bilan misning qotishmasi (shulardan chaka – tanga yasaladi) yoki oltin bilan kumushning qotishmasi misol bo'la oladi; gazsimon eritmalar – gazlarning aralashmalari, havo bunga misol bo'la oladi. Bular orasida eng katta ahamiyatga ega bo'lgani suyuq (suvdagi) eritmalaridir.

Eritmalarning fizikaviy xossalari (masalan, qaynash temperaturalari) erigan modda miqdori ortishi bilan o'zgaradi. Ko'pincha eritma hosil bo'lganida hajmiy va energetik o'zgarishlar yuz beradi.

Ko'pchilik moddalar eritmalarining kimyoviy xossalari eritmada eruvchi modda miqdori ortishi bilan kam o'zgaradi. Eritmalar jonli va jonsiz tabiatda, fan va texnikada katta rol o'ynaydi. Hayvon va o'simlik organizmida fiziologik jarayonlar, tabiatda cho'kindi jinslarning hosil bo'lishi, ko'pchilik sanoat jarayonlari (masalan, ishqorlarning olinishi) asosan eritmalarda sodir bo'ladi.

2. ERITMALARNING KONTSENTRATSIYASINI IFODALASH USULLARI.

Har qanday eritmaning muhim karakteristikasi uning tarkibidir. **Eritmaning yoki erituvchining ma'lum massa miqdorida yoki ma'lum hajmida erigan modda miqdori eritma konsentratsiyasi deb ataladi.**

Eritmalar konsentratsiyasini ifodalashning har xil usullari bor:

Erigan moddaning massa ulushi. Erigan modda massasini eritmaning umumiy massasiga nisbati, erigan moddaning massa ulushini tashkil etadi:

$$\omega(x) = \frac{m(x)}{m(x) + m} \quad (X.1)$$

bunda $\omega(x)$ – erigan moddaning massa ulushi;

$m(x)$ – erigan moddaning massasi;

m – eritmaning umumiy massasi.

Bu qiymat nisbiy kattalik o'lchamsiz bo'ladi. Bu qiymatni 100 ga ko'paytirilsa, massa ulushining foizlarda hisoblangan qiymati olinadi. Shu bilan birga erigan modda miqdori eritmaning umumiy miqdoriga nisbatan foiz hisobida ham ifodalanadi. Buning uchun 100 g eritma tarkibidagi erigan modda miqdori hisoblanadi:

$$C \% = \frac{a \cdot 100\%}{a + b} \quad (X. 2)$$

bu yerda $C \%$ - eritmaning massa foizi,

a - erigan modda massasi,

b – erituvchi massasi (konsentratsiyaning ω dan $C\%$ ifodalarga o'tish uchun ω ni 100% ga ko'paytirilishi yetarlidir).

Erigan moddaning massa ulushi $\omega(x)$ odatda birning ulushlarida yoki foizlarda quyidagicha ifodalanadi. Masalan, erigan moddaning – suvdagi sulfat kislotaning massa ulushi 0,05 ga yoki 5% ga teng. Bu degan suz, sulfat kislotaning 100 g massali eritmasida massasi 5g sulfat kislota va massasi 95 g suv bor, demakdir.

2. Molyar kontsentratsiya yoki molyarlik. Bunda eritma kontsentratsiyasi erigan moddaning 1 litr eritmadagi mollar soni bilan ifodalanadi.

Agar 1 l eritmada 1 mol erigan modda bo'lsa, bunday eritma kontsentratsiyasi 1 molyar bo'ladi va M bilan belgilanadi. Agar 1l eritmada 0,1 mol eruvchi modda bo'lsa, uning kontsentratsiyasi detsimolyar eritma deyiladi. (0,1 M). Yuqoridagi ta'rifga binoan

$$C_M = \frac{n_{(X)}}{V} \left(\frac{\text{моль}}{\text{л}} \right);$$

3. Normal kontsentratsiya yoki normallik. Bunda eritma kontsentratsiyasi erigan moddaning 1l eritmadagi ekvivalentlari soin bilan ham ifodalanadi.

Normal kontsentratsiyani hisoblash uchun quyidagi formuladan foydalaniladi.

$$C_H = \frac{a \cdot 1000}{\vartheta \cdot V} \quad (\text{X.3})$$

bu yerda: C_H – eritmaning normal kontsentratsiyasi,

a - erigan modda massasi,

E – erigan moddaning ekvivalent massasi ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

V – eritmaning umumiy hajmi (ml hisobida)

Ko'pincha C_H o'rinda ϑ (yoki N) harflari ham ishlatiladi. Eritma normal kontsentratsiyasi $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ifodalanadi:

$$C_H = \frac{n_{\vartheta}}{V} \quad (\text{X.4})$$

4. Molyal kontsentratsiya yoki molyallik. Molyal kontsentratsiyadan ko'pincha eritmalarining fizikaviy xossalarini tavsiflashda foydalaniladi. Erituvchining 1 kg massasida 1 mol biror modda eritib hosil qilingan eritma kontsentratsiyasi 1 molyal eritma deb ataladi.

$$C_{\text{мольал}} = \frac{a \cdot 1000}{\vartheta \cdot M} \quad (\text{X.5})$$

bu yerda: a – erigan modda massasi (grammlar hisobida);

ϑ – erituvchi massasi (grammlar isobida);

M – eruvchi moddaning molekulyar massasi;

5. Eritmaning titri.

O'zaro reaksiyaga kirishadigan moddalar eritmalarida ularning normal kontsentratsiyasi o'zaro teng bo'lsa, bu eritmalarining teng xajmlarida moddalar qoldiksiz reaksiyaga kirishadi. Normal kontsentratsiyasi bir-birinikiga teng bo'lmagan eritmalarining qoldiqsiz reaksiyaga kirishadigan hajmi ularning normalligiga teskari proporsional bo'ladi:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{N_2}{N_1} \quad (\text{X.6})$$

bu yerda : N_1, N_2 – o'zaro reaksiyaga kirishayotgan eritmalarining normal

konsentratsiyalari,
V1 – birinchi eritmaning hajmi,
V2 – ikkinchi eritmaning hajmi,

Yuqorida keltirilgan tenglama **titrlash tenglamasi** nomi bilan analitik kimyoda keng qo'llaniladi.

Eritmaning 1 millilitridagi erigan moddaning massa miqdori **titr** deb ataladi. Titr bilan normal konsentratsiya orasida quyidagi tenglik mavjud:

$$\text{titr} = \frac{\vartheta \cdot N}{1000} \quad (\text{X.7})$$

bu yerda: ϑ - erigan moddaning ekvivalent massasi,
N- eritmaning normal konsentratsiyasi.

III. ERITMALARNING UMUMIY BIOLOGIK AXAMIYATI

Eritmalar kishilar xayotida va amaliy faoliyatida nixoyatda muxim axamiyatga ega. Odamning va xayvonlarning ovqatning singdirish protsessi oziq moddalarni eritmaga aylantirish bilan bog'liqdir. Eng muxim barcha fiziologik suyuqliklar (qon, limfa va boshqalar) eritmalaridir. Nixoyat kimyoviy protsesslarga asoslangan barcha ishlab chiqarishlar xar- xil eritmalaridan foydalanish bilan ma'lum darajada bog'langandir. Inson kundalik xayotida eritmalarini uchratib turgani uchun ularning xossalari bilan qadimdayoq qiziqishgan, ammo eritmalarining tabiatini belgilovchi asosiy qonuniyatlar XVIII asrdagina topildi.

Har xil konsentratsiyali eritmalarini tayyorlash usullarini bilish tibbiy-biologik va sanitary-gigiyenik mutaxasislarni amaliy ishlarida eng zarur omillardan biridir.

Kishi organizmidagi biologik suyuqliklar-qon plazmasi,limfa,oshqozon shirasi,siydik va boshqa oqsillarning,lipidlarning,karbon suvlarning,tuzlarning suvda erigan murakkab aralashmasidir.Ularning miqdoriy aniqlash natijalaridan xastalikni turini aniqlash uchun foydalaniladi.

Organizmga yuboriladigan dori-darmonlarni hammasi organizmga aniq konsentratsiyali eritma holida yoki poroshok holida yuboriladi.Biologik eritmalarda erigan moddalarni miqdoriy nazorat qilish orqali organizmda boradigan biokimyoviy jarayonlarni nazorat qilish mumkin.Ishlar chiqarishni nazorat qilish,atrof-muhitni nuhofaza qilish,oziq-ovqat mahsulotlarini istemolga yaroqliligini bilish uchun aniq konsentratsiyali eritmalaridan foydalaniladi.Shu sababli bo'lajak shifokor,eritmalar,ularning konsentratsiyalari va konsentratsiyalarining ifodalanish usullari to'g'risidagi malumotga ega bo'lishi kerak.

IV. ERITMALARNING XOSSALARI VA XOSSALARINING BIOLOGIK AHAMIYATI. Eritmadagi diffuziya xodisasi, osmos xodisasi, eritmalarining bug' bosimi, muzlash va qaynash temperaturalari va hokazolar eritmaning xossalari hisoblanadi.

Diffuziya hodisasi

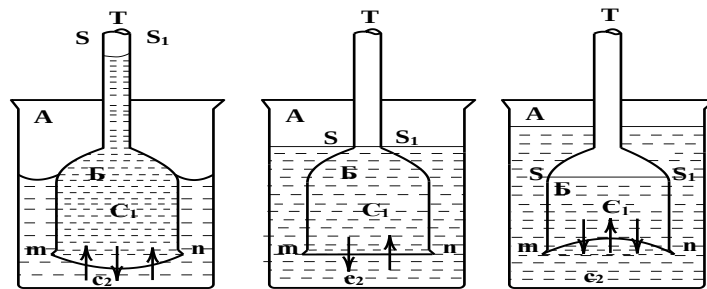
- 1) Bir modda zarrachalarining ikkinchi modda ichida taqsimlanishini ta'minlovchi jarayonni **diffuziya** deyiladi. Agar yuqori konsentratsiyali eritma olib, uning ustiga ohista suv quyilsa, erigan modda zarrachalari suvga o'ta boshlaydi va eritma bir xil konsentratsiyali bo'lishga intiladi.

Eritmalarda diffuziya hodisasining puxta o'rganish natijasida quyidagi qonuniyatlar chiqarilgan:

- 2) eritmalarda diffuziya jarayoni juda sust boradi;
 - 3) diffuziya tufayli zarrachalar kontsentratsiyasi yuqori bo'lgan joydan kontsentratsiya kam bo'lgan joyga o'tadi va, nihoyat, sistema bir xil kontsentratsiyaga erishadi;
 - 4) eritmalarda diffuziya tufayli og'irlik kuchi ham yengiladi;
- diffuziya tufayli ikkala modda zarrachalari bir-birining orasiga kiradi.

Osmos hodisasi

Agar erituvchi bilan eritma o'rtasiga yarim o'tkazgich parda (membrana) qo'yilsa, bu parda orqali erituvchi zarrachalari eritmaga o'tib, uni suyultira boshlaydi. **Erituvchi zarrachalarining yarim utkazgich parda orkali utish jarayoni osmos deyiladi.** Eritgan modda zarrachalari yarim o'tkazgich parda orqali o'ta olmaganligi sababli unga urilib ko'rsatadigan bosimi **osmotik bosim** deb ataladi. Bu bosim ta'sirida yarim o'tkazgich parda yirtilib ketishi ham mumkin, chunki eritma yetarli darajada kontsentrlangan bo'lib, yarim o'tkazgich parda uncha baquvvat bo'lmasa bu vaktida vujudga keladigan osmotik bosim bir necha o'n, hatto yuz atmosferaga yetishi mumkin.



X.2 – rasm. Osmos hodisasi sxemasi.

Agar tajriba uchun ikki xil kontsentratsiyali eritma olib, ular o'zaro yarim o'tkazgich parda orqali birlashtirilsa, suyuqlik (erituvchi) kontsentratsiyasi kichik (erituvchisi kuproq) eritmadan kontsentratsiyasi (erituvchisi kamroq) eritma tomon o'ta boshlaydi va ikkala eritmaning kontsentratsiyasi tenglashishi bilan osmos hodisasi to'xtaydi, ya'ni bu paytda yarim o'tkazgich parda orqali suyuqligi ikkala tomoniga o'tish tezligi tenglashadi va dinamik muvozanat qaror topadi (X.2 – rasm, 1,2,3). Kontsentratsiyasi yuqori bo'lgan eritmaning osmotik bosimi katta bo'ladi (X.2-rasm, 1), bunday eritmalar **gipertonik eritmalar** deb ataladi. Kontsentratsiyasi o'zaro teng bo'lgan eritmalarining osmotik bosimlari ham teng bo'ladi (X.2-rasm, 2), bunday eritmalar **izotonik eritmalar** deyiladi. Kontsentratsiyasi kichik bo'lgan eritmalarining osmotik bosimi kam bo'ladi (X.2-rasm,3) va gipotonik eritmalar deb ataladi.

Osmos hodisasi hayvon va o'simliklar hayotida muhim rol o'ynaydi. Xujayra qobig'i suvni oson o'tkazib, xujayra suyuqligida erigan moddalarni deyarli butunlay o'tkazmaydigan pardadir. Suv xujayraga o'tgach, unda ancha katta bosim vujudga keladi; bu bosim xujayra qobig'ini bir oz tortib, uni tarang tutib turadi. O'simliklarning yumshoq organlari, masalan, ut poyalari, barglari muayyan elastiklikka ega bo'lishining sababi ham ana shu. Osmos o'simlik poyasida suvning yuqori ko'tarilishini, xujayralarning rivojlanishini ta'minlaydi.

Eritmalarning osmotik bosimi juda katta qiymatga ega bo'ladi.

Masalan, dengiz suvining osmotik bosimi 2837 kPa ga yaqindir. P.Pfeyffer osmotik bosim kontsentratsiya va temperaturaga bog'liq ekanligini qand eritmalarining osmotik bosimlarini o'lchash orqali topdi.

De – Friz o'simliklarni tuzning quyuq eritmasiga tushirdi. Bu vaqtda suvning xujayradan eritmaga o'tishi sababli, xujayra qisqarib o'simlik pardasi burishib qoldi. O'simlik xujayrasi toza suvga tushirilganda, xujayra shishib, o'z hajmini kattalashtirdi. O'simlik pardasining burishib qolishini plazmoliz deb atadi. Toza suvga solingan xolatdagi hujayraning o'z xolatiga qaytish jarayonini deplazmoliz deb ataldi. Bu jarayonda hujayra ichiga suv kirib hujayra ichidagi muxut yana o'z xolatiga qaytadi.

Xulosa. Eritmalar kimyoning o'rganishi kerak bo'lgan muhim bo'limlaridan biri xissoblanadi. Eritmalarning inson hayotida egallagan o'rnini va ro'li eritmalarni yanada chuqurroq o'rganishga majbur etadi. Eritmalar ishlab chiqarish sanoatida, dori-darmon tayyorlashda va boshqa soxalarda keng qo'llaniladi.

Inson organizmidagi deyarli barcha anorganik va organik moddalar eritma xolida uchrashi, organizmda kechadigan moddalar almashinuvi jarayonini yanada to'liq tushunib yetishga eritmalarni o'rganish katta yordam beradi.

3 – laboratoriya mashg'uloti

Oqsil va aminokislotalarning rang hosil qilish reaksiyalari.

1. Biuret reaksiyasi

Ishqoriy muhitda oqsillar va ularning gidroliz mahsulotlari bo'lgan polipeptidlar binafsha yoki qizil – binafsha rang hosil qiladi. Reaksiyaning mohiyati peptid bog'ining miqdoriga bog'liq. Biuret reaksiyasining chiqishi 2 ta peptid guruhining bo'lishiga bog'liq. Rangning intensivligi peptid bog'ining uzunligiga bog'liq bo'lib, ko'k binafsha rangdan to qizil – binafsha rang oralig'ida bo'ladi. Biuret reaksiyasini asparagin (asparagin kislotasining amidi), hamda aminokislotalardan gistidin, treonin va serin ham beradi.

Bu reaksiyakning nomi biuretdan – ya'ni mochevinani qaynatish natijasida hosil bo'ladigan birikmadan kelib chiqqan. Bu reaksiyada ammiak molekulasi ajralishi kuzatiladi.

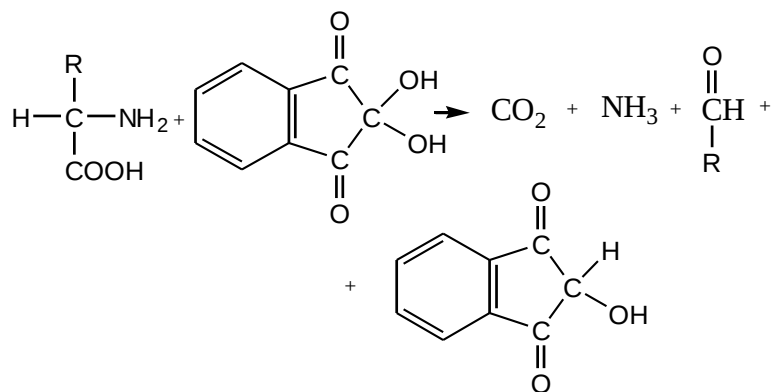
Reaktivlar: a) tuxum oqsili, b) o'yuvchi natriy – 10% li eritmasi, v) 1% li mis sulfat eritmasi.

Ishning bajarilishi: 1 ta probirka olib, unga 2 ml tuxum oqsilidan solinadi, keyin shuncha hajmda o'yuvchi natriydan va 1-2 tomchi mis sulfat eritmasidan solinadi. Bunda ko'k – binafsha yoki qizil – binafsha rang hosil bo'ladi.

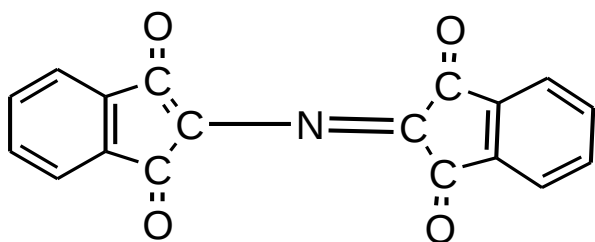
2. Ningidrin reaksiyasi

Ningidrin reaksiyasini – amino guruhga ega bo'lgan aminokislotalar beradi. Oqsillar, polipeptidlar va aminokislotalar ningidrin bilan qaynaganda ko'k yoki ko'k – binafsha rang hosil qiladi. Ningidrin reaksiyasi - aminoguruhni aniqlash uchun eng aniq usul hisoblanadi. Reaksiyaning mohiyati shundan iboratki, aminokislotalar va

peptidlar ningidrin bilan reaksiyaga kirishib, oksidlanishli dezaminlanishga va dekarboksillanishga uchraydi:



Qaytarilgan 2 molekula ningidrin bilan ammiak reaksiyaga kirishib, bo'yalgan birikma hosil qiladi.



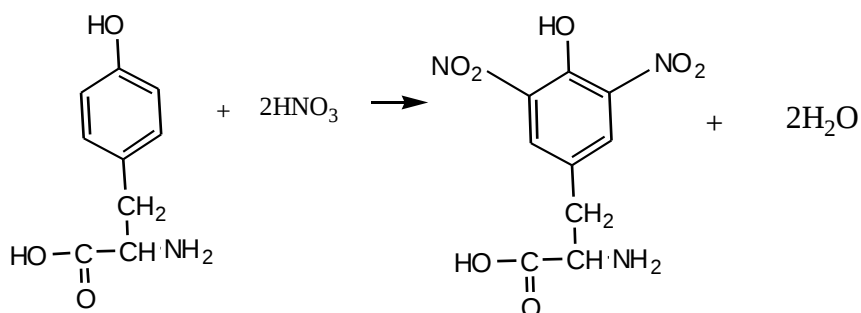
Reaktivlar: a) oqsil eritmasi, b) glitsinning 0,1%-li suvdagi eritmasi, v) ningidrinning 0,1% li spirtidagi eritmasi.

Ishning bajarilishi: 1 probirka olib, unga 1-2 ml glitsin eritmasidan, ikkinchi probirkaga shuncha miqdorda oqsil eritmasidan solinadi. Keyin har ikkala probirkaga ningidrin eritmasidan qo'shiladi (birinchi probirkaga 5-6 tomchi, ikkinchi probirkaga esa 10-12 tomchi) va 1 minut davomida qaynatiladi. Glitsinli probirkada tezda ko'k – binafsha rang hosil bo'ladi, oqsilli probirkada esa rang asta-sekin hosil bo'la boshlaydi va qizil – binafsha rangga bo'yaladi. Ba'zan esa eritmada prolin ko'p miqdorda bo'lganda sariq – binafsha rangga bo'yaladi.

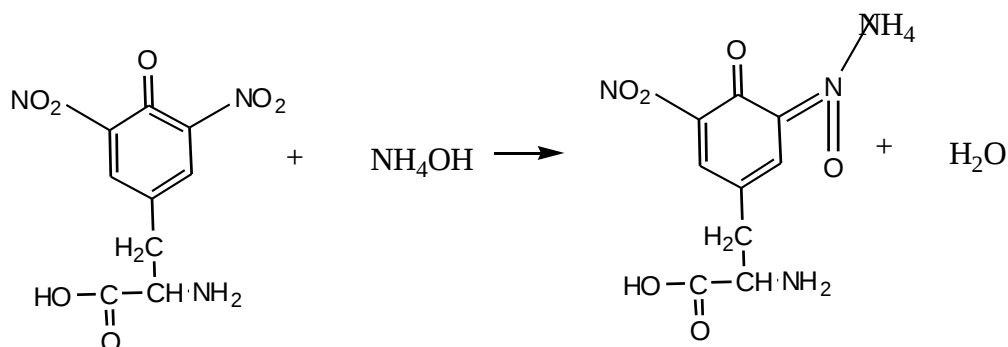
3. Ksantoprotein reaksiyasi

Bu reaksiya bir qancha aromatik aminokislotalar (fenilalanin, tirozin, triptofan) uchun hos hisoblanadi. Oqsillar va polipeptidlar konsentrlangan nitrat kislota bilan qaynatilganda sariq rangli nitrobirikma hosil bo'ladi.

Reaksiya 2 bosqichda o'tadi. Birinchi bo'lib, aminokislota masalan, tirozin konsentrlangan nitrat kislota bilan qo'shilib, nitrolanadi. Bunda sariq rangli dinitrotirozin hosil bo'ladi.



Ikkinchi bosqichda dinitrotirozin o'yuvchi natriy yoki ammoniy tuzlari bilan reaksiyaga kirishib, sariq - qizg'ish rangga bo'yaladi.



Ksantoprotein reaksiyasini oqsillar, peptidlar va siklik aminokislotalardan tashqari ko'pgina aromatik birikmalar (benzol, fenol va boshqalar) ham beradi.

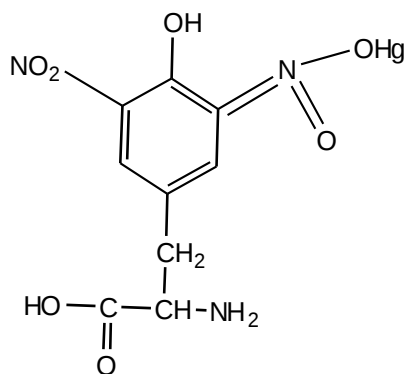
Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) 1% li jelatina eritmasi, v) konsentrlangan nitrat kislota, g) o'yuvchi natriy 20% li yoki konsentrlangan ammiak eritmasi, d) fenol 0,1% li.

Ishning bajarilishi: 2-3 ml fenol eritmasiga sekinlik bilan probirka devori orqali 1-2 ml konsentrlangan nitrat kislota quyiladi. Sekin qaynatiladi, natijada sariq rang hosil bo'ladi. Boshqa probirkaga 1-2 ml tuxum oqslidan solib, 8-10 tomchi konsentrlangan nitrat kislotadan sekinlik bilan qo'shiladi va qaynatiladi. Natijada sariq cho'kma hosil bo'ladi. Probirka sovutilgach, uning devori orqali konsentrlangan ammiak yoki o'yuvchi natriy eritmasidan quyiladi, natijada suyuqlik sariq - qizg'ish rangga bo'yaladi.

Reaksiyani iloji boricha havo tortuvchi qurilma ostida olib borish kerak. O'sha reaksiyani jelatina eritmasi bilan olib borilganda sariq rang hosil bo'lmaydi. Buning sababi jelatina o'zida aromatik aminokislotalarni tutmaydi.

4. Millon reaksiyasi.

Millon reaksiyasi yordamida tirozinni aniqlash mumkin. Tirozin Millon reaktivi bilan qo'shib tirozinning qizil rangli simobli tuzini hosil qiladi. Bu reaksiya hamma fenollar uchun harakterlidir.



Nitrotirozinni simobli tuzi

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, 6) 1% li jelatina eritmasi, v) fenol, 0,1% li eritma, g) Millon reaktivi.

Hamma ish havo tortuvchi qurilma ostida olib borilishi kerak.

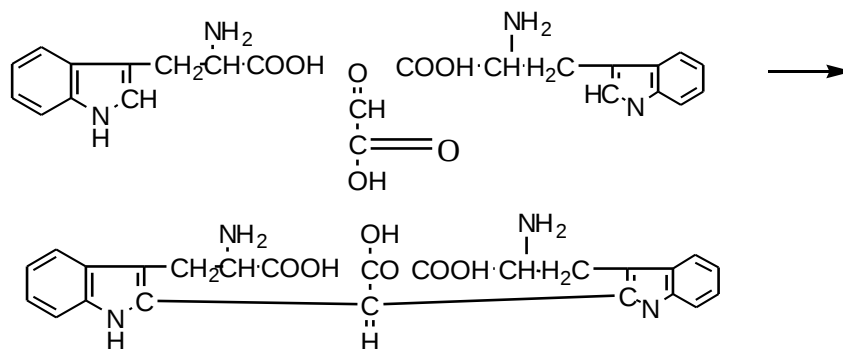
Ishning bajarilishi: 1 ml fenol eritmasiga 0,5 ml Millon reaktividan quyiladi va sekinlik bilan qaynatiladi. Bunda pushti rang hosil bo'ladi.

Probirkaga 1-2 ml tuxum oqsili eritmasidan solib, ustiga 5-6 tomchi Millon reaktividan solinadi va sekinlik bilan qizdiriladi. Suyuqlik qizil rangga bo'yaladi va qizg'ish - g'isht rangli cho'kma tushadi.

Shu reaksiya jelatina bilan ham qilib ko'riladi, lekin bunda qizil rang hosil bo'lmaydi.

5. Triptofanga xos reaksiya.

Triptofan kislotali muhitda aldegidlar bilan reaksiyaga kirishib, kondensatsiyaga uchragan, rangli mahsulotni hosil qiladi. Masalan, gliksil kislota bilan (konsentrlangan sirka kislota bilan aralashmada uchraydi) quyidagicha reaksiya ketadi.



Shu sxema asosida triptofanning oksimetilfurfurol yoki formaldegid bilan beradigan reaksiyasini kuzatish mumkin.

Adamkevich reaksiyasi

Reaktivlar: a) yangi tuxum oqsili eritmasi, b) jelatina 1% li eritma, v) konsentrlangan sirka kislota, g) konsentrlangan sulfat kislota.

Ishning bajarilishi: Probirkaga bir necha tomchi tuxum oqsili eritmasidan solinadi, ustiga 1-2 tomchi konsentrlangan sirka kislotasidan qo'shiladi va sekinlik bilan tushgan cho'kma eriguncha isitiladi. Shundan so'ng sovutiladi va ehtiyotkorlik bilan probirka devori bo'ylab, bir tomonga qiyshaytirilgan holda 1 ml konsentrlangan

sulfat kislota quyiladi. Bunda eritmalar bir – biriga aralashib ketmasligi kerak. Ikkita qatlam chegarasida bir necha daqiqadan keyin qizil – binafsha halqa hosil bo'ladi.

Bu reaksiyani jelatina bilan ham qilib ko'rish kerak, lekin reaksiya chiqmaydi. Buning sababi, jelatinaning tarkibida triptofan uchramaydi.

6. Oltingugurt tutuvchi aminokislotalarga xos reaksiya

Bizga ma'lumki, oltingugurt tutuvchi aminokislotalar 3 ta: sistein, sistin, metionin. Sistein va sistin molekulasida oltingugurt kuchsiz bog'langan bo'lib, ishqoriy muhitda gidroliz qilinganda vodorod sulfid shaklida oson ajralib, ishqor bilan natriy yoki kaliy sulfidni hosil qiladi. Sulfidlar qo'rg'oshin astetat bilan qo'shilib, qora rangli cho'kmani hosil qiladi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) jelatina 1% li eritma, v) 15 - 20% li natriy ishqori, g) 1% li qo'rg'oshin astetat.

Ishning bajarilishi: Bitta probirka olib, unga 2 ml tuxum oqsili eritmasidan solinadi. Ikkinchi probirkaga esa shuncha miqdorda jelatina solinadi. Ikkala probirkaga 1-1,5 ml ishqor eritmasidan solinib, sekinlik bilan qaynaguncha qizdiriladi va 1-2 daqiqa qaynatiladi. Shundan so'ng har ikkala probirkaga 2-3 tomchi qo'rg'oshin atsetatdan qo'shiladi.

Oqsil solingan probirkada qora rang hosil bo'ladi. Bu rangning rang darajasi oqsilning konsentratsiyasiga va undagi sistein va sistinning miqdoriga bog'liq. Jelatina solingan probirkada rang hosil bo'lmaydi. Bu holat jelatina tarkibida oltingugurt tutuvchi aminokislota uchramasligidan darak beradi.

4 – laboratoriya mashg'uloti

Oqsillarni cho'ktirish reaksiyalari

Ko'pgina omillar oqsil moddalarning fiziko-kimyoviy hossalarga ta'sir etib, uning makromolekulasi tuzilishida o'zgarishlarga olib keladi. Bu jarayon denaturatsiya nomi bilan ma'lum. Denaturatsiya natijasida oqsil makromolekulasining aktiv konformatsiyasi buziladi. Bu o'zgarish birinchi navbatda ikkilamchi va uchlamchi strukturalarga tegishli bo'lib, bunda kovalent bog'lar buzilmaydi.

Denaturatsiyani yuzaga chiqaruvchi omillarni 2 ga: fizik va kimyoviy omillarga bo'lish mumkin.

Fizik omillarga yuqori harorat, mexanik ta'sir, ultratovush bilan ta'sir etish, ionlashtiruvchi nurlanishlar kiradi. Kimyoviy omillarga og'ir metall ionlari, mineral va organik kislotalar, neytral ammoniy tuzlari, ishqoriy va ishqoriy yer metallari, organik erituvchilar va alkaloidlar bilan cho'ktirishlar kiradi. Mochevina, detergentlar va bir qancha bo'yovchi moddalar ham shunday natijani beradi.

Bir qancha fizik omillarning ta'sir qilish mexanizmi kimyoviy o'zgarishlarga ham sabab bo'ladi. Masalan, ultratovush to'lqini va ionlashtiruvchi nurlanish oqsil makromolekulasining kimyoviy o'zgarishiga sabab bo'ladi.

Oqsillarni cho'ktirish reaksiyasi qaytar va qaytmas bo'ladi. Qaytar cho'kishda oqsilning makromolekulasi chuqur denaturatsiyaga uchramaydi, cho'kma

boshlang'ich erituvchida (masalan, suvda) erishi mumkin. Qaytar cho'kish neytral ammoniy tuzlari, ishqoriy va ishqoriy yer metallar, spirt, atseton, efir va boshqa organik erituvchilar bilan cho'ktirilganda amalga oshadi.

Qaytmas cho'kishda oqsilning kuchli denaturatsiyasi kuzatiladi. Bunda oqsil gidrofil hususiyatini yo'qotib, gidrofob bo'lib qoladi. Denaturatsiyaga uchragan oqsil o'zining boshlang'ich fizik – kimyoviy va biologik hossalari qayta tiklay olmaydi. Qaytmas cho'kish yuqori harorat, konsentrlangan mineral kislotalar, og'ir metall ionlari, alkaloidlar, detergentlar, bo'yovchi moddalar ta'sirida amalga oshadi.

1. Oqsillarni ishqoriy va ishqoriy yer metall tuzlari bilan cho'ktirish.

Neytral ammoniy tuzlari, ishqoriy va ishqoriy yer metall tuzlari – Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , MgSO_4 va boshqalar oqsil zarrachalarining zaryadlarini neytrallaydi va ularning degidrotatsiyasiga (suvsizlanishiga) sabab bo'ladi, natijada cho'kma tushadi. Oqsillarning bu cho'ktirish uslubi tuzlash deb ham ataladi. Tuzlash jarayoni qaytar hisoblanadi. Cho'kmani suvda qayta eritish mumkin, bunda oqsilning hossalari ma'lum darajada tiklanishi kuzatiladi (masalan, fermentlarning aktivligi, antigenlik hossasi). Tuzlash oqsillarni fraksiyalarga ajratishda, oqsillarni tozalash va ularni kristall shaklida ajratib olish uchun qo'llaniladi.

Ammoniy sulfat bilan cho'ktirish

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) Natriy xlor tuzi (kristall holda), v) ammoniy sulfat tuzi (kristall holda) g) ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi, d) magniy sulfat tuzi (kristall holda) e) 1% li sirka kislota. j) 10% li natriy ishqori, z) 1% mis sulfat.

Ishning bajarilishi: Probirkaga 2-3 ml oqsil eritmasidan quyiladi va ustiga ammoniy sulfatning to'yingan eritmasidan shuncha hajmda solinadi va aralashtiriladi. Bunda dastlab globulinlar cho'kmaga tushadi, albuminlar eritmada qoladi. Shundan so'ng cho'kma filtr qog'ozi orqali filtrlanadi. Filtratga ammoniy sulfatning kristallaridan to'yingan eritma holiga kelguncha solinadi (bunda oxirgi solingan tuz erimasligi kerak). Bunda albuminlar cho'kmaga tushadi. Shundan so'ng cho'kma filtrlab ajratib olinadi.

Filtrat bilan biuret reaksiyasi qilib ko'riladi. Agar oqsil oxirigacha cho'kkan bo'lsa, bu reaksiya chiqmasligi kerak.

Magniy sulfat yoki natriy xlorid bilan cho'ktirish

Ishning bajarilishi: Ikkita probirkaga 2-3 ml dan tuxum oqsili eritmasidan quyiladi va birinchi probirkaga natriy xlor, ikkinchisiga esa magniy sulfat tuzlarining kristallaridan to'yingan eritma hosil bo'lguncha solinadi. 5-6 daqiqa o'tgach, cho'kma tusha boshlaydi. Bunda globulinlar cho'kmaga tushadi. Albuminlar ishqoriy va ishqoriy yer metall tuzlari ta'sirida cho'kmaydi. Cho'kma tushib bo'lgandan keyin probirkalardagi cho'kmalar filtrlab ajratib olinadi. Bunda albuminlar filtratda qoladi. Filtratga 1% li sirka kislota tomiziladi. Bunda albuminlar cho'kmaga tusha boshlaydi. Shundan so'ng yana cho'kma filtrlab ajratib olinadi va filtrat bilan biuret reaksiyasi qilib ko'riladi. Shundan so'ng eritmada oqsil qolmaganligi isbot qilinadi. Oqsillarni tuzlash yo'li bilan cho'ktirish sanoatda keng qo'llaniladi.

2. Oqsillarni organik erituvchilar ta'sirida cho'ktirish

Organik erituvchilar (spirt, atseton va boshqalar) oqsil makromolekulasining degidratatsiyasiga sababchi bo'ladi. Ular suvli qobig'ini buzib, oqsilning eritmadagi eruvchanligini pasaytiradi va bu cho'kma tushishiga olib keladi. Organik erituvchilar yordamida oqsillarning cho'kishi neytral yoki kuchsiz kislotali muhitda yaxshi amalga oshadi. Ishqoriy muhitda esa cho'kish yuzaga chiqmaydi. Har xil elektrolitlarning eritmada bo'lishligi ham cho'kish jarayonini amalga oshiruvchi omil hisoblanadi (masalan, natriy xloridning bo'lishligi shunga olib keladi). Oqsillarni spirt bilan cho'kishi qaytar jarayon hisoblanadi. Bunda eritma qizdirilmasa va reagentning ta'sir qilishi qisqa vaqt ichida o'tsa, shunday bo'ladi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi. b) etil spirti (yoki asteton), v) natriy xlorid (kristall holda).

Ishning bajarilishi: Probirkaga 1-2 ml oqsil eritmasidan quyiladi, ustiga natriy xlor kristalidan oz miqdorda solinadi va eriguncha chayqatiladi. Shundan keyin tomchilatib, 4-6 ml etil spirti solinadi va qattiq chayqatiladi. Oradan 5-8 minut o'tgach, oqsil cho'kmaga tushadi.

Cho'kma hosil bo'lgandan keyin tezlik bilan uni boshqa probirkaga ajratib olinadi va ustiga bir necha ml distillangan suvdan quyiladi. Bunda spirtning konsentratsiyasi kamayib ketib, oqsil darhol erib ketadi.

3. Oqsilning issiqlik ta'siridagi denaturatsiyasi

Ko'pgina oqsillar 50-65°C temperaturada buzila boshlaydi. Yuqori temperatura oqsilning denaturatsiyasiga olib keladi, buning natijasida makromolekula qaytmas fizik-kimyoviy va biologik xossalarning o'zgarishiga uchraydi. Qaynatish natijasida polipeptid zanjiridagi disulfid bog'lari buziladi va makromolekulaning konformatsiyasini buzilishiga olib keladi. Qisqa vaqt qizdirish (nisbatan past temperaturada) natijasida denaturatsiya amalga oshmasligi mumkin. Lekin, keyingi qizdirishlar oqsil molekulasi buzilishiga olib keladi.

Issiqlik ta'siridagi denaturatsiya tezligiga va jarayonning intensiv borishiga muhitning pH va elektrolitlarning qo'shilishi sezilarli ta'sir qiladi. Oqsillar izoelektrik nuqtada cho'kmaga yaxshi tushadi.

Muhitning pHni kislotali yoki ishqoriy tomonga o'tib qolishi natijasida oqsillarning cho'kishi to'xtab qoladi. Kuchli kislotali va kuchli ishqoriy muhitda oqsillar qaynatilganda cho'kmaga tushmaydi. Kislotali muhitda oqsil molekulasini musbat zaryadlanadi, kuchli ishqoriy muhitda esa manfiy zaryadga ega bo'ladi. Elektrolitlarning qo'shilishi (masalan, natriy xlorid) natijasida xatto kislotali muhitda ham oqsillarning koagulyatsiyalanish jarayoni tezlashadi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) 1% li sirka kislota, v) 10% li sirka kislota, g) 10% li o'yuvchi natriy, d) natriy xloridning to'yingan eritmasi.

Ishning bajarilishi: 5 ta probirka olib, ularning har biriga 1 mldan oqsil eritmasidan solinadi. Birinchi probirkadagi oqsilni qaynaguncha qizdiriladi. Eritma loyqalanadi (oqsil atrofidagi gidrat qobig'i buziladi), lekin cho'kma tushmaydi. Bu yerda bir xil zaryadli muhit bo'lgani uchun oqsilning koagulyatsiyasi amalga oshmaydi.

Ikkinchi probirkadagi oksil eritmasiga avval 1 tomchi 1% li sirka kislotasidan tomiziladi va keyin qaynatiladi, bunda oqsil tezda cho'kmaga tushadi, buning sababi shuki, oqsil molekulasidagi zaryadlar neytrallanib, oqsil o'zining izoelektrik nuqtasiga yaqinlashib qoladi.

Uchinchi probirkadagi oqsil eritmasiga 5 tomchi 10% li sirka kislotasidan qo'shiladi va qaynaguncha qizdiriladi. Bunda cho'kma tushmaydi, sababi oqsil molekulasi musbat zaryadlanib qoladi va koagulyatsiyaga yo'l qo'ymaydi.

To'rtinchi probirkadagi oqsil eritmasining ustiga 5 tomchi 10% li natriy ishqoridan qo'shiladi va qaynaguncha qizdiriladi, bunda ham cho'kma tushmaydi, sababi oqsil molekulasi manfiy zaryadlanib qolgan bo'ladi.

Beshinchi probirkadagi oqsil eritmasining ustiga 5 tomchi 10% li sirka kislotasidan solib, yana ustiga 5 tomchi natriy xlorining to'yingan eritmasidan solinadi va qaynaguncha qizdiriladi, natijada oqsil cho'kmaga tushadi.

4. Oqsilni mineral kislotalar bilan cho'ktirish

Konsentrlangan mineral kislotalar (nitrat, sulfat, xlorid) oqsil zarrachalarining keskin degidrotatsiyasiga va ularning zaryadlarini neytrallanishiga sabab bo'ladi, buning natijasida kompleks birikmalar hosil bo'lishi kuzatiladi.

Bu esa oqsilning qaytmas denaturatsiyasiga olib keladi. Ortofosfat kislota oqsillar bilan cho'kma hosil qilmaydi.

Mineral kislotalar ta'sirida hosil bo'lgan cho'kmalarga sulfat kislota va xlorid kislotalarning yana ko'p miqdorda quyilishi natijasida cho'kma erib ketadi, lekin bu nitrat kislota bilan kuzatilmaydi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) konsentrlangan sulfat kislota, v) konsentrlangan xlorid kislota, g) konsentrlangan nitrat kislota.

Ishning bajarilishi: 3 ta probirka olib, 1- probirkaga 1 ml sulfat kislota, 2 - probirkaga 1 ml nitrat kislota, 3 - probirkaga esa 1 ml xlorid kislotadan quyiladi. Probirkalarni 45° ostida qiyshaytirib, probirka devori bo'ylab oqsil eritmasidan solinadi. Kislota va oqsil chegarasida oq halqa hosil bo'ladi. Probirkalar sekinlik bilan chayqatiladi va 1-probirkaga qo'shimcha sulfat kislota, 2-probirkaga nitrat kislota, 3-probirkaga esa xlorid kislota qo'shiladi. Oqsil cho'kmasi sulfat va xlorid kislotada qayta erib ketadi, nitrat kislotada erimaydi. Bu reaksiya oqsilni tezlik bilan aniqlashda qo'llaniladi. Masalan, siydikdagi oqsilni bilish uchun shu reaksiya qo'llaniladi.

5. Oqsilni organik kislotalar bilan cho'ktirish

Organik kislotalar ta'sirida oqsillar qaytmas cho'kadi. Har xil kislotalar turlicha ta'sir ko'rsatadi. Sulfosalitsil va uchxlorsirka kislotalar esa boshqalariga nisbatan samarali ta'sir qiladi.

Uchxlorsirka kislota ta'sirida faqat oqsillar cho'kmaga tushadi. Sulfosalitsil kislota esa oqsildan tashqari uning parchalanish mahsulotlari bo'lgan peptonlarni va polipeptidlarni ham cho'ktiradi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) 10% li sulfosalitsil kislota, v) 10% li uchxlorsirka kislota.

Ishning bajarilishi: 2 ta probirka olib, ularga 2 ml dan oqsil eritmasidan quyiladi. 1 - probirkaga 5 tomchi uchxlorsirka kislotadan, 2 - probirkaga esa shuncha miqdorda sulfosalitsil kislotadan solinadi. Ikkala probirkadagi oqsil cho'kmaga tushadi.

6. Oqsilni og'ir metall tuzlari bilan cho'ktirish

Oqsillar mis, qo'rg'oshin, simob, rux, kumush va boshqa og'ir metall tuzlari bilan cho'kmaga tushadi. Og'ir metall ionlari bilan oqsillarni cho'ktirilishi murakkab jarayon hisoblanadi. Bunda avval suvda erimaydigan kompleks birikma hosil bo'ladi. Bu hosil bo'lgan birikma og'ir metall tuzlarining qo'shimcha miqdorida erib ketadi (AgNO_3 va HgCl_2 dan tashqari).

Og'ir metall tuzlari oqsil mitsellisiga adsorbsiyalanib, elektr zaryadini o'zgartiradi (neytral holga kelguncha). Og'ir metall tuzlari beradigan denaturatsiya oqsilning 2-lamchi va 3-lamchi strukturalarida chuqur buzilishga olib keladi. Peptid bog'larining o'zgarishiga asosan ular orasidagi bog'larning buzilishi sabab bo'ladi (asosan, disulfid bog'lari). Disulfid bog'ining vazifasi asosan oqsilning 2-lamchi va 3-lamchi strukturasini ushlab turish hisoblanadi. Shuning uchun bu bog'ning buzilishi oqsil strukturasining buzilishiga ya'ni oqsilning qaytmas denaturatsiyasiga sababchi bo'ladi.

Og'ir metall tuzlarining qo'shimcha miqdorda solinganda cho'kmaning erib ketishiga sabab shuki, bunda og'ir metall ionlari oqsil mitsellisiga adsorbsiyalanib, ularni musbat zaryadlab qo'yadi, natijada bir xil zaryadlangan mitsellidan zaryadlar itariladi. Bu esa cho'kmaning erib ketishiga olib keladi.

Reaktivlar: a) tuxum oqsili eritmasi, b) 5% li qo'rg'oshin atsetat, v) 2,5% li kumush nitrat, g) 5% li temir xlorid, d) 5% li mis sulfat.

Ishning bajarilishi: 4 ta probirka olib, ularga 1 ml dan tuxum oqsili eritmasidan solinadi va tomchilatib og'ir metall tuzlarining eritmasidan solinadi: 1-probirkaga qo'rg'oshin atsetat, 2-probirkaga mis sulfat, 3-probirkaga temir xlorid, to'rtinchi probirkaga kumush nitrat eritmalaridan cho'kma tushguncha solinadi. Keyin har bir probirkaga kerakli tuz eritmalaridan qo'shimcha solinadi, natijada uchchala probirkadagi cho'kmalar erib ketadi. To'rtinchi probirkadagi kumush nitrat solingan cho'kma erimaydi.

5 – laboratoriya mashg'uloti

Mavzu: Oqsillarni dializ qilish va izoelektrik nuqtasini aniqlash

Dializ

Dializ yordamida oqsilning makromolekulyar eritmasi quyi molekulali birikmalardan (tuzlardan, qandlardan) tozalanadi. Shu sababli dializ oqsillarni tozalash bosqichlaridan biri hisoblanadi.

Reaktivlar: a) osh tuzi qo'shilgan tuxum oqsili eritmasi, b) 0,5% li kumush nitrat, v) 10% li nitrat kislota, g) 10% li o'yuvchi natriy, d) 1% li mis sulfat.

Ishning bajarilishi: Sellofan yoki kollodiydan yasalgan haltachaga yarim qilib, natriy xlorli tuxum oqsili eritmasidan solinadi. Haltachani shisha tayoqchaga

osib, distillangan suvli stakanga solinadi. Dializ, hona temperaturasi sharoitida olib boriladi. Oradan 40-60 minut o'tgach, stakandagi suvdan 2 ml dan olib, 2 ta probirkaga solinadi.

Birinci probirkada xlor ionlarini tekshirish uchun reaksiya qilib ko'riladi. Buning uchun suvga bir necha tomchi 10% li nitrat kislotadan qo'shiladi va uning ustiga 2-3 tomchi kumush nitrat eritmasidan solinadi. Natijada kumush xloridning oq cho'kmasi hosil bo'ladi.

Ikkinchi probirkada biuret reaksiyasi qilib ko'riladi. Agar dializ to'g'ri olib borilgan bo'lsa, biuret reaksiyasi chiqmasligi kerak.

Har 16-20 daqiqada suvni almashtirish bilan dializni tezlashtirish mumkin. Dializ xlor ionlarini tekshirish uchun qilinadigan reaksiya chiqmaguncha olib boriladi.

Izoelektrik nuqtani aniqlash

Izoelektrik nuqtada oqsillar beqaror bo'ladi. Oqsil molekulasining musbat va manfiy zaryadlari teng bo'lgan pH ko'rsatkichida u osongina cho'kmaga tushadi. Bunga sabab oqsil molekulalari bilan suv dipollari orasidagi bog'lanishni uzilishidir. Har bir oqsil uchun ma'lum pH ko'rsatgichi izoelektrik nuqtani belgilaydi. Masalan, kazein uchun pH 4,7 ga, tuxum albumini uchun 4,8 ga, jelatina uchun 4,9 ga, zein uchun 6,2 ga teng. Protaminlar va gistonlarning izoelektrik nuqtasi kuchsiz ishqoriy muhitga to'g'ri keladi.

Oqsillarni izoelektrik nuqtada cho'kmaga tushishini suv tortib oluvchi moddalar (spirt, atseton, efir) yoki tanin qo'shish bilan tezlashtirish mumkin. Organik erituvchilar oqsil molekulasidan suvni tortib oladi va oqsil tezda suv qobig'ini yo'qotib, cho'kmaga tushadi. Tanin esa azot tutuvchi geterosiklik gruppalar bilan qo'shilishib, suvda erimaydigan birikma hosil qiladi.

Reaktivlar: a) 0,5% li jelatina, b) 0,1 N li sirka kislotasi, v) 0,1 N li natriy astetat, g) 96% li etil spirti, d) 0,1% li tanin.

Ishning bajarilishi: 5 ta probirka olib, ularning har biriga sirka kislotadan va natriy atsetat eritmasidan quyidagi jadvalda ko'rsatilgandek qilib solinadi. Shundan so'ng har bir probirkaga 1 ml dan jelatina eritmasidan solinadi va yaxshilab chayqatiladi.

Jadval

Probirka larning №	Bufer eritmaning tarkibi, 0,1 N		eritma pH	0,5% li jelatina	etil spirt, ml	Loyqala nish darajasi
	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	1
2	1,4	0,6	4,4	1	4	3
3	1,0	1,0	4,7	1	4	5
4	0,6	1,4	5,1	1	4	4
5	0,2	0,8	5,7	1	4	3

Oradan 5-10 daqiqa o'tgach hamma probirkalar tekshirib, ularning loyqalanish darajasi ko'riladi. Qaysi probirkadagi loyqalanish eng yuqori bo'lsa, jadvalga qarab shu probirkadagi suyuqlikning pH darajasi topiladi va shunga qarab tekshirilayotgan oqsilning izoelektrik nuqtasi aniqlanadi.

6 – laboratoriya mashg'uloti

Oqsil miqdorini Biuret usuli bo'yicha aniqlash

Uslubning mohiyati: Ishqoriy muhitda mis ionlari oqsil molekulasining peptid bog'lari bilan reaksiyaga kirishib, ko'k – binafsha rang beruvchi kompleks hosil qiladi. Rangning intensivligi oqsil miqdoriga to'g'ri proporsional bo'ladi.

Ishning bajarilishi: Eritma tayyorlash.

1. Oqsil (albumin, pepsin, kazein) ning 1% li NaCl dagi standart eritmasi 10 mg/ml.

2. Biuret eritmasi: 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ va 0,6 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (segnet tuzi) 50 ml 1% li NaOH qo'shib distillangan suv bilan 100 mlga keltiriladi. Eritma polietilen idishda saqlanadi.

3. 1% li NaCl.

Kalibrlash egri chizig'ini tuzish. Buning uchun 10 ta probirkaga standart eritmadan 1 mg dan 10 mg gacha miqdorida qilib solinadi. Hamma probirkadagi eritma 1% li NaCl bilan 1 ml gacha keltirilib, unga 8 mldan Biuret eritmasi qo'shiladi. Nazorat sifatida oqsil eritmasi o'rniga 1ml 1% li NaCl olinadi, aralashmalar chayqatib xona haroratida o'lchanadi. Olingan natijalar asosida grafik tuziladi. Bunda ordinata o'qiga 540 nm dagi SF ko'rsatkichi, abtsissa o'qiga esa oqsilning mg/ml miqdori qo'yiladi.

Oqsil miqdorini aniqlash. Tekshirilayotgan eritmada oqsilning miqdorini aniqlash uchun 1 ml oqsil eritmasiga 8 ml biuret reaktivi qo'shiladi va 30 daqiqa xona haroratida saqlangach optik zichligi aniqlanadi. Oqsil miqdori kalibrlash egri chizig'iga ko'ra topiladi.

Uslubning kamchiligi unchalik sezgir va aniq emasligi bo'lib, shunga qaramay etirmada oqsil miqdori ko'p bo'lganda foydalanish mumkin.

7 – laboratoriya mashg'uloti

Fermentlarning yuqori temperatura ta'sirida inaktivatsiyasi

Fermentlar oqsil tabiatli moddalar bo'lganligi sababli, ular haroratga juda ta'sirchan bo'ladi. Fermentlar uchun optimal harorat 37-38°C ni tashkil qiladi. Haroratning oz miqdorda ko'tarilishi, (40-45°C gacha) fermentlarning aktivligini oshiradi. Lekin keyingi qizdirish, ya'ni 50°C dan yuqori bo'lgan harorat, fermentning aktivligini yo'qolishiga sabab bo'ladi. Buning sababi, fermentning oqsil qismi yuqori haroratda denaturatsiyaga uchrashidir. Past haroratda esa ferment o'z aktivligini yo'qotmaydi, lekin shu haroratda aktivligi kamayishi mumkin. Agar harorat ferment uchun optimal holgacha ko'tarilsa, fermentning aktivligi yana tiklanadi.

Reaktivlar: a) 5 marta suyultirilgan so'lak, b) 1% li kraxmal, v) yodning kaliy yodiddagi eritmasi (Lyugol eritmasi), g) Trommer reaksiyasi uchun kerak bo'lgan reaktivlar: 5% li o'yuvchi natriy, 5% li mis sulfat (tajriba probirkalariga avval o'yuvchi natriy qo'shiladi, so'ngra tomchilatib mis sulfatdan solinadi va past olovda qaynaguncha qizdiriladi).

Ishning bajarilishi: 2 ta probirkaga 1 ml dan suyultirilgan so'lak solinadi. Ulardan bittasi past olovda 2-3 daqiqa davomida qaynatib olinadi. Shundan so'ng har ikkala probirkaga 1 ml dan kraxmal eritmasidan solib, 10 daqiqa 38°C li termostatga qo'yiladi. Keyin har ikkala probirkadagi suyuqlik ikkiga bo'linib, Trommer va Lyugol reaksiyalari o'tkaziladi. Shuni aytish kerakki, qaynatilgan so'lakli probirkada kraxmalning fermentativ gidrolizi bo'lmaydi.

8 – laboratoriya mashg'uloti

Fermentlarning spetsifikligi

Fermentlarning spetsifik ta'sir qilishi eng muhim xossalardan biridir. Har bir ferment ma'lum bir moddaga yoki tuzilishi jihatdan o'xshash bo'lgan moddalar guruhiga ta'sir qiladi.

Quyidagi spetsifiklik turlari farqlanadi:

a) absolyut spetsifiklik, bunda ferment faqatgina bitta moddani o'zgarish reaksiyasini katalizlaydi. Masalan, ureaza (karbamidamidogidrolaza) mochevinani ammiak va uglerod (II) -oksidigacha gidrolitik parchalanishini katalizlaydi.

b) gruppali spetsifiklik, bunda ferment tuzilishi jihatdan o'xshash bo'lgan moddalarning o'zgarish reaksiyalarini katalizlaydi. Masalan, saxaraza (β -fruktofuranozidaza) saxarozani gidrolitik parchalab, bunda glyukoza va fruktoza hosil bo'ladi, lekin shu ferment trisaxarid rafinozaning (α -galaktozido- α -glyukozido- β -fruktozid) gidrolitik parchalanishini katalizlaydi va bunda faqatgina fruktoza molekulasi ajralib chiqadi, galaktoza bilan glyukoza orasidagi bog' esa buzilmay qoladi.

v) nisbiy spetsifiklikka ega bo'lgan fermentlar ma'lum kimyoviy bog' hosil bo'lishi yoki parchalanish reaksiyasini katalizlaydi. Masalan, lipaza fermenti glitserin turli hildagi yog' kislotalar bilan hosil qilgan murakkab efir bog'larini suv ishtirokida uzadi, ya'ni ferment murakkab efir bog'lariga nisbatan spetsifiklikka ega.

g) stereokimyoviy spetsifiklik, bunda ferment moddaning faqatgina bitta stereoizomerining sintezlanishini yoki parchalanishini katalizlaydi. L-sut kislotasining pirouzum kislotasigacha oksidlanishi laktatdegidrogenaza fermenti orqali amalga oshiriladi, lekin o'sha jarayon D-sut kislotasida boshqa ferment d-laktatdegidrogenaza fermenti orqali amalga oshiriladi.

Reaktivlar: a) so'lak (10 marta suyultirilgan), b) 1% li saxaroza, v) 1% li kraxmal, g) Trommer reaksiyasi uchun kerakli reaktivlar.

Ishning bajarilishi: 2 ta probirka olib, ularning har biriga 1 ml dan suyultirilgan so'lak solinadi. Ulardan biriga 1 ml saxaroza, ikkinchisiga 1 ml kraxmal solib, 10 daqiqa termostatga (38°C ga) qo'yiladi. Bundan keyin sovutiladi va har bir

probirkada Trommer reaksiyasi qilib ko'riladi. Reaksiya natijasi shuni ko'rsatadiki, amilaza faqatgina kraxmalni katalizlaydi, saxarozaga ta'sir etmaydi.

9 – laboratoriya mashg'uloti

So'lakdagi amilaza fermentining aktivligiga pH ning ta'siri.

Har bir ferment ma'lum pH muhitida optimal aktivlikka ega bo'ladi. Masalan, pepsin uchun pH 1,5-2,0 ga teng, so'lak amilazasi uchun 6,8 -7,0; tripsin uchun 7,8; oshqozon osti bezining lipazasi uchun 7,0-7,8 ga teng bo'ladi.

Tajribalar shuni ko'rsatadiki, har xil substratdan ajratib olingan va bir xil reaksiyani katalizlaydigan fermentlar o'zining optimal aktivligini pH ning har xil ko'rsatkichlarida namoyon qiladi. Masalan, shakarqamishda uchraydigan saxarazaning optimal ta'sir qilish pH ko'rsatkichi 6,2 ga teng, achitqilardan ajratib olingan saxarazaning optimal pH 4,6-6,0 ga teng. So'lak amilazasining optimal pH 6,8-7,0 ga teng bo'lsa, unayotgan bug'doy amilazasining pH 4,4 - 4,5 ga teng bo'ladi.

Reaktivlar: a) so'lak (100 marta suyultirilgan), b) 0,5% li kraxmal, v) 1% li natriy xlorid, g) 0,1 M li limon kislota, d) 0.2 M li natriy fosfat, e) Lyugol eritmasi.

Ishning bajarilishi: 7 ta probirka olib, ularning har biriga limon kislota va natriy fosfatning eritmasidan jadvalda ko'rsatilgandek qilib solinadi. Bunda har bir probirkadagi eritma 5,6 dan 8,0 gacha pH ga ega bo'ladi. Shundan so'ng har bir probirkaga 10 tomchidan 1% li natriy xlorid, 0,5% li kraxmal va 100 marta suyultirilgan so'lak solinadi va aralashtiriladi. Probirkalar 10 daqiqa 38°C li termostatga qo'yiladi. Vaqt o'tgach probirkalarni termostatdan olib tezda sovitiladi va har biriga 1 tomchidan Lyugol eritmasidan solinadi va hosil bo'lgan rang kuzatiladi. Shundan so'ng qaysi probirkada kraxmal to'liq parchalanganligini pH ga qarab aniqlash kerak (yod bilan sariq yoki qo'ngir sariq rang hosil bo'lishi kerak).

Jadval

Probirkalar nomeri	Natriy fosfat, ml	Limon kislota, ml	Bufer aralashmasining pH
1	0,58	0,42	5,6
2	0,63	0,37	6,0
3	0,69	0,31	6,4
4	0,77	0,23	6,8
5	0,87	0,13	7,2
6	0,94	0,06	7,6
7	0,97	0,03	8,0

10 – laboratoriya mashg`uloti

Monosaxaridlarga xos sifat reaksiyalari

α - naftol yoki timol bilan boradigan reaksiya

Bu reaksiya uglevodlarga xos eng sezgir reaksiya hisoblanadi. Uglevodlar sulfat kislota bilan reaksiyaga kirishib, furfurool va 5-oksimetilfurfurool hosil qiladi va bu hosil bulgan birikma α -naftol yoki timol bilan qo'shiladi, bunda triarilmetan xromogeni va oxirida asa sulfat kislota bilan oksidlangan, bo'yalgan xinoid birikmasi hosil bo'ladi.

Reaktivlar: a) 0,5% li glyukoza, b) 1% li timol, v) α -naftolning 0,2% li spirtidagi eritmasi, g) konsentrlangan sulfat kislota

Ishning bajarilishi: 2 ta probirka olib, ularning har biriga 2 ml dan glyukoza eritmasidan solinadi va 1-probirkaga 3-4 tomchi timoldan, ikkinchisiga esa shuncha miqdorda α -naftoldan solib, yaxshilab chayqatiladi. Shundan so'ng, har ikkala probirkaga konsentrlangan sulfat kislotadan 1-2 ml probirka devori orqali quyiladi. Birinchi probirkadagi suyuqlik qizil rangga, 2-probirkadagi suyuqlik esa binafsha-qizil rangga kiradi. Bu rang ikki qatlam chegarasida yaqqol namoyon bqladi.

Antron bilan boradigan reaksiya

Reaksiya davomida sulfat kislota uglevodlar bilan birikib, furfurool, metilfurfurool yoki oksimetilfurfurool hosil qiladi. Bu birikmalar antron bilan kodensatlanib, yashil, havorang yoki ko'k rang beradi.

Reaktivlar: a) 0,5% li glyukoza, b) 0,5% li fruktoza, v) Antron reaktivi.

Ishning bajarilishi: Probirkaga glyukoza eritmasidan 4-5 tomchi solinadi va unga 2 ml antron reaktividan qo'shiladi. Probirka yaxshilab chayqatiladi va 30 daqiqa xona haroratida qoldiriladi. Shundan so'ng kondensatsiyaning mahsuloti bo'lgan yashil yoki havorang birikma hosil bo'ladi.

Fruktozaga xos bo'lgan Selivanov reaksiyasi.

Fruktoza xlorid kislota bilan qaynatilganda oksimetilfurfurool hosil bo'ladi va bu birikma rezortsin bilan olcha rangli qizil rang hosil qiladi. Aldozalar bilan reaksiya juda sekin boradi, shuning uchun Selivanov reaksiyasini ketogeksozalar uchun xos bo'lgan reaksiya deb yuritiladi.

Reaktivlar: a) 0,5% li fruktoza, b) Selivanov reaktivi: 0,05 g rezortstin 100 ml 20% li xlorid kislotada eritiladi.

Ishning bajarilishi: 1 ml Selivanov reaktiviga 1-2 tomchi fruktoza eritmasidan qo'shiladi va qaynab turgan suv hammomida 1 daqiqa davomida qaynatiladi. Natijada olcha rangli qizil rang hosil bo'ladi.

Ketozalar uchun karbazol bilan boradigan reaksiya

Ketozalar uchun xos bo'lgan Selivanov reaksiyasi kabi, bu reaksiya ketozalar uchun spetsifik xarakterga ega.

Reaktivlar: a) 2,2% li fruktoza eritmasi, b) L-sistein xloridning 2,4% li eritmasi, v) karbazolning 0,1% li spirtli eritmasi, g) sulfat kislotaning 75% li eritmasi

Ishning bajarilishi: 0,1 ml fruktoza eritmasiga 2,4% li sistein eritmasidan va 6 ml 75% li sulfat kislotadan qo'shiladi. Aralashma yaxshilab chayqatiladi va tezda 0,2 ml 0,1% li karbozolning spirtli eritmasidan qo'shiladi. Bir necha daqiqadan keyin qizil yoki binafsha rang hosil bo'ladi.

Fruktoza uchun mochevina bilan boradigan reaksiya

Reaktivlar: a) fruktozaning 2% li eritmasi, b) mochevinaning kukuni, v) konsentrlangan xlorid kislotasi

Ishning bajarilishi: chinni likopchaga 0,5-1 g mochevina sepiladi va uning ustiga 5-6 tomchi konsentrlangan xlorid kislotadan va 2-3 tomchi fruktoza eritmasidan qo'shiladi. Mochevinani eritish uchun likopcha sekinlik bilan chayqatiladi, keyin qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi. 10-15 daqiqadan keyin feruza ko'k rangli halqa hosil bo'ladi. Bu reaksiyada aldogeksozalar qizil rang, riboza va boshqa aldopentozalar sariq rang hosil qiladi.

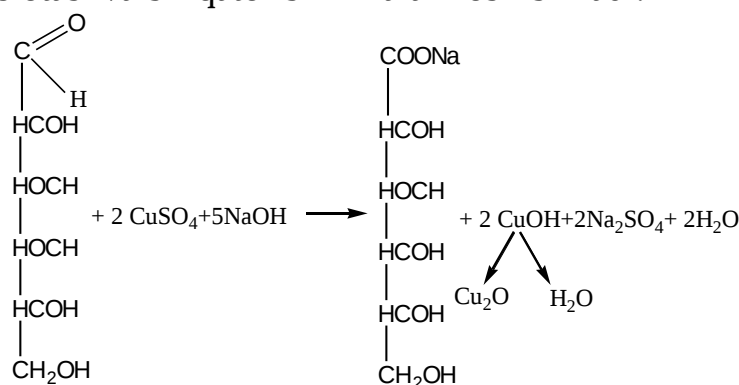
Metallarning qaytarilish reaksiyalari

Monosaxaridlar ishqoriy muhitda og'ir metall gidroksidlarini, masalan, mis (II)-gidroksidini mis (I)-oksidga, vismut oksidini metall holatigacha, kumush gidroksidni erkin kumushgacha qaytarish xossasiga ega. Bu reaksiyalar monosaxaridlarni sifat va miqdoriy aniqlash uchun ishlatiladi. Bu reaksiya monosaxarid molekulasidagi karbonil guruhi hisobiga boradi.

Ko'pgina disaxaridlar ham (maltoza, laktoza, sellobioza) molekulasida bittadan erkin karbonil guruhi tutgani uchun qaytarish xususiyatiga ega.

Trommer reaksiyasi

Glyukoza ishqoriy muhitda mis oksidlarini qaytarilgan holatga o'tkazadi va bunda o'zi glyukon kislotasigacha oksidlanadi. Glyukozaning kuchli oksidlanishi natijasida qand kislotasi va bir qator birikmalar hosil bo'ladi.



Reaktivlar: a) 1% li glyukoza, b) 1% li natriy ishqori, v) 5% li mis sulfat.

Ishning bajarilishi: 3-4 ml glyukoza eritmasiga 1-2 ml 5% li natriy ishqori va 2-3 tomchi 5% li mis sulfatdan solinadi. Eritma ko'k rangga bo'yaladi. Probirka past olovda sekinlik bilan qaynaguncha qizdiriladi. Avval sariq cho'kma (CuOH) hosil bo'ladi, keyin esa qizil cho'kmaga (Cu_2O) aylanadi.

Benedikt reaktivi bilan boradigan reaksiya

Bu reaksiya uglevodlarni ochish uchun qo'llaniladigan eng muhim reaksiya hisoblanadi.

Reaktivlar: a) 1% li glyukoza, b) Benedikt reaktivi

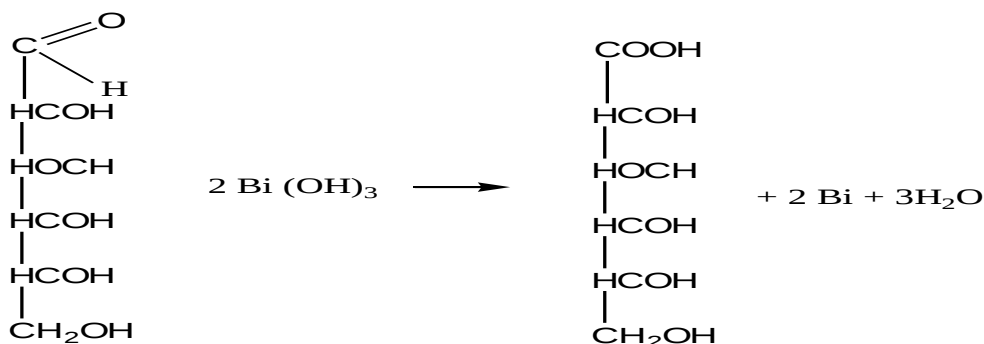
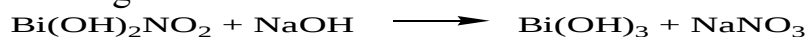
Ishning bajarilishi: 5 ml Benedikt reaktiviga 7-8 tomchi glyukoza eritmasidan solinadi. Probirka 5 minutcha qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi, keyin oqib turgan suv ostida sovutiladi. Eritma yashil, sariq, apelsin rangiga yoki qizil rangga kiradi. Keyinchalik yashil-sarg'ish yoki sariq-qizg'ish cho'kma tushadi.

Vismut gidrat oksidi bilan boradigan reaksiya (Nilander reaksiyasi)

Glyukoza ishqoriy muhitda vismut gidrat oksidini Vi metaligacha yoki uning gidroksidigacha qaytaradi.

Reaktivlar: a) 1-1,5% li glyukoza, b) Nilander reaktivi

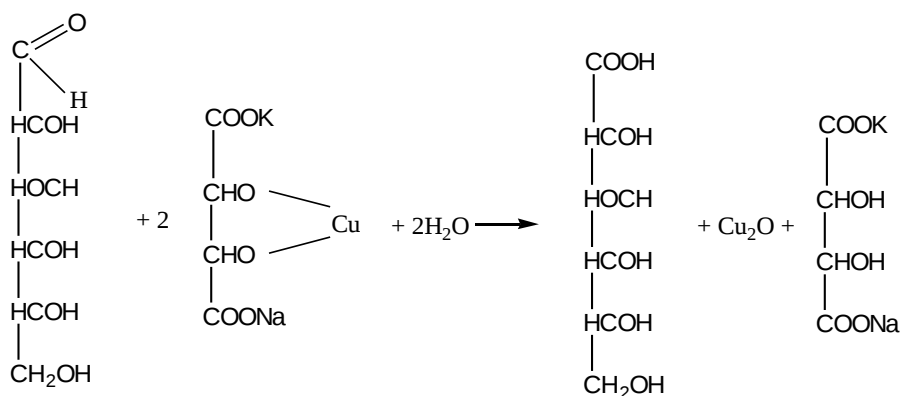
Ishning bajarilishi: 2 ml glyukoza eritmasiga 1 ml Nilander reaktividan solinadi va qaynaguncha qizdiriladi va 1-2 daqiqa qaynatiladi. Probirkadagi suyuqlik avval jigarrangga, keyin esa qora rangga bo'yaladi. Vaqt o'tishi bilan vismut metali qora rangli cho'kmaga tushadi.



Feling reaktivi bilan boradigan reaksiya

Feling reaktivi segnet tuzining alkogoli hisoblanadi. Monosaxaridlar Feling reaktivi bilan qaynatilganda, monosaxaridlar uni mis gidroksidigacha qaytarib, glyukon kislotasigacha oksidlanadi.

Reaktivlar: a) glyukoza yoki fruktozaning 1% li eritmasi. b) Feling reaktivi. Bunda 2 ta eritma tayyorlanadi: 1) 500 ml hajmli kolbada 34,64 g mis sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) eritiladi va suv bilan o'lchov ko'rsatgichiga yetkaziladi. 2) 200-250 ml suvda 173 g segnet tuzi ($\text{COOK-CHOH-CHOH-COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) eritiladi. Eritma 500 ml li kolbaga solinadi. Uning ustiga 50 g natriy ishqori eritilgan 100 ml suv qo'shiladi va belgilangan joygacha suv solinadi. Eritmalar alohida saqlanadi va ishlatilishi oldidan 2 ta eritma teng miqdorda qo'shiladi.

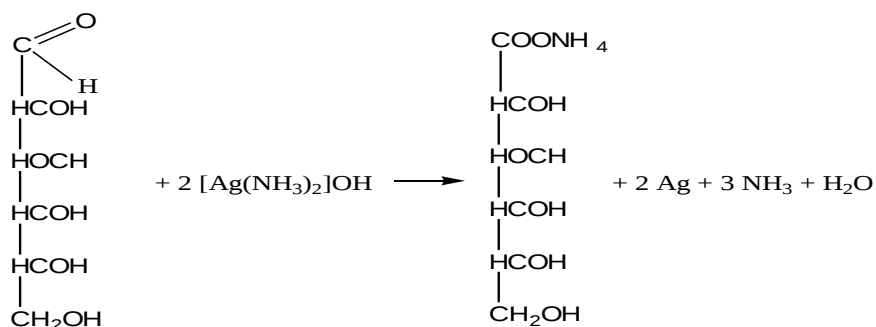


Ishning bajarilishi: 3-4 ml 1% li glyukoza yoki fruktoza eritmasiga teng miqdorda Feling reaktividan qo'shiladi va qaynaguncha qizdiriladi. Natijada mis gidroksidining qizil cho'kmasi tushadi.

Feling reaktivi bilan boradigan reaksiya hayvon va o'simlik to'qimalaridagi redutsirlangan qandlarning miqdorini aniqlashda foydalaniladi.

Kumush oksidining qaytarilish reaksiyasi (kumush ko'zgu reaksiyasi)

Monosaxaridlardagi karbonil guruhi kumush oksidining ammiakli eritmasini Ag metalligacha qaytaradi:



Reaktivlar: v) 5% li kumush nitrat eritmasi, b) 1% li glyukoza, v) 10% li ammiak.

Ishning bajarilishi: probirkaga 1 ml 5% li kumush nitrat eritmasidan solinadi va ustiga tomchilatib ammiak eritmasidan qo'shiladi. Avvaliga kulrang cho'kma hosil bo'ladi va ammiak yana qo'shilishi natijasida erib ketadi. Kumush nitratning ammiakli eritmasiga 2-3 ml glyukozadan qo'shiladi. Probirkalar 80°C li suvga 5-10 daqiqaga qo'yiladi. Shundan keyin probirka devorida kumush metalining ko'zguga o'xshash cho'kmasi hosil bo'ladi.

11 – laboratoriya mashg'uloti

Disaxaridlarga xos reaksiyalar

Disaxaridlarning molekulasida 2 ta monosaxarid molekulasidan tuzilgan bo'lib, o'zaro glikozid bog'i bilan bog'langan. Disaxaridlardan saxaroza, maltoza, laktoza, tregaloza, sellobioza va boshqalar keng tarqalgan.

Disaxaridlarning monoz molekulalarining bog'lanishiga qarab ikkita tipga bo'linadi.

- 1) maltoza tipidagi bog'lanish
- 2) tregaloza tipidagi bog'lanish.

Maltoza tipida bog'langan disaxaridlar 2 ta monoz qoldig'idan tuzilgan bo'lib, bitta glikozid gidroksidi (karbonil guruh) bog'lanmagan holda bo'ladi va maltoza tipida tuzilgan disaxaridlarning hammasi karbonil guruhi uchun hos bo'lgan reaksiyalarni: Trommer, Benedikt, Nilander, Feling eritmasi bilan namoyon qiladi. Bu tipga maltoza, laktoza, sellobiozalar kiradi.

Tregaloza tipida tuzilgan disaxaridlarning molekulasida monosaxaridlar ikkita glikod gidroksillari o'zaro kislorod ko'prigini hosil qilib bog'langan. Shuning uchun tregaloza tipidagi disaxaridlar qaytarish xossalriga ega emas. Bu tipga saxaroza va tregalozalar kiradi.

Disaxaridlarning qaytarish xossalari

Reaktivlar: a) 2% li maltoza eritmasi; b) 2% li laktoza eritmasi; v) 2% li saxaroza eritmasi; g) Benedikt, Nilander reaktivlari, Feling eritmasi, Trommer reaksiyasi uchun reaktivlar

Ishning bajarilishi: Probirkaga 2 mldan maltoza, laktoza, saxaroza eritmalaridan solinadi va ular bilan Benedikt, Nilander, Feling eritmasi bilan va Trommer reaksiyalari olib boriladi. Maltoza va laktozalar qaytarish xossalarini namoyon qiladi, saxaroza esa bu xossaga ega emas. Chunki, saxaroza molekulasida erkin glikozid bog'i yo'q.

Saxaroza inversiyasi

Reaktivlar: a) 2%li saxaroza eritmasi, b) konstantlangan xlorid kislotasi, v) 10% li natriy ishqori, g) Trommer, Benedikt, Nilander va Selivanov reaksiyalari uchun reaktivlar

Ishning bajarilishi: Probirkaga 4 ml saxaroza eritmasidan solinadi va unga 2-3 tomchi xlorid kislotadan solinadi va qaynab turgan suv hammomida 10-15 minut qaynatiladi. Shundan so'ng probirkalar olinadi, sovutiladi va natriy ishqori solinib lakmus qog'ozi bilan tekshirilgan holda neytrallanadi. Neytrallangan namunalar bilan Trommer, Benedikt yoki Nilander reaksiyalarini o'tkazib ko'riladi. Saxaroza inversiyasi mahsuloti bo'lgan glyukoza va fruktozalar qaytarish reaksiyalarini namoyon qiladi. Invertning bir qismi bilan fruktoza uchun xarakterli bo'lgan Selivanov reaksiyasi bajariladi.

Saxarozani kobalt tuzlari bilan reaksiyasi

Saxaroza ishqoriy muxitda kobalt ionlari bilan binafsha rang hosil qiladi.

Reaktivlar: a) 2% li saxaroza eritmasi, b) 2% li kobalt nitrat yoki kobalt sulfat, v) 5% li natriy yoki kaliy ishqori.

Ishning bajarilishi: Saxarozaning 2% li eritmasiga 1 ml ishqor solinadi va bir necha tomchi kobalt tuzi eritmasidan qo'shiladi. Reaksiya natijasida binafsha rang hosil bo'ladi.

Barfed reaksiyasi.

Barfed reaksiyasi disaxaridlarni monosaxaridlardan oson ajratish uchun qilinadigan reaksiya hisoblanadi. Bu reaksiyani maltaza tipida tuzilgan disaxaridlar: laktoza, maltoza, sellobiozalar namoyon qiladi. Disaxaridlarning Barfed reaktivi bilan qo'shilishi natijasida mis gidroksidining qizil cho'kmasi tezda emas, 15-20 daqiqadan keyin hosil bo'ladi. Bunda disaxaridlarning kislotalar ishtirokida gidrolitik parchalanishidan keyin amalga oshadi.

Reaktivlar: a) 1% li glyukoza, b) laktoza yoki maltozaning 1% li eritmasi, v) Barfed reaktivi.

Ishning bajarilishi: 2 ta probirka olib, ularga 1 ml dan Barfed reaktivi solinadi. Birinchi probirkaga 1 ml glyukoza, 2 – probirkaga 1 ml laktoza yoki maltozadan solinadi probirkalar yaxshilab aralashtirilib, qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi. Glyukozali probirkada 2-3 daqiqadan keyin mis gidroksidining qizil cho'kmasi hosil bo'ladi. Disaxarid solingan probirkada esa qaytarilish reaksiyasi 15-20 daqiqa suv hammomida ushlangandan keyin amalga oshadi.

12 – laboratoriya mashg'uloti

Polisaxaridlarga xos reaksiyalar

Polisaxaridlar polimer moddalar bo'lib, monosaxaridlardan tuzilgan bo'ladi. Polisaxaridlarga odatda o'zida 10 dan ortiq monoz qoldiqlarini tutgan birikmalar kiritiladi. Polisaxaridlar shirin maza bermaydi, kristallanmaydi, ularning ko'pchiligi kolloid eritma xosil qiladi.

Kraxmalning yod bilan boradigan reaksiyasi

Kraxmalning yod bilan reaksiyaga kirishib, ko'k rangni hosil qilishi birmuncha spetsifik reaksiya hisoblanadi. Rangning hosil bo'lishi amiloza bilan belgilanadi. Amilopektin esa yod bilan qizil-binafsha rang hosil qiladi, lekin amilozaning ko'k rangi uning rangini ko'rsatmaydi. Qaynatish natijasida rang yo'qoladi va sovugandan keyin yana tiklanadi.

Reaktivlar: a) 0,5% li kraxmal eritmasi, b) Lyugol eritmasi, v) Barfed reaktivi

Ishning bajarilishi: probirkaga 1-2 ml kraxmal eritmasidan solinadi va unga 1-2 tomchi Lyugol eritmasidan qo'shiladi. Natijada quyuq ko'k rang hosil bo'ladi. Isitilganda rang yo'qoladi va sovutilgach, yana paydo bo'ladi.

Kraxmalning qaytaruvchi xossasini tekshirish

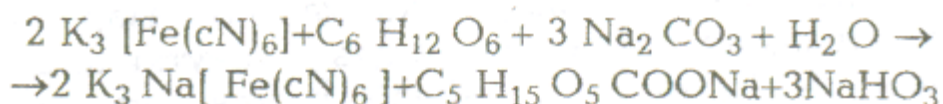
Reaktivlar: a) 1% li kraxmal, b) konsentrlangan xlorid kislota, v) Trommer reaksiyasi uchun reaktivlar: 5% li natriy ishqori, 5% li mis sulfat, v) Barfed reaktivi

Ishning bajarilishi: 2 ta probirkaga 4-5 ml dan kraxmal eritmasidan solinadi. Birinchi probirkaga 3 tomchi konsentrlangan xlorid kislota, ikkinchi probirkaga shuncha miqdorda distillangan suv solinadi. Ikkala probirkalar 10-15 daqiqa qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi. Sovitilgandan so'ng Trommer reaksiyasi o'tkazib ko'riladi. Birinchi probirkada mis gidroksidining qizil cho'kmasi tushadi. Bunda kraxmal gidrolitik parchalanib, metallarni qaytarish reaksiyalarini namoyon qiladi. Ikkinchi probirkada esa bu reaksiya amalga oshmaydi.

13 – laboratoriya mashg'uloti

Qondagi glyukoza miqdorini Xagederon - Iensen usuli bo'yicha aniqlash

Metodning mohiyati: Redutsirlanuvchi uglevodlar ishqoriy muhitda qizdirilganda kaliy ferritsianid tuzini (qizil qon tuzi) kaliy ferrotsianid tuzigacha (sariq qon tuzi) qaytaradi. Uglevodlar bunda aldon va aldar kislotalarigacha oksidlanadi.

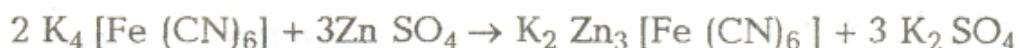


Bu reaksiyani normal o'tkazilishi uchun ferritsionidning miqdori ko'p bo'lishi kerak. Sarflanmagan ferritsianid qoldig'ini yodometrik usul bilan aniqlash natijasiga ko'ra tekshirilayotgan tajribadagi uglevodning miqdori belgilanadi.

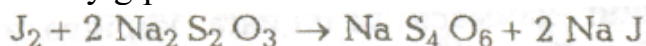
Sirka kislota ishtirokida kaliy yodid qolgan ferritsianid bilan oksidlanadi va erkin yod ajralib chiqadi.



Reaksiyani miqdoriy holatiga o'tkazish uchun rux sulfat qo'shiladi, bunda hosil bo'lgan ferrotsionid murakkab ruxli birikma shaklida cho'kmaga tushadi:



hosil bo'lgan yod esa natriy giposulfit bilan titrlanadi.



Bu metod bo'yicha uglevodlarni miqdoriy aniqlash uchun maxsus jadvaldan foydalaniladi (jadval).

Xagederon-Iensen metodi uglevodlarni miqdoriy 2 dan 385 mkg oralig'idagi diapozonda aniqlay oladi. Bu metod o'zining juda sezgirliги va aniqligi bilan ajralib turadi.

Reaktivlar: 1. 0,005 N li $K_3 (Fe (CN)_6)$ ning 0,1N li Na_2SO_3 daga eritmasi.

2. KI eritmasi. Buni tayyorlash uchun erituvchi sifatida 5 % li $ZnSO_4$ ning 25 % $NaCl$ dagi eritmasi hizmat qiladi. Aniqlashdan avval 100 ml shu eritmaga 2,5 g KI qo'shiladi.

3. 3 % li sirka kislotaning eritmasi.

4. Kraxmalning 1 % li eritmasi.

5. 0,05 N li $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ eritmasi. Bu eritma ishlatishdan avval tayyorlanadi.

Ishning bajarilishi: 2 ta 50 ml li tagi tekis kolbaga o'zida 20-350 mg uglevod tutgan 10 ml eritma solinadi va ularning ustiga 2 ml dan kaliy ferristianid eritmasidan solinadi. Uchinchi kontrol sifatidagi kolbaga 10 ml distillangan suv solinadi va ustiga oksidlovchi eritmada solinadi. Hamma kolbalarning og'zi yaxshilab berkitiladigan po'kak bilan havo sovutkichiga ulangan holda yopiladi va 15 minutga qaynab turgan suv hammomiga qo'yiladi. Qaynatib bo'lgandan keyin kolbalar oqib turgan suvda sovutiladi. Keyin har bir kolbaga 3 ml dan KI eritmasidan va 2 ml dan 3%-li CH_3COOH dan solinadi. Kolba yaxshilab aralashtirilgandan keyin, ajralib chiqqan yodni giposulfit eritmasi bilan 2 ml li mikrobyuretka yordamida titrlanadi. Titrlash eritma sariq somon rang bo'lguncha davom ettiriladi, bundan keyin esa 1—2 tomchi kraxmal eritmasi qo'shiladi va etirma rangsizlanguncha titrlanadi. Tajribali va kontrolli kolbalarga titrlash uchun sarf bo'lgan giposulfit eritmasining hajmi belgilanadi.

Hisoblash yo'li: 4 — jadvaldan uglevodning miqdori sarflangan giposulfit eritmasining miqdori tajriba va kontrol uchun titrlashga ketgan hajmi bo'yicha topiladi. Ular orasidagi farq redustirlangan uglevodlarning tekshirilayotgan namunalardagi miqdorini belgilaydi. Giposulfit bo'yicha hisoblash juda aniq bo'lmaydi. Agar namunalardagi uglevodlarning miqdori 385 mkg dan yuqori bo'lsa ferristianidning hammasi reakstiyaga kirishadi va elementar yod hosil bo'lmaydi. Shuning uchun kraxmal bilan eritma ko'karmaydi. Bunday holda tekshirilayotgan eritma bidistillangan suv yordamida 2—4 marta suyultirilib qaytadan qilinadi.

Jadval

Redutsirlangan uglevodlarni 0,005N giposulfitning hajmi bo'yicha mikrogramda hisoblash

Eritmaning hajmi, ml	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108

1,4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1,6	70	68	66	64	63	61	59	57	56	54
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

14 – laboratoriya mashg`uloti

Lipidlarga xos rangli reaksiyalar

Lipidlarga gidrofob bo'lgan yuqori molekulyar moddalar kiradi. Bu moddalar suvda erimaydi, faqatgina organik erituvchilarda (xloroform, efir, atseton, benzol, benzin) eriydi. Lipidlar hamma tirik organizmlar hujayrasida uchraydigan komponent hisoblanadi.

Kimyoviy tuzilishiga ko'ra lipidlar bir qancha guruhlariga bo'linadi:

1. Neytral yog'lar yoki triglitseridlar
2. Fosfolitseridlar yoki fosfolipidlar
3. Sfingolipidlar
4. Glikolipidlar
5. Sterin va steridlar
6. Mumlar

Organik erituvchilarda erishiga qarab va ulardagi qutubli funksional guruh molekulalarining bor yo'qligiga qarab 2 ga bo'linadi:

1. Qutubli lipidlar
2. Neytral lipidlar

Qutubli lipidlarga fosfolitseridlar, sfingolipidlar, glikolipidlar kiradi. Neytral lipidlarga erkin yog' kislotalari va ularning efirlari, atsilglitseridlar, steroidlar va mumlar kiradi.

Lipidlar tirik organizmda juda muhim funksiyalarni bajaradi:

Birinchidan ular asosiy energiya manbai hisoblanadi, chunki 1 g yog' parchalanganda 38,9 kkal energiya ajralib chiqadi. Bu esa 1 g uglevod va oqsil parchalanganda ajralib chiqqan energiyadan 2 marta ko'p hisoblanadi.

Ikkinchidan lipidlar hamma hujayralarning membranasining struktura birligi hisoblanadi va membrananing yarim o'tkazgichligini ta'minlab turadi. Bunda hujayra ichiga kiradigan moddalar tanlab o'tkaziladi. Plazmatik membrana lipid va oqsillardan tashkil topgan bo'lib, ularning miqdoriy nisbati asosan 1:1 bo'ladi. Membrana tarkibidagi lipidlarning 40% dan 90% gacha bo'lgan qismi fosfolipidlardan tashkil topgan. Bakteriyalarning va mitoxondriyaning ichki membranasidan ko'p miqdorda kardiopilin topilgan.

Uchinchidan lipidlar himoya funksiyasini bajaradi. Bunda ichki organlarning hammasi yog' qavati bilan o'ralganligini kuzatish mumkin.

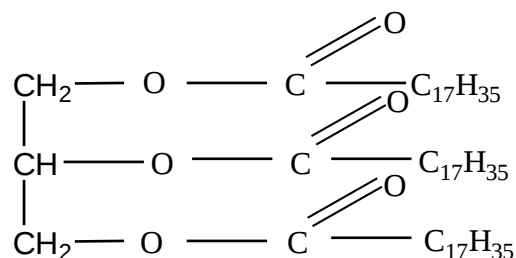
To'rtinchidan ko'pgina vitaminlar va gormonlar lipidlarga hos bo'lib, organizmda maxsus boshqarish funksiyalarini bajaradi.

Beshinchidan lipidlar termoregulyatsiya xossasiga ega bo'lib, organizmdagi issiqlikni boshqarib turadi.

Oltinchidan yog'lar suv manbai bo'lib, ular parchalanganda suv ajralib turadi va bu cho'l zonasida yashovchi hayvonlar uchun suv manbai bo'lib xizmat qiladi.

Sterinlar esa miyaning oq moddasining tarkibida bo'ladi va ko'pgina biologik aktiv moddalar vitaminlar, gormonlar va o't kislotalarini hosil bo'lishida qatnashadi.

Oddiy yog'lar triglitseridlar bo'lib, ular yog' kislotalari va glitserinning murakkab efiri hisoblanadi:



Yog'larning tarkibiga to'yingan va to'yinmagan yog' kislotalari kiradi. To'yingan yog' kislotalaridan stearin ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$) va palmitin ($\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$)lar yog'larning tarkibida eng ko'p bo'ladi. To'yinmagan yog' kislotalardan eng asosiylari olein ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$), linol ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$) va linolen ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{COOH}$) kislotalari hisoblanadi. To'yinmagan, yog' kislotalarining tarkibida qo'shbog' bo'lib, bu ularning reaksiyaga oson kirishishini ta'minlab beradi. Olein kislotasining molekulasida 1 ta, linol kislotasida 2 ta, linolen kislotasida esa 3 ta qo'shbog' bo'ladi. Linol va linolen kislotalari odam organizmida sintezlanmaydi va ovqat bilan kirishi zarur. Bu kislotalarning organizmdagi yetishmasligi natijasida moddalar almashinuvi buziladi. Shuning uchun yuqoridagi moddalar vitamin sifatida ta'sir etuvchi moddalar xossasiga (vitamin F) ega.

Linol va linolen kislotalari o'simlik moylari (kungaboqar, zig'ir) tarkibida bo'ladi. Araxidon kislotasi esa baliq moyida, sariyog'da va bir qancha margarinlarning tarkibida bo'ladi.

Lipidlarni aniqlash bo'yicha quyidagi metodlardan foydalanish maqsadga muvofiq bo'lib, bular lipidlarni biologik materiallardan ajratib olish, bir qator lipidlarni miqdoriy aniqlash, analitik fraksiyalash va ularni yupqa qatlamlarda xromatografiya qilishdan iboratdir.

Yog'larga xos sifat reaksiyalari

1. Yog'larning eruvchanligi

Reaktivlar: a) o'simlik moyi (zig'ir yoki paxta moyi), b) qattiq yog' (qo'y yoki mol yog'i), v) dietil efiri, g) atseton, d) etil spirti, e) distillangan suv.

Ishning bajarilishi: 4 tadan ikki qator qilib probirkalar qo'yiladi. Birinchi qatordagi probirkalarga bir necha tomchidan o'simlik moyidan tomiziladi. Ikkinchi qatordagilarga esa, qattiq yog'dan kichik bir bo'lakdan solinadi. Har ikkala qatorning birinchi probirkalariga 2 ml dan distillangan suv solinadi, ikkinchi probirkalarga shuncha miqdorda dietil efiri, uchinchi probirkalarga - atseton, to'rtinchi probirkalarga esa spirt solinadi. Hamma probirkalar yaxshilab chayqatiladi va

yog'larning har xil erituvchilardagi eruvchanligi kuzatiladi. Spiritli probirkani suv hammomida isitish tavsiya etiladi. Tajribaning natijalari yozib qo'yiladi.

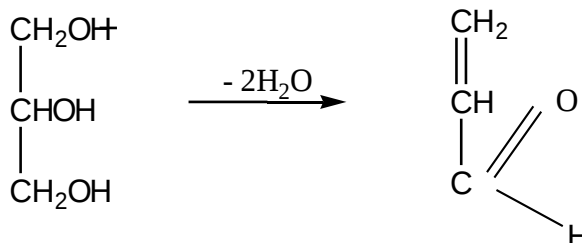
2. Yog'larning emulsiyalanishi

Reaktivlar: a) o'simlik moyi, b) 2% li natriy karbonat, v) 2% li sovun eritmasi, g) o't suyuqligi, d) distillangan suv.

Ishning bajarilishi: 4 ta probirka olib, har biriga 5 tomchidan o'simlik moyidan tomiziladi. Birinchi probirkaga 2 ml distillangan suv, ikkinchi probirkaga 2 ml 2% li natriy karbonat eritmasidan, uchinchi probirkaga 2% li sovun eritmasidan, to'rtinchi probirkaga esa 2 ml suv va bir necha tomchi o't suyuqligidan solinadi. Hamma probirkalar yaxshilab chayqatiladi va har bir probirkada hosil bo'lgan emulsiya kuzatiladi. Birinchi probirkada hosil bo'lgan emulsiya beqaror bo'lib, ozgina vaqt o'tishi bilan suv va moy qatlamlariga ajralib ketadi. Qolgan probirkalarda hosil bo'lgan emulsiya barqaror bo'lib, o'zgarishsiz qoladi. Buning sababi shuki, probirkalarga qo'shilgan emulgatorlar yog' tomchilarining sirtqi qatlamiga adsorbsiyalanib, uning sirt tarangligini kamaytiradi.

3. Akrolein reaksiyasi

Akroleinni aniqlash bilan yog'larning tarkibidagi glitserin miqdorini bilish mumkin. Yog'larni kaliy bisulfat (KHSO_4), natriy bisulfat (NaHSO_4) yoki bor kislotasi (H_3BO_3) bilan qizdirilganda, glitserin molekulasidan 2 molekula suv chiqib ketib, akril aldegidi yoki akrolein hosil bo'ladi. Akrolein qo'lansa hidli bo'lishi bilan harakterlanadi:

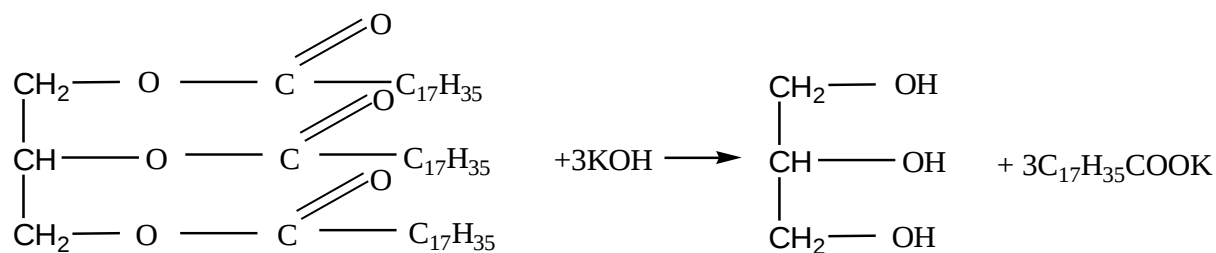


Reaktivlar: a) o'simlik moyi yoki hayvon yog'i, b) kaliy bisulfat yoki natriy bisulfat, v) bor kislotasi (kristall holda).

Ishning bajarilishi: quruq probirkaga bir necha tomchi o'simlik moyidan yoki hayvon yog'ining kichik bo'lagidan solinadi. Ustiga kaliy yoki natriy bisulfat kukunidan, bor kislotasidan sepiladi va ehtiyotlik bilan qizdiriladi. Natijada akroleinning oq bug'lari hosil bo'ladi. Bu bug' qo'lansa hidli bo'lishi bilan harakterlanadi.

4. Yog'larning sovunlanish reaksiyasi

Yog'larni ishqorlar bilan qo'shilishi natijasida ular gidrolizga uchrab, yog' kislotalarining tuzlari (sovun) va glitserin hosil bo'ladi. Yog' kislotalarning natriyli tuzlari qattiq sovun, kaliyli tuzlari suyuq sovun hosil qiladi. Mazkur reaksiyalar quyidagi tenglama orqali boradi.



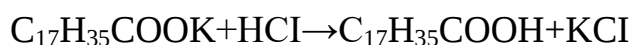
Reaktivlar: a) o'simlik moyi yoki hayvon yog'i, b) KOH ning spirtidagi 30% li eritmasi, v) distillangan suv.

Ishning bajarilishi: Katta hajmdagi probirkaga 0,5 ml o'simlik moyidan yoki 0,5 g hayvon yog'idan solinadi va ustiga 10 ml kaliy ishqorining spirtidagi eritmasidan quyiladi. Probirkaning og'zi havo sovutgichiga ulangan po'kak bilan berkitiladi va 30 daqiqa davomida qaynab turgan suv hammomida qaynatiladi. Shundan so'ng probirkaga issiq suv solinib, hosil bo'lgan sovun eritiladi.

5. Erkin yog' kislotalarining ajralish reaksiyasi.

Reaktivlar: a) sovun eritmasi, b) xlorid kislota (1 : 1).

Ishning bajarilishi: 5 ml sovun eritmasiga 1-2 ml xlorid kislota eritmasidan solinadi. Kuchli kislotalarning sovun bilan qo'shilishi natijasida erkin yog' kislotalari ajralib chiqadi va suyuqlikning ustida aniq ko'rinib turadi. Reaksiya quyidagi formula orqali amalga oshadi:



15 – laboratoriya mashg'uloti

Vitaminlarga xos sifat reaksiyalar

VITAMINLAR

Vitaminlar kichik molekulali moddalar bo'lib, turli organik birikmalarning sinflariga mansub. Vitaminlar hayvon, o'simlik va mikroorganizmlarda kechadigan muhim fiziologik va biokimyoviy jarayonlarda aktiv qatnashadigan birikma hisoblanadi. Ko'pincha vitaminlar fermentlarning oqsil bo'lmagan qismini tashkil qiladi.

Vitaminlar asosan o'simliklarda sintezlanadi. Odam va hayvon organizmiga esa ovqat bilan birga kiradi. Ovqatda vitaminning tarkibi kam bo'lsa, yoki organizmga so'rilishi buzilsa, moddalar almashinuvi izdan chiqadi va avitaminoz kasalligi kelib chiqadi.

Vitaminlarning funksiyalari bir-biri bilan bog'langan bo'lib, ko'pincha polivitaminlar kuzatiladi. Vitaminning kamayib ketish holati (gipovitaminlar) ko'pincha uzoq vaqt antibiotiklar va sulfonilamidlarni qabul qilish natijasida ham uchraydi.

Vitaminlarni keragidan ortiq qabul qilish natijasida gipervitaminlar vujudga kelib, moddalar almashinuvining buzilishiga olib keladi. Vitaminlarni sinfga

bo'lishda ularning eruvchanligi hisobga olingan. Shunga asosan vitaminlar 2 guruhga bo'linadi:

- a) Yog'da va organik erituvchilarda eriydigan vitaminlar;
- b) Suvda eriydigan vitaminlar.

Yog'da va organik erituvchilarda eriydigan vitaminlarga quyidagilar kiradi:

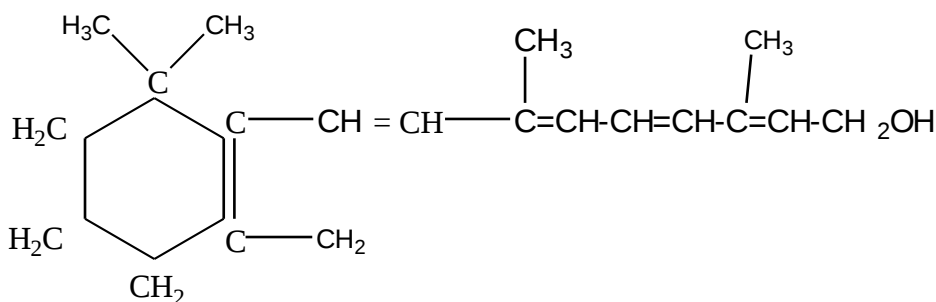
- 1) A guruh vitaminlari;
- 2) D guruh vitaminlari;
- 3) E guruh vitaminlari;
- 4) K guruh vitaminlari;
- 5) To'yinmagan yog' kislotalari (F).

Suvda eriydiganlari quyidagilar:

B guruh vitaminlari: B₁- tiamin, B₂ - riboflavin, PP-nikotinamid, B₆ - piridoksin, H-biotin, pantoten kislota, xolin, inozit, fol kislotasi, B₁₂ - stiankobalamin, B - pangomat kislota, S vitamini (askorbin kislota).

A guruh vitaminlariga xos sifat reaksiyalari

Vitamin A (retinol) o'simlik tarkibidagi qizg'ish-sariq pigmentni parchalanishi natijasida hosil bo'ladi. Jigarda va ingichka ichakda, karotinaza fermenti ta'sirida ajralib chiqadi.



Vitamin A₁ (retinol)

Karotinoidlar A vitaminining provitamini hisoblanadi. β - karotinnint simmetrik molekulasini parchalanishi natijasida 2 molekula A vitamini hosil bo'ladi.

A vitamini hayvonlarning jigarida, buyragida, baliqlarning moyida, sutda va tuxumda uchraydi. A vitamini siklik yuqori molekulali spirt hisoblanadi.

Uchxlorsurma bilan boradigan reaksiya

Vitamin A uchxlorsurma bilan reaksiyaga kirishganda ko'k rangli birikma hosil bo'ladi. Bu reaksiya jarayonida uchxlorsurma suvni tortib oluvchi bo'lib ta'sir ko'rsatadi va bo'yalgan kondensatsiya mahsuloti hosil bo'ladi.

Reaktivlar: a) uchxlorsurma (SbC₃) ning 21-23%- li xloroformdagi eritmasi, b) baliq moyi, v) retinal atsetatning yog'dagi eritmasi, g) xloroform.

Ishning bajarilishi: 2 ta probirka olib, ulardan bittasiga bir necha tomchi baliq moyidan, ikkinchisiga 1 tomchi retinal atsetatning yog`dagi eritmasidan tomiziladi va 1 ml xloroformda eritiladi. Hosil bo`lgan eritmada bir tomchi olib, ustiga 5 tomchi uchxlorosurmaning xloroformdagi eritmasidan tomiziladi. Natijada beqaror havorang yoki ko`k rang hosil bo`ladi.

D guruh vitaminlariga xos sifat reaksiyalari

D guruh vitaminlari steroidli tabiatga ega bo`ladi. Bulardan eng ahamiyatlisi vitamin D (ergokaltsiferol) hisoblanadi. Vitamin D ergosterindan ultrabinafsha nur ta`siri natijasida hosil bo`ladi.

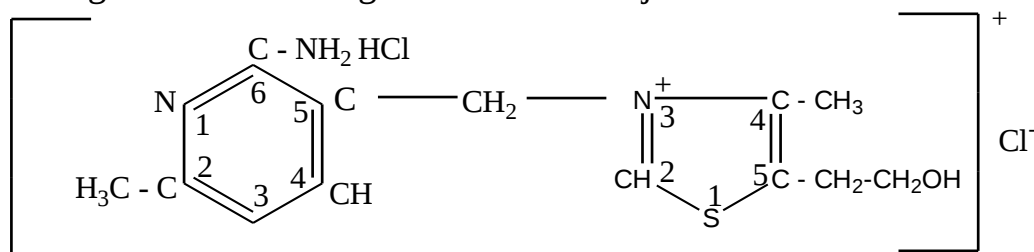
Anilin bilan boradigan reakstiya

Reaktivlar: a) baliq moyi, b) anilin, v) konsentrlangan xlorid kislotasi.

Ishning bajarilishi: baliq moyidan 1 ml olib, ustiga 4-5 ml anilindan va 0,5 ml konsentrlangan xlorid kislotadan solinadi. Probirka qaynaguncha qizdiriladi va 20-30 sekund qaynatiladi. Natijada suyuqlik qizil rangga bo`yaladi.

B₁ vitamini uchun sifat reaksiyalari

Vitamin B₁ molekulasida tarkibiga 2 ta geterotsiklik birikma - pirimidin va tiazol kiradi. Bu ikki birikma metil guruhi bilan bog`langan bo`ladi. Bundan tashqari tiamin molekulasida gidroksil va amin guruhlari ham mavjud.



Vitamin B₁ (tiamin)

Vitamin B₁ suvda yaxshi eriydi. Spirtida yomon eriydi, xloroform va dietil efirda umuman erimaydi. Vitamin B₁ o`simlik va hayvon organizmida uchraydi. Donli o`simliklarda keng tarqalgan. Shu bilan birga achitqilarda, yong`oqda, jigarda, buyrakda, yurakda va yog`siz go`sht tarkibida bo`ladi.

Tioxrom reaksiyasi

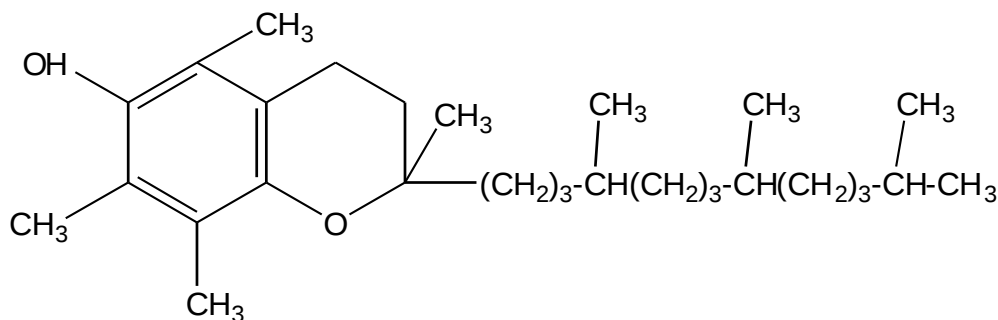
Tiamin ishqoriy muhitda ferrotsianid kaliy tuzi bilan oksidlanib, tioxromga aylanadi. Bu modda ultrabinafsha nurlari ta`sirida havorangni hosil qiladi.

Reaktivlar: a) tiamin bromid, b) kaliy ferritsianidning 5% li eritmasi [K₃Fe(CN)₄], v) 10% li o`yuvchi natriy, g) butil yoki izoamil spirti.

Ishning bajarilishi: 10 mg tiamin bromid kukunini 5 ml suvda eritib, ustiga 1 ml 5% li ferritsianid kaliy eritmasidan, 1 ml 10% li o`yuvchi natriy va 5 ml butil spirtidan solinadi. Probirka (yoki stakan) yaxshilab chayqatiladi va bir necha daqiqa xona haroratida qoldiriladi. Yuqorigi, spirtli qatlam ehtiyotlik bilan ajratib olinib, qorong`i xonada simob-kvartsli lampa nurlari yordamida ko`riladi. Natijada havorang yoki ko`k rangli fluorestsensiya aniq ko`rinadi.

Vitamin E ga xos sifat reaksiyalari

Vitamin E (tokoferol) yuqori haroratga chidamli bo'lib, nitrat kislota bilan oson oksidlanish xususiyatiga ega. U ultrabinafsha nurlari ta'sirida buziladi. Tokoferollar antioksidant hisoblangan A vitaminini va karotinoidlarni oksidlanishdan saqlaydi. Tokoferollar o'simlik moylarida (soya, kungaboqar, kunjut, zig'ir va paxta moylarida) ko'p bo'ladi. Undan tashqari ko'pgina hayvon va o'simlik maxsulotlari: tuxum, jigar, sut, sariyog', mol go'shti, karam, yeryong'oq, na'matak va oq smorodina tarkibida bo'ladi. Odamning tokoferolga bo'lgan sutkalik extiyoji 10 mg dan 30 mg gachani tashkil etadi.



α - Tokoferol

Nitrat kislota bilan boradigan reaksiya.

Kuchli oksidlovchilar, masalan konsentrlangan nitrat kislotasi bilan reaksiyaga kirishib, tokoferol tokoferilxinonga aylanadi. Bunda qizil yoki sarg'ish-qizil rangli birikma hosil bo'ladi.

Reaktivlar: a) E vitaminining yogʻli konsentratini 0,15% li etil yoki butil spirtidagi eritmasi, b) konsentrlangan nitrat kislota.

Ishning bajarilishi: E vitaminining spirtli eritmasidan bir necha tomchi olib, ustiga 8-10 tomchi konsentrlangan nitrat kislotadan sekinlik bilan qo'shiladi va probirkalar sekin chayqatiladi. 1-2 daqiqadan keyin probirkadagi aralashma qizil yoki sarg'ish-qizil rangga kiradi. Reaksiya juda shiddat bilan boradi, shuning uchun nitrat kislotani probirka devoridan sekinlik bilan qo'shilishi va bu ishlar tortuvchi shkaf tagida olib borilishi kerak bo'ladi.

Temir xlorid bilan olib boriladigan reaksiya

Tokoferollar temir xlorid bilan oksidlanib, temir xlorid FeCl_2 gacha qaytariladi. Fe^{2+} ioni ortofenantrolin bilan reaksiyaga kirishib, $\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3$ ning kompleks ioni xosil bo'ladi va natijada eritma qizil rangga bo'yaladi.

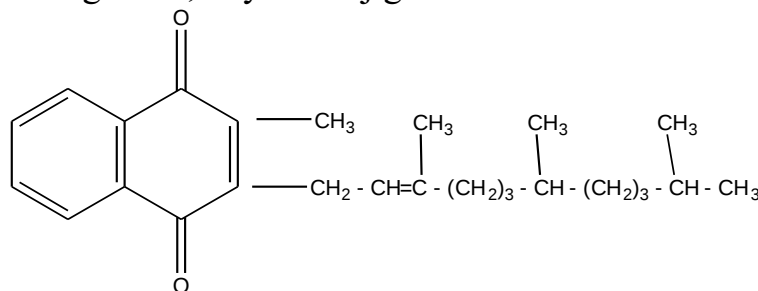
Tokoferollar temir xlorid bilan oksidlanganda piran halqasining buzilishi amalga oshadi va oksialkilxinon hosil bo'ladi.

Reaktivlar: a) vitamin E ning 0,15% li etil spirtidagi eritmasi, b) 0,2% li temir xloridning spirtli eritmasi (bu eritma qorongʻu joyda saqlanishi kerak), v) ortofenantrolinning 5% li spirtli eritmasi.

Ishning bajarilishi: 1-2 ml vitamin E ning spirtli eritmasiga 1 ml ortofenantrolin qo'shiladi va temir xlorid tomchilatib turiladi. Bu ish qizil rang hosil bo'lguncha amalga oshiriladi.

Vitamin K ga xos sifat reaksiyalari

K vitamini qon ivishida asosiy omil hisoblanadi. Vitamin K yashil o'simliklarning xloroplastlarida sintezlanadi. Uning molekulasida 2-metil 1,4-naftoxinon va fitol spirtidan tuzilgan. K vitamini bosh va rangli karam, pomidor, qovoq, na'matakning mevasi, beda, petrushka, sabzi, yel va qarag'aylarda bo'ladi. Undan tashqari mol go'shti, buyrak va jigarda bo'ladi.



Vitamin K₁

Anilin bilan boradigan reaksiya

2-metil-1,4-naftoxinon anilin bilan reaksiyaga kirishib, 2-metil-3-fenilamino-1,4-naftoxinonni hosil qiladi va bu qizil rangli bo'ladi.

Reaktivlar: a) vikasol (0,1% li suvli eritmasi yoki metionin), 0,2% li etil spirtidagi eritmasi, b) anilin.

Ishning bajarilishi: 1 ml vikasol yoki metionin eritmasiga 6-8 tomchi anilin qo'shiladi va chayqatiladi. Natijada probirkadagi aralashma qizil rangga bo'yaladi.

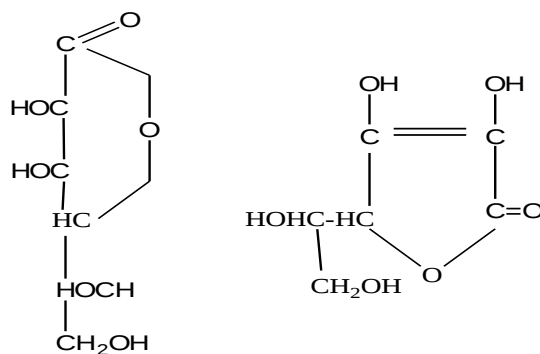
Sistein bilan boradigan reaksiya.

Reaktivlar: a) vikasol 0,1% li suvli eritmasi, b) sisteinning 0,03% li eritmasi, v) 5% li natriy ishqori

1 ml vikasol eritmasiga shuncha miqdorda sistein eritmasidan va 5-6 tomchi natriy ishqori eritmasidan solinadi. Natijada sariq yoki limon rang hosil bo'ladi.

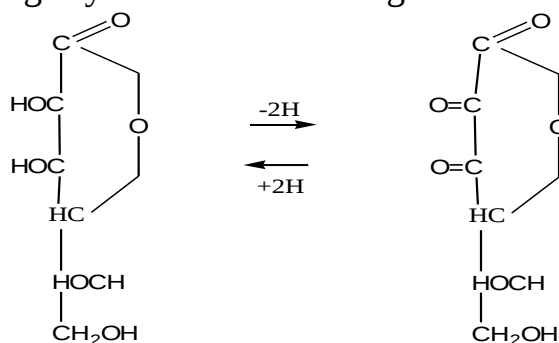
Vitamin C (askorbin kislotasi)

Vitamin C singa kasalini oldini olish uchun ishlatiladigan preparat hisoblanadi. Kimyoviy tuzilishi jihatidan 2,3-diyenol-gulon kislotasining laktoni hisoblanadi. Diyenol guruhining bo'lishligi vitamin C ning oson oksidlanib, qaytarilishini ta'minlab turadi:



L-askorbin kislotasi vitamin aktivligini namoyon qiladi, D-askorbin kislotasi esa fiziologik inertmodda hisoblanadi.

L- askorbin kislotasi rangsiz, suvda yaxshi eriydigan va nordon mazali bo'ladi. Benzolda, xloroformda, dietil efirda va yog'larda erimaydi. Askorbin kislotasining suvdagi eritmasi kislotali reaksiyani namoyon qiladi. U oson oksidlanib, degidroaskorbin kislotasiga aylanadi. Bunda uning vitaminli hossasi saqlanib qoladi.

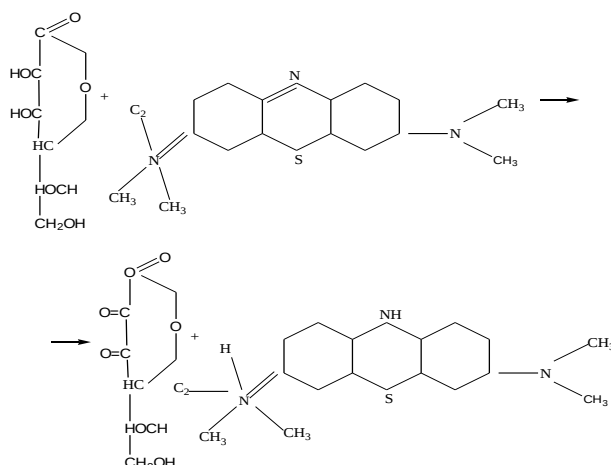


Degidro askorbin kislotasi beqaror bo'lib, qaytarilish reakstiyasi natijasida yana L-askorbin kislotasiga aylanadi. Vitamin C ning bu xossasi uning oksidlanish-qaytarilish reaksiyalarida aktiv ishtirok etishini belgilaydi. Askorbin va degidroaskorbin kislotalari elektronlar uzatilishidagi eng muxim komponentlardan hisoblanadi. Vitamin C ko'pgina fermentativ jarayonlarda aktivator va ingibitor sifatida ishtirok etadi.

Odamning vitamin C ga bo'lgan sutkalik ehtiyoji yoshga, fiziologik holatga va bajarilayotgan ishga bog'liq bo'ladi. Kattalar uchun 70-120 mg ni bolalar uchun 30-70 mg ni tashkil etadi.

Metilen ko'ki bilan boradigan reaksiya

Askorbin kislotasi yorug'likda metilen ko'kini qaytarib, rangsiz birikmaga aylantiradi.

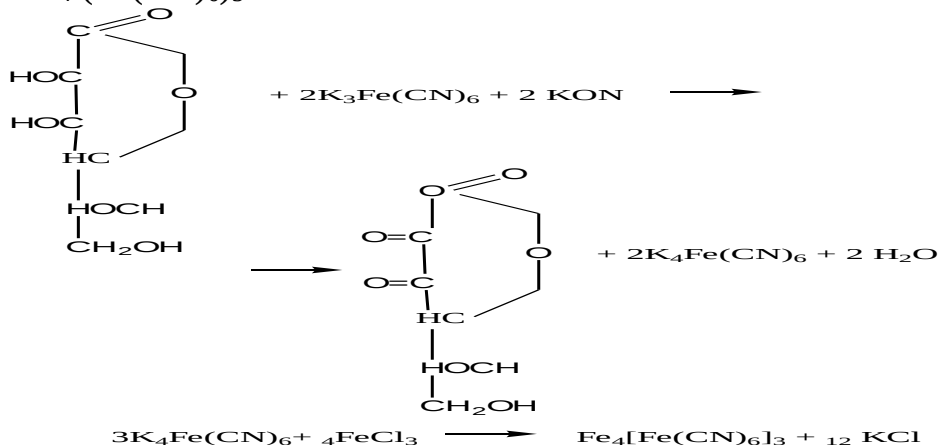


Reaktivlar: a) karam yoki kartoshkaning sharbati, b) 0,01 % li metilen ko'ki, v) 5% li natriy karbonat.

Ishning bajarilishi: 1 ml yangi ajratilgan karam yoki kartoshka sharbatiga 1-2 tomchi metilen ko'ki eritmasidan solinadi va ustiga 2-3 tomchi natiriy karbonatdan qo'shiladi. Probirka yengil qaynatiladi va natijada ko'k rangning yo'qolishi kuzatiladi.

Qizil qon tuzi bilan boradigan reaksiya

Askorbin kislotasi oksidlanib, qizil qon tuzini $K_3Fe(CN)_6$ sariq qon tuzigacha $K_4Fe(CN)_6$ qaytaradi. Bunda 3 valentli temir ionlari ishtirokida kislotali muhitda berlin lazuri $Fe_4(Fe(CN)_6)_3$ hosil bo'ladi.



Reaktivlar: a) karom yoki kartoshkaning sharbati, b) qizil qon tuzining 5% li eritmasi, v) kaliy ishqorining 5% li eritmasi, g) 10% xlorid kislota, d) 1% li temir xlorid.

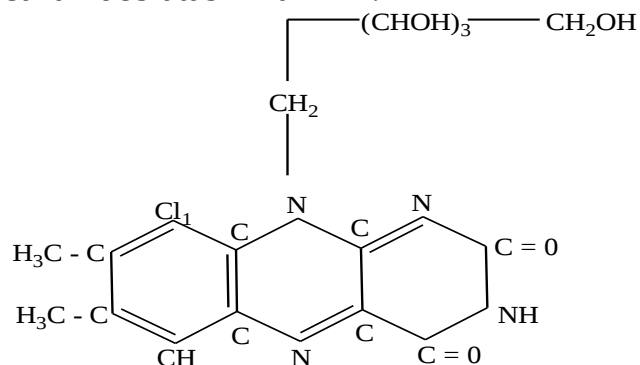
Ishning bajarilishi: 1 ml karom yoki kartoshka sharbatiga 2 tomchi kaliy ishqori eritmasidan va shuncha miqdorda qizil qon tuzidan solinadi. Probirka yaxshilab chayqatiladi. Keyin 6-8 tomchi 10% li xlorid kislotasidan va 1-2 tomchi temir xlorid solinadi. Natijada berlin lazerining ko'k yoki yashil-ko'k rangli cho'kmasi hosil bo'ladi.

Vitamin B₂ (riboflavin) ga xos sifat reaksiyalari

Vitamin B₂ organizmda ketadigan oksidlanish-qaytarilish jarayonlarida ishtirok etuvchi hisoblanadi. U vodorod uzatilish jarayonida ishtirok etadigan oksidlanish-qaytarilish fermentlarining aktiv guruhlari tarkibiga kiradi. Shu bilan birga oqsil moddalarining almashinishi bilan mahkam bog'langan.

Riboflavin ninasimon kristall bo'lib, qizg'ish-sariq rangli bo'ladi. Suvda, etil spirtida piridinda, siklogeksanda yomon eriydi xloroformda, atsetonda, benzolda umuman erimaydi. Riboflavin yuqori haroratga chidamli.

Vitamin B₂ molekulasining asosi dimetilizoalloksazanni ribitol spirtining qoldig'i bilan bog'lanishidan hosil bo'lgan. Shuning uchun riboflavinni 6,7-dimetil-9-(1-d-ribitol)-izoalloksazan deb atash mumkin.



Riboflavin o'simlik va hayvon maxsulotlarida bo'ladi. Bu vitamanga odam organizmining ehtiyoji energiya sarfiga va ovqat tarkibidagi oqsilning miqdoriga bog'liq. Riboflavinga bo'lgan sutkalik ehtiyoj katta odamlarda 2,5-3,5 mg ni tashkil etadi. Bu ko'rsatkich mehnatning turiga va organizmning fiziologik holatiga qarab belgilanadi. Yosh bolalarning ehtiyoji 3,0 mg ni, o'smirlar uchun esa (16-22 yoshgacha) 3,5 ni tashkil etadi.

Riboflavinni qaytarilish reaksiyasi.

Riboflavin oson oksidlanib, oson qaytarilish tarilish xususiyatiga ega. Uning vodorod bilan qaytarilishi natijasida rangsiz birikma leykoflavin hosil bo'ladi. Bu birikmaning oksidlanishi natijasida esa osongina riboflavin hosil bo'ladi.

Reaktivlar: a) riboflavinning 0,015% li eritmasi (eritma qora shisha idishda saqlanishi kerak, b) konsentrlangan xlorid kislota, v) metall holidagi rux.

Ishning bajarilishi: 1 ml riboflavinning eritmasiga 10 tomchi konsentrlangan xlorid kislotadan va bir bo'lak rux metalidan soldinadi. Ajralib chiqadigan vodorod ta'sirida eritmaning rangi sekin-asta o'zgarib boradi. Dastlab sariq rang paydo bo'ladi, u yashil rangga, keyin malina rangiga, pushti rangga aylanib, keyin rangsizlanadi. Bir necha daqiqadan keyin probirkaning yuqori qismidagi suyuqlik yana sariq rangni oladi.

Vitamin PP (B₅, nikotin kislotasi)

Vitamin PP o'zining kimyoviy tabiatiga ko'ra nikotin kislotasi va uning amidi hisoblanadi.

Nikotin kislotasining va uning amidining biologik aktivligi bir xil, lekin organizmda nikotinamid ko'proq uchraydi, chunki nikotin kislotasi organizmda oson

amid xoliga o'tadi. Shuning uchun ko'pgina olimlar nikotin kislotasini vitamin PP ning provitamini, nikotinamidni esa vitamin PP deb ataydilar. Nikotinamid biologik oksidlanish jarayonida eng asosiy birikma hisoblanadi. U anaerob degidrogenazalar tarkibiga kiradi va nikotinamidadenindinukleotid (NAD) va nikotinamidadenindinukleotidfosfatlarning kofermenti hisoblanadi.

Vitamin PP etishmasa, pellagra kasalligi kelib chiqadi. Vitamin o'simlik va hayvon maxsulotlarida keng tarqalgan bo'lib, odamning unga bo'lgan sutkalik extiyoji (yoshga va mexnat turiga va organizmning xolatiga ko'ra) 15-25 mg ni tashkil etadi.

Mis astetat bilan boradigan reakstiya. Nikotin kislotasi sirka kislotali muxitda mis tuzlari bilan reakstiyaga kirishib, nikotin kislotasining ko'k rangli mis tuzini hosil qiladi.

Reaktivlar: a) nikotin kislotasini 0,75% li eritmasi, b) 15% li sirka kislota, v) 5% li mis astetat.

Ishning bajarilishi: 2 ml nikotin kislota eritmasiga 1 ml 15% li sirka kislotasidan solinadi va qaynatiladi. Keyin 1-1,5 ml mis astetat eritmasidan qo'shiladi. Probirkada avval havorang aralashma paydo bo'ladi, keyin esa nikotin kislotasining ko'k rangli mis tuzi cho'kmaga tushadi.

Natriy karbonat bilan boradigan reakstiya

Nikotin kislotasini suvsiz natriy karbonat bilan qizdirilganda, spetifik qo'lansa hid ajralib chiqadi.

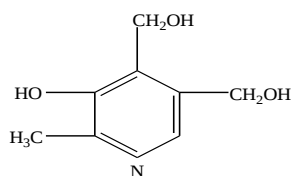
Reaktivlar: a) nikotin kislotasining kukuni, b) suvsiz natriy karbonat.

Ishning bajarilishi: Kichkina chinni idishda 0,05g nikotin kislotasi 0,1-0,15g suvsiz natriy karbonat bilan aralashtiriladi va qizdiriladi. Natijada piridinining yoqimsiz xidi ajralib chiqadi.

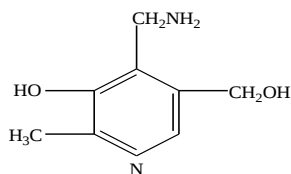
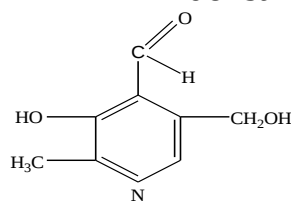
Vitamin B₆ (piridoksin)

Vitamin B₆ xossasiga ega bo'lgan 3 xil modda bor. Bular piridoksol (piridoksin), piridoksal va piridoksamin bo'lib, bularning hammasi piridinining xosilasi hisoblanadi. Bu modda yuqori temperaturaga, ishqor va kislotalarning ta'siriga chidamli bo'lib, quyosh nuri ta'sirida buziladi.

Piridoksol



Piridoksal



Piridoksamin

Piridoksal va piridoksamin aminokislotalar almashinuvida muxum rol o'ynaydi. Ularning fosforlangan xosilalari (fosfopiridoksal va fosfopiridoksamin) koferment funkstiyasini namoyon qiladi va aminokislotalarning pereaminirlanish, dekarboksillanish reakstiyalarini katalizlaydi. Bundan tashqari fosfopiridoksal nikotin kislotasini triptofandan sintezlanishini koferment bo'lib katalizlaydi. Vitamin B₆ shu bilan birga lipidlar almashinuvida ham ishtirok etadi.

Piridoksol, piridoksal va piridoksamin o'simlik va hayvon maxsulotlarida keng tarqalgan. Vitamin B₆ jigarda, bo'yракda, muskul to'qimasida, tuxumda, achitqida, guruch kepagida, no'xotning tarkibida bo'ladi.

Katta odamlarning piridoksinga bo'lgan sutkalik extiyoji 2 mg ni tashkil etadi.

Vitamin B₆ ning temir xlorid bilan beradigan reakstiyasi

Piridoksin temir xlorid bilan reakstiyaga kirishib, qizil rangli kompleks hosil qiladi.

Reaktivlar: a) piridoksinning 0,5% li eritmasi, b) 1% li temir xlorid.

Ishning bajarilishi: 4-5 ml piridoksin eritmasiga 1 ml temir xlorid eritmasidan qo'shiladi. Natijada qizil rang hosil bo'ladi.

Piridoksinni fosfor-volfram kislotasi bilan cho'ktirish reakstiyasi

Piridoksin piridinining hosilasi bo'lganligi sababli, bir qator alkaloidlar ta'sirida, shu jumladan fosfor-volfram kislotasi ta'sirida ham cho'kmaga tushadi.

Reaktivlar: a) xlorid kislotada eritilgan fosfor-volfram kislotasining 1% li eritmasi (1:10), b) piridoksinning 5% li eritmasi.

Ishning bajarilishi: 1 ml piridoksin eritmasiga 1 ml fosfor-volfram kislotasidan qo'shiladi. Natijada cho'kma tushishi kuzatiladi.

MOLEKULYAR BIOLOGIYA QISM

16 – laboratoriya mashg'uloti

Tuxum oqsilidan albuminni kristall holda ajratish

Asbob va reaktivlar: 50 va 100 ml o'lchamli silindrlar, shisha voronkalar, shisha tayoqchalar, vakuum ostida filtrlash uchun Byuxner voronkali kolba (Byunzen kolbasi), 50 ml tumshuqli shisha stakan, qog'oz filtrlar, universal indikator qog'ozi, 2 ta yangi tuxum, ammoniy sulfat (to'yingan eritmasi), ammoniy sulfat (kukuni), 5 % li sirka kislota.

Ishning borishi: 2 ta yangi tuxumni oqidan sarig'i ajratib olinadi va og'zi bekiladigan 100 ml o'lchamli silindrga solinadi. Ustiga oldindan tayyorlab qo'yilgan ammoniy sulfatning to'yingan (757 g tuz 1 l suvda eritilib, suv hammomida qaynatish bilan tayyorlangan) eritmasidan teng hajmda solinadi. Og'zi berkitiladi va yaxshilab chayqatiladi. Ammoniy sulfat bilan chala to'yintirilgan holatda avval globulinlar cho'kmaga tushadi. Cho'kmani taxlangan filtr qog'ozi yordamida 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 filtdan ajratib olinadi, 50 ml li kimyoviy stakanga solinadi va eng kam miqdordagi suvda eritiladi. Hosil bo'lgan eritmani pH ni universal indikator qog'ozi bilan tekshirib turilgan holatda eritmaga 5 % li sirka kislotasi eritmasidan aralashtirib turilgan holda tomchilatib solinadi. pH ning ko'rsatkichi 4,7-4,8 ga yetganda eritmaga ozginadan ammoniy sulfatning to'yingan eritmasidan aralashtirib turgan holda solinadi. Bu jarayon yo'qolmaydigan loyqa hosil bo'lguncha davom ettiriladi. Stakan toza shisha bilan yopiladi va sovutgichga qo'yiladi. Bir sutkadan keyin tuxum albumini ninasimon kristallar holida cho'kmaga tushadi.

17 – laboratoriya mashg'uloti

Qonda glikoproteidlarni aniqlash

Umumiy ma'lumotlar. Glikoproteidlar – prostetik guruhi sifatida uglevod va uning hosilalarini tutgan murakkab oqsillar. Glikoproteidlarning oqsil bo'lmagan qismiga monosaharidlardan glyukoza, galaktoza, fukoza, aminoqandlardan-glyukozamin, galaktozamin, atsetilglyukozamin, kislotalar-glyukuqon, sirka,kseyramin, sulfat va boshqalar.

Glikoproteidlar hayvonlar organizmida keng tarqalgan. Ular deyarli barcha to'qimalarda mavjud. Moddalarni biri(masalan, bo'g'imlar sinovialsuyuqligi glikoproteidlari) mehanik funksiyani, boshqalari(so'lak mutsini, me'da va ichak mutsini)oziqni harakati va hazmini osonlashtiradi. Glikoproteidlarga qon guruhi moddalari, fermentlar(masalan, xolinesteraza) va boshqalar. Ayrim o'simliklar urug'ida holiglikoproteidlar bor. (bug'doy, javdar va boshqalar) Ko'plab

glikoproteidlar mutsin va mukovoidlar deb umumiy nomlangan. Utsinlar shilliq bezlar sekreti tarkibiga kiradi. Tog'aylarda mukoidlar uchraydi. (hondro mukoidlar), suyaklarda (asseomukoidlar), biriktiruvchi to'qimalar va boshqalarda uchraydi. Ayrim mutsien va mukoidlar prostetik guruhlarini oson ajralib, to'qimalarda erkin holda uchraydi va mukopolisaharidlar deb nomlanadi. Glalukon kislotasi, xondroitin sulfat kislotasi, geporin kabi mukopolisaharidlar organizmda muhim ahamiyatga ega.

Teyxman probasi-gemin kristallarini xosil bo'lishi.

Reaktivlar: debrinirlangan qon; sirka kislotasi, konsentrlangan; natriy xlorid, kristal xolda.

Predmet oynasiga debrinirlangan qonning tomchisi solinadi, oyna yuzasida surtiladi, ehtiyotkorlik bilan alanga ustida 60⁰S dan ortmasligini kuzatib, quritiladi. Quritilgan surtmaga bir necha natriy xlorid kristalli va 2-3 tomchi konsentrlangan sirka kislotasi solinadi. Aralashma yopqich oynasi bilan yopiladi va ehtiyotkorlik bilan qaynash darajasiga etkaziladi.

Sovutilgan preparat lupa yordamida kuzatiladi va kuzatiladigan qo'ng'ir geminning rombsimon plastinkalar, tayoqchalar, yulduzchalar shaklidagi kristallari chizib olinadi.

18 – laboratoriya mashg'uloti

Musku to'qimasidan oqsil fraksiyalarini ajratish

Asboblari va reaktivlar: shisha hovoncha, shisha voronka, 1 l li tumshuqli laboratoriya shisha stakani, dializ qilish uchun kolloid xaltacha, doka, qog'oz filtrlar, 10 % li natriy gidroksid, 1 % li kumush nitrat, ammoniy sulfat, 10% li natriy gidroksidi, 1 % li mis sulfat, ammoniy sulfat (to'yingan), musku to'qimasi.

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.

Oqsillarning tuzli eritmasini olish. 10 g maydalangan musku to'qimasi xovonchada 10-15 minut davomida 40-50 ml 10 % li natriy sulfatning eritmasi bilan aralashtirilgan holda ushlanadi. Natijada yarim suyuq massa hosil bo'ladi. Hosil bo'lgan massa 2 qavat dokadan suzib olinadi. Bu jarayon filtrat tiniqlashguncha davom ettiriladi. Filtrlash jarayoni sekin amalgam oshadi. Natijada 15-20 ml cha tiniq pushti-qizil rangli eritma olinadi. Hosil bo'lgan oqsilning tuzli aralashmasi tarkibida albuminlar va globulinlar bo'ladi. Bundan keyin ular dializ va tuzlash usullari bilan bir-birlaridan ajratiladi.

Musku to'qimasini tuzli aralashmasini dializ qilish. Dializ metodi katta oqsil zarrachalarini yarim o'tkazgich bo'lgan pardadan (suniy 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 colloid 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. Shundan keyin har 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 yanashu 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 dializning tugaganligidan darak beradi, ya'ni bunda dializatoridagi tuz to'liq stakandagisuvga chiqib ketgan bo'ladi. Shu paytda xaltachadagi tiniq bo'lgan filtrate 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.

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.

19 – laboratoriya mashg'uloti

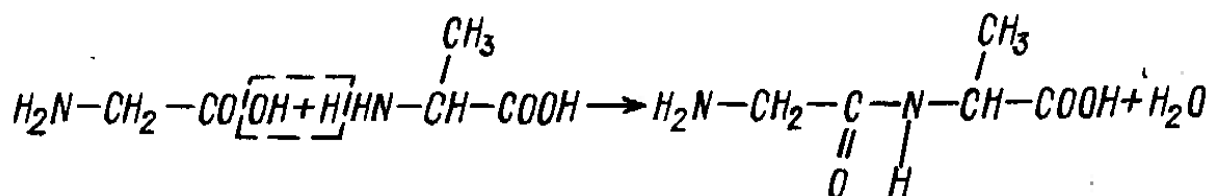
Bug'doy unidan oqsillarni ajratish va ular tarkibini o'rganish

Oqsillar yuqori molekulyar organik birikmalar, tirik hujayra strukturasi tuziladigan asosiy material hisoblanadi.

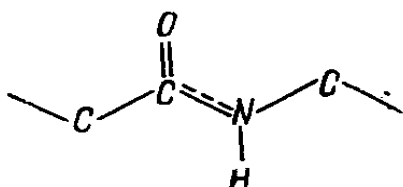
To'qimalarda oqsilning yig'indi miqdori, ulardagi umumiy azot miqdorini 6,25 ko'effitsientiga ko'paytirib topiladi.

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 harakterga egadir. Erkin amino- va karboksil gruppalar dissotsiatsiyasida ular qutublanadilar



Аминокислотная кислота (глицин) α-аминопропионовая кислота (аланин)



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.

Mazkur reaksiyalarni amalga oshirish uchun dastavval oqsillarni biologik materialdan ajratib olish zarur.

O'simlik oqsili eritmalarini tayyorlash

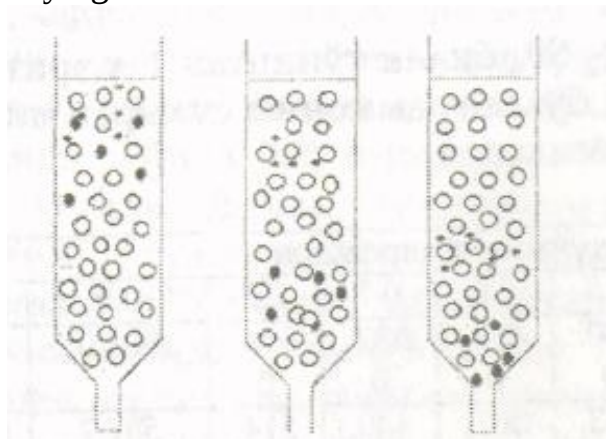
40 gramm bug'doy unini kimyoviy kolbada 160 ml distillangan suvga solib, aralashtiriladi hamda kolba sovitgich shkafiga (1-2⁰S) bir sutkaga qo'yiladi. So'ng eritma aralashtiriladi, avval gigroskopik momiq paxta keyin esa qavatli qog'oz filtr orqali filtrlanadi. Eritma asosan albuminlarni tutadi. Eritma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

Oqsil fraksiyalarini ajratish va tozalash

Biokimyoviy amaliyotda oqsil oligomerlarini ajratib olish uchun markyor oqsillar qo'llanadi. Markyorlar identifikatsiyasi uchun gel-filtratsiya usuli qo'llanadi. 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.

Uslubning mohiyati. «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 molekular gel ichiga kira olmaydi. SHu sababli, dastlabki fraksiyalarda yuqori molekulyar, keyingilarida esa kichik molekulyar oqsillar yig'iladi (1-rasm).



O GEL

- YIRIK MOLEKULA
- KICHIK MOLEKULA

1 —rasm. Moddalarni gel — filtratsiya uslubida ajratishning sxematik tasviri

Gel turlari. 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 dekstringning 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 eritmalaridan foydalaniladi, chunki kuchli kislotali muhit sefadekslarning glikozid bog'lariga ta'sir ko'rsatadi.

1 — jadval

Sefadeks turlari

Gel turlari	Molekulyar og'irligiga ko'ra ajratish qobiliyati, Daltonda	Suvni yutish hajmi, g/g quruq gelga nisbatan	Bo'kkan gelning hajmi sm ³ /g, quruq 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

Sefadekslar distillangan suvda bo'ktirilganda, elektrostatik tortishuv tufayli bir —biriga yopishib qolishi mumkin. Elektrolitlarda esa bunday holat kuzatilmaydi.

SHu sababli sefadekslarni kuchsiz tuzli eritmalarida bo'ktirish maqsadga muvofiqdir. 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 yetadi. Natijada gel donachalari zichlashib eritmaning o'tishini qiyinlashtiradi. Ishlatib bo'lgach sefadeksni avtoklavda (100°S da, 40 min) sterilizatsiya qilish mumkin.

Gel — filtratsiyada ishlatiladigan gellarga agarozalar ham kiradi. Agarozalar gellari — chiziqli polisaharid bo'lib, D — galaktoza va 3,6 —angidro —L galaktoza qoldiqlarining ketma — ket birikishidan hosil bo'lgan.

Sefaroza, biogel A, gelaroza, sagavak — agarozalar gellari hisoblanadi. Bu gellar ham dekstrin gellariga o'xshash gidrofil xususiyatiga ega va tarkibida zaryadlangan gruppalar tutmaydi. Bu gellarning g'ovaklik darajasi yuqori bo'lganligi sababli katta molekulyar og'irlikka ega bo'lgan moddalarni ajratishda qo'llaniladi (G —200 geli 600000 Daltongacha bo'lgan molekulalarni ajratadi). SHu sababli agarozalar gellari viruslar, NK va polisaharidlarni tekshirishda qo'llaniladi. Agarozalar gellari yuqori konsentratsiyadagi tuz eritmalarida, 96%li spirtida, rNi 4—10 bo'lgan muhitda turg'un hisoblanadi. Gel bilan ishlash uchun optimal harorat $0—30^{\circ}\text{S}$ bo'lib, undan yuqori haroratda gel yumshab qoladi, past haroratda esa o'z xususiyatini yo'qotadi.

Poliakrilamid gellari akrilamid va metilenbisakrilamidning polimeri bo'lib, ikkala monomer nisbatini o'zgartirish bilan ma'qul o'lchamdagi g'ovaklik hosil qilish mumkin. «Bio-Rad-laboratoris» firmasi tomonidan 30 xildan ortiq poliakrilamid asosiga ega bo'lgan biogellar ishlab chiqariladi, ulardan R —2, R-6, R-10, , R-300 va hokozolar. Ular 800 — 400000 dalton molekulyar og'irlikka ega bo'lgan moddalarni ajratishda qo'llaniladi. Bu gellar ham rN muhiti 4,5 — 9 dan oshganida va 50°S dan yuqori haroratda o'z stabiligini yo'qotadi.

Gel o'rnida «bioglas» va «porasil» nomi bilan yuritiladigan g'ovaksimon sharchalardan ham foydalaniladi. Bu sharchalar borosilikat shishasidan yasalgan bo'lib, bir qator ijobiy xususiyatlarga ega:

- a) NF va kuchli ishqorlardan tashqari barcha reagentlarga nisbatan inert;
- b) sharchalar ishga tayyor xolda bo'lganligi sababli bo'kish uchun ortiqcha vaqt sarflanmaydi;
- v) eritma katta tezlikka o'tkazilganda ham sharchalar holati o'zgarmaydi (bir — biriga yopishib qolmaydi, zichlashib ketmaydi)
- g) shisha sharchalarning poralari o'lchami eritma konsentratsiyasi rNiga bog'liq emas;
- d) shisha sharchalarni oson yuvib sterillash mumkin.

Gelfiltratsiya olib borilayotgan gellarda ichki turg'un va tashqi harakatlanuvchi fazalar mavjud. SHu zaylda gelning umumiy hajmi 2 qismdan: tashqi — granula tashqarisidagi hajm (V_0) va ichki hajmidan (V_i) dan iborat. Tekshirilayotgan moddaning gel g'ovaklari ichiga kirishi yoki gel atrofiga tarqalishini tarqatish koeffitsienti ko'rsatadi. Bu ko'rsatkich molekulaning o'lchamiga bog'liq bo'lib, agar molekulalar katta bo'lsa, ular gel g'ovaklari ichiga kira olmaydi va K_{d0} bo'ladi. Kichik molekulalar teshik orqali gel ichiga kiradi, bu xolda K_{d1} bo'ladi. O'rtacha

o'lchamdagi molekulalar gel g'ovaklari ichiga qisman kira olishi sababli ularning K_d ko'rsatkichi 0 bilan 1 oralig'ida yotadi.

Gelfiltratsiyada ajratiladigan moddani kolonkada yuborishdan to uning kolonkadan chiqquncha ketgan bufer hajmi elyuat hajmi (V_e) deb ataladi. Elyuat hajmi tashqi hajmga (V_0), tarqalish koeffitsientiga (K_d) va gelning ichki qismiga (V_i) bog'liq ravishda o'zgaradi. Elyuat hajmi (V_e) quyidagi tenglama bo'yicha aniklanadi:

$$V_e q V - K_d \cdot V_i \quad (1)$$

Gelning ichki hajmi (V_i) uning quruq massasi (a) va suvni yutish qobiliyatiga (W) bog'liq:

$$V_i q a \cdot W \quad (2)$$

U_e — elyuat hajmi kolonkaning katta — kichikligiga mos ravishda o'zgaradi, lekin K_d — ma'lum gel uchun doimiy kattalik bo'lib, uning ko'rsatkichi kolonka o'lchamiga bog'liq emas.

Agar ikki xil modda turlicha molekulyar og'irlikka va K_d ga ega bo'lsa, ($K_{d,1}$) va ($K_{d,2}$), u holda ikkala moddaning elyuat hajmi quyidagicha ko'rinishda bo'ladi:

$$V_s q V_{e,1} - V_{e,2} q (V_0 - K_{d,1} \cdot V_i) - (V_0 - K_{d,2} \cdot V_i) \quad (3)$$

$$V_s q q (K_{d,1} - K_{d,2}) \cdot V_i \quad (4)$$

Ikki xil moddani to'liq ajratish uchun tekshiriladigan eritma miqdori V_s miqdoridan xiyol kamroq olinadi. Kolonkadagi gelning balandligi 1 va 2 tenglama asosida xisoblab topiladi.

Kerakli asbob va reaktivlar: Xromotografiya kolonkasi (Dq3x80 sm), spektral asbob — «Uvikord», fraksiyalar kollektori, peristaltik nasos, potensiometr, ajratuvchi voronka, pipetkalar, probirkalar, shisha tayoqcha, filtr qog'oz, spektrofotometr, G — 200 sefadeksi, 0,2 M NaCl, 0,1 M tris — HCl buferi (rN 8,0), mitoxondriya gomogenatining oqsili, Louri uslubida oqsilni aniqlash uchun zarur reaktivlar.

Ishning bajarilishi: 1. Gelni bo'ktirish. G — 200 sefadeksi 0,2 M NaCl li 0,1 M tris — HCl buferida (rN8,0) suspenziya qilinadi. Tindirib suyuqlik va suv yuzasidagi mayda zarrachalar to'kib yuboriladi. Bu jarayon uch marotaba takrorlangach, sefadeks 0,1 M tris — HCl buferida 1 sutkaga qoldiriladi.

2. Kolonkani to'ldirish. Kolonka qat'iy vertikal holatda shtativga o'rnatiladi va kolonkaning pastki qismiga shisha filtr uning ustidan kolonka diametriga mos ravishda qirqilgan filtr qog'oz qo'yiladi.

3. Kolonkaning 1/3 qismiga bufer eritma qo'yib pastki kran ochiladi va havo siqib chiqariladi. Kolonkada ma'lum miqdorda bufer eritma qoldirib kran yopiladi.

4. Ajralishning borishi kolonkaning to'g'ri to'ldirilishiga bog'liq. SHu sababli kolonkani gel bilan to'ldirishta alohida etibor berish zarur.

Gelning quyuq suspenziyasi kolonka devori bo'ylab yoki shisha tayoqcha yordamida quyiladi. Kolonkada sefadeksning kerakli balandligini hosil qilish uchun kolonka og'ziga mos keluvchi shisha idishdan foydalanish ishni osonlashtiradi. Bu idish pastki tomonidan kolonkaga ro'zina probka yordamida mahkamlanadi va gel suspenziyasining kerakli miqdori shisha tayoqcha yordamida solinadi. Kolonka shu usulda to'ldirilganda gel zarrachalari bir tekisda o'tiradi, ish jarayoni tezlashadi. Agar

yuqoridagi idish bo'lmasa og'zi keng voronkadan foydalanish mumkin. Yuqoridagi jarayonlarni amalga oshirish davomida gelning sirtqi yuzasi bir tekis bo'lishi lozim.

5. Kolonkada gelning kerakli balandligi hosil bo'lgach kranni ochib gel ustidagi ortiqcha bufer eritma chiqarib yuboriladi. Gel bir sutka davomida bufer eritma bilan yuviladi. Bunda buferning tez oqib ketishiga yo'l qo'ymaslik lozim, aks holda suyuqlikning tez oqishi natijasida vujudga kelgan bosim gelning zichlashib qolishiga sabab bo'ladi.

6. Mitoxondriya gomogenatining oqsilini yuborish. Kolonkadagi bufer eritmaning chegarasi gel yuzasiga yaqinlashgach kolonka diametriga mos keluvchi filtr qog'oz qo'yiladi va ehtiyotkorlik bilan kolonka devori bo'ylab pipetka yordamida 4-5 ml (1 sutka davomida bufer eritmaga qarshi dializ qilingan) mitoxondriya gomogenatining oqsili quyiladi. Probirkadagi mitoxondriya gomogenatining oqsil qoldiqlari ham bufer bilan chayib pipetka yordamida kolonkaga quyiladi.

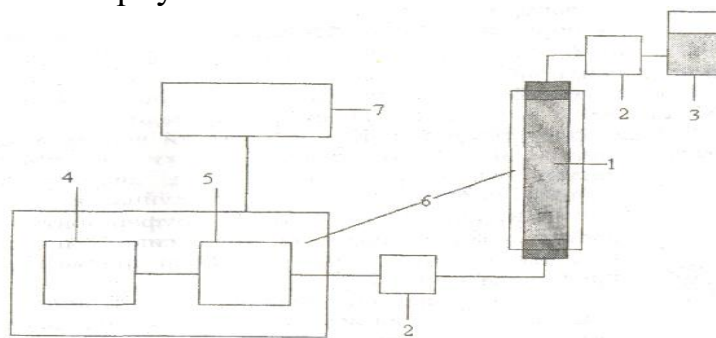
7. Pastki kran ochilib mitoxondriya gomogenatining oqsili gel ichiga kiritiladi. Kolonka devorlari 3-4 ml bufer bilan yuvib gel ichiga kiritiladi.

8. Kolonka ichiga 2 — 3 ml bufer eritma solinib adaptor yordamida rezervuar bilan ulanadi, natijada yopiq sistema hosil bo'ladi (2-rasm).

9. Mitoxondriya gomogenatining oqsilini elyuirlash uchun o'rtacha 700 — 800 ml 0,2 M HC1 li 0,1 M tris-HC1 (rN-8) bufer eritma kerak bo'ladi. Elyusiya tezligi 40 — 60 ml/soat.

10. Kolonkadan chiqayotgan elyuatdagi oqsil miqdori avtomatik ravishda ishlovchi «Uvikord» asbobi yordamida o'lchanib, 3-5 mldan fraksiyalar kollektorida yig'iladi. Buning iloji bo'lmasa oqsil miqdorini Louri uslubi bo'yicha yoki 280 nm to'lqin uzunligida fraksiyaning optik zichligini o'lchash yordamida aniqlash mumkin,

11. Olingan natijalarga ko'ra grafik tuziladi. Bunda Y o'qiga optik zichlik, X o'qiga fraksiyalar soni qo'yiladi.



2-rasm

- 1 — gel bilan to'ldirilgan kolonka
- 2 — perestaltik nasos
- 3 — bufer eritma solingan rezervuar
- 4 — fraksiyalar kollektori
- 5 — spektral asbob «Uvikord»
- 6 — sovituvchi kamera
- 7 — potentsiometr.

Olingan natijalar taxlili. Olingan fraksiyalarning molekulyar og'irligini aniqlash uchun ma'lum og'irlikka ega oqsillarni kolonkadan o'tkazish o'yli bilan amalga oshiriladi. Pharmacia firmasi markyorlar to'plami o'z ichiga ribonukleaza (M 13 700), ximotripsinogen A (M 25000), ovalbumin (M 43000), albumin (M 67 000), aldolaza (M 158 000), katalaza (M 232 000), ferritin (M 440 000), tiroglobulin (M 669 000)larni oladi.

Grafikda keltirilgan markyor oqsillar yordamida mitoxondriyalar gomogenati oqsillari tarkibidan sitoxrosm S ajratib olinadi.

20 – laboratoriya mashg'uloti **Murakkab oqsillar tarkibini o'rganish**

Murakkab oqsillar makromolekulalari tarkibiga aminokislotalardan tashqari oqsil tabiatiga ega bo'lmagan moddalar-nuklein kislotalar, lipidlar, pigmentlar, fosfat kislotalari, metallar va boshqalar kiradi. Ular prostetik guruh deb nomlanadi. Prostetik guruhning tabiatiga ko'ra murakkab oqsillar nukleoproteidlar, xromoproteidlar, glikoproteidlar, fosfoproteidlar, lipoproteidlar, metalloproteidlar va boshqalarga ajratiladi.

Xromoproteidlar-o'zining prostetik guruhi sifatida bo'yalgan moddalarni tutadigan murakkab oqsillar hisoblanadi. Ba'zilar temir, boshqalari mis, magniy, ayrimlari flavoproteinlar, rodopsinlarni tutadi. Xromoproteinlarga moddalar almashinuvida muhim ahamiyatga ega oqsillar kiradi. Qonning bo'yoqli moddasi-gemoglobin, muskullar xromoproteidi-mioglobin, fermentlardan-katalaza, sitoxromoksidaza, peroksidazalar ham temir tutuvchi oqsillar sarasiga kiradi. Mis tutuvchi oqsillarga o-difenoloksidaza (polifenoloksidaza) va askorbinatoksidazalar kiradi, ayrim umurtqasiz hayvonlar qonida va boshoyoqli mollyuskalar gemolimfasida gemotsianin kabi proteidlar ham shunday oqsillar qatoridan hisoblanadi. Flavoproteidlar fermentativ xususiyatlarni amalga oshirib, degidrogenizatsiyalash reaksiyalarini katalizlashadi, ya'ni organik birikmalardan vodorodni ajralishini amalga oshiriladi.

So'lakdan mutsinni ajratish.

Reaktivlar: a) yangi olingan so'lak; b) sirka kislota, konsentrlangan. Probirkaga 2-3ml so'lak solinib, ustiga tomchilatib sirka kislotalari solinadi. Mutsin cho'kmasi kuzatiladi.

Mutsinni uglevod komponentiga Pobedov- Malish reaksiyasi.

Glikoproteidlar uglevod qoldiqlari timol yoki α - naftol bilan sulfat yoki xlorid kislotalishtirokida bo'yalgan birikmalar hosil qiladi. Bo'yoqlar mineral kislotalar ta'sirida monosaharidlar degidrotatsiyasi natijasida furfurol va oksimitilfurfurol hosil bo'lishiga bog'liq.

Reaktivlar: a) so'lakni mutsin cho'kmasi; b) timol etil spirtidagi 1% eritmasi; v) α - naftol etil spirtidagi 0,2% eritmasi; g) sulfat kislota konsentrlangan.

Mutsin cho'kmasi distillangan suvda astalik bilan yuviladi, ikki qismga bo'linadi. Bir qismiga 5-6 tomchi α naftol eritmasi qo'shib aralashtiriladi. Ikkinchisiga esa huddi shuncha miqdorda timol solinadi. So'ngra probirkalar devoir

bo'ylab bir-ikki ml konsentrlangan sulfat kislota quyiladi. 1-probirkada suyuqliklar chegarasida binafsha qizg'ish, ikkinchisida esa qizil rang hosil bo'ladi.

21 – laboratoriya mashg'uloti

Achitqidan nukleoproteidlarni ajratish

Kerakli reaktiv va asboblari: a) achitqi; b) dietil efiri; v) 0,4% NaOH; g) 5% sirka kislotasi; d) yaxshilab yuvib qizdirilgan shisha kukuni yoki qum.

Hovonchaga 5g achitqi olib ustiga 1 ml dietil efiri va 1 ml suv qo'shib namlantiriladi, so'ng ustiga ozgina shisha kukuni yoki qum qo'shib 0,4 % NaOH bilan oz-oz miqdorda (5-10 ml) qo'shib yaxshilab tuyiladi. Hammasi bo'lib 50 ml ishqor sarflanadi. Bu jarayon 15-20 daqiqa davom yetadi. Hosil bo'lgan massa filtrlanadi yoki 10 daqiqa davomida sentrifugalanadi (minutiga 2500g). Filtrat yoki sentrifugat stakanga quyilib ustiga tomchilatib 5% SN_3SOON dan nukleoproteidlar to'liq cho'kmaga tushgunga qadar tomiziladi. Cho'kma sentrifugalanib ajratib olinadi.

DNK ga xos sifat reaksiyasi.

DNK dezoksiribozalarga hos bo'lgan rangli reaksiyalar orqali aniqlanadi. Ko'pincha difenilamin bilan boradigan reaksiya qo'llaniladi ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH-C}_6\text{H}_5$). Difenilamin dezoksiriboza yoki DNK bilan ko'k rangli, riboza yoki RNK bilan yashil rangli birikma hosil qiladi.

Kerakli asbob va reaktivlar: a) dezoksiribonukleoproteidlar cho'kmasi (avvalgi ishga qaralsin) b) difenilamin reaktivi: 1 gr difenilamin 100 ml muzlagan sirka kislotasida eritiladi. Eritmaga 2,75 g konsentrlangan N_2SO_4 qo'shiladi ($R_o = 1,836$) v) 0,4% NaOH eritmasi.

Dezoksiribonukleotidlar 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 diqiqa davomida suv hammomida qizdiriladi. Natijada ko'k rang hosil bo'ladi.

22 – laboratoriya mashg'uloti

Loviyadan nukleoproteidlarni ajratish

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

Jihozlar va reaktivlar. Sentrifuga, hovoncha, aralashtirgich, 50 ml-li o'lchov silindri, 10 ml-li pipetka yoki 10-20 ml-li shpritslar, standart tuzli eritma- 0,14 M Na (K)-sitrati, 200 ml etil spirti, suvga to'yingan fenol, rN 6,0-li 10%-li Na-dodetsilsulfat (Na- DDS), xloroform, izoamil spirti, 5 g ungan loviya.

Ishning borishi. Loviyaning unib chiqqan qismini vodoprovod suvi bilan va keyin distilangan suv bilan yaxshilab yuviladi. Undan 5 g olib, chinni hovonchada 50 ml standart tuzi eritmada gomogen holatga keltiriladi va gomogenatni 3-4 qavatli dokadan o'tkaziladi. Bu gomogenatga 1%-gacha Na-dodetsilsulfat qo'shiladi va aralashtiriladi va uning ko'pirib ketmasligiga e'tibor berib, suvga to'yintirilgan rN 6,0-li fenol qo'shiladi. Aralashmani 60 °S –gacha qizdiriladi va 30 minut davomida

yaxshilab chayqatiladi, 0 °S- +5 °S atrofida sovutiladi va 15-20 minut davomida sentrifugalanadi. Bunda 3 ta qavat hosil bo‘ladi: suvli, fenol va cho‘kma. Suvli qatlam deproteinlashga uchragan RNK-dan tarkib topgan, uni shprints yordamida ajratib olinadi va teng hamdagi xloroform va izoamil spirti aralashmasi (24:1) bilan deproteinlanadi. Aralashmani fenol bilan ishlanganidek yaxshilab chayqatiladi, sentrifuga qilinadi va yuqoridagi suvli qavat ajratib olinadi. RNK suvli qavatdan 2,5 hamdagi spirt bilan cho‘ktiriladi (-10°S). Sentrifuga yordamida cho‘kmani ajratib olinadi va 10-20 ml standart tuzi eritmada eritiladi yoki boshqa bufer eritma ishlatish mumkin va 260, 280 va 230 nm-da yutilish qiymatlari aniqlanadi. A260/A230 va A260/A280 aniqlanadi. Birinchi nisbat RNK-ning polisaharidlardan, ikkinchisi oqsillardan tozalanish darajasini belgilaydi ($\geq 2,00$). 260 nm-dagi yutilish yordamida RNK konsentratsiyasi va hosil bo‘lgan miqdori aniqlanadi (260 nm-dagi 1 optik birlik qiymatga 42 mkg RNK to‘g‘ri keladi).

23 – laboratoriya mashg‘uloti

DNKni piyozdan ajratish

Mazkur tajriba yordamida qurollanmagan ko‘z bilan nuklein kislotalarni ajratishning oddiy va tezkor usuli hisoblanadi.

Kerakli materiallar: piyoz boshining yarimi; 10% NaCl; 95%-li etil spirti yoki bir necha millilitr miqdorda izopropanol, muzlatilgan holda, xech bo‘lmasa yuzi muzlatilgan bo‘lishi maqsadga muvofiqdir; muz; yuvish vositasi; chinni xovoncha; shisha voronka; bir martalik qog‘oz salftka; yog‘och tayoqcha; disstillangan suv; shisha stakan, kimyoviy probirkalar; pichoq; taxtacha; chinni likobcha; mato.

Muzni maydalab chinni likobchaga solish kerak. Piyoz boshining o‘rta qismidan 3 sm o‘lchamli kub kesib olinadi hamda maydalanadi, ustiga 20 ml 10% NaCl eritmasi yordamida bir jinsli xolga keltiriladi. Hosil bo‘lgan eritmani ustiga umumiy hajm 3 barobar ortguncha 10% NaCl eritmasi solinadi. So‘ng hosil bo‘lgan eritmaning ustiga 3 ml yuvish vositasi solinadi, yaxshilab aralashtiriladi. Darxol aralashma muzli idishga solinadi, 5 daqiqadan so‘ng yog‘och tayoqcha solinganda stakandagi aralashma yopishqoq holga keladi.

Sovutilgan shisha probirka va voronka yordamida aralashma filtrlanadi. Filtratga teng miqdorda sovutilgan etil spirti solinadi va 2-3 daqiqaga qoldiriladi. Suyuqliklar chegarasida DNK cho‘kish 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.

24 – laboratoriya mashg‘uloti

Jigardan nukleoproteidlarni ajratish

Jigar, taloq, oshqozon osti bo‘zi, buyraklar va achitqi nukleoproteidlarga boy hisoblanadilar. Ular ishqoriy eritmalarda erib, kislotali eritmalarda cho‘kmaga tushadi. Dezoksiribonukleotidlar tuzli eritmalarda ham yaxshi eriydi.

Kerakli asbob va reaktivlar: a) mol yoki cho‘chqaning muzlatilgan yangi jigari yoki talog‘i. b) natriy xlorning 5% li eritmasi. v) taxta tayoqcha.

2-2,5 g taloq yoki jigarni mayda bo‘lakchalarga bo‘lib xavonchada 5% li NaCl va maydalangan shisha bo‘lakchalari yordamida yaxshilab o‘ziladi. Tuzli eritmani oz-ozdan solib boriladi. Jami 80 ml tuzli eritma sarflanadi.

Taloq 12-15 daqiqa davomida gomogen massa hosil bo‘lgunga qadar o‘ziladi. Hosil bo‘lgan massani probirkalarga solib, 10-15 daqiqa davomida sentrifugalanadi. So‘ng sentrifugatni shisha silindrga solib hajmi o‘lchanadi.

SHisha stakanga distillangan suv quyilib (suvning hajmi sentrifugandan 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 hos bo‘lgan rangli reaksiyalar orqali aniqlanadi. Ko‘pincha difenilamin bilan boradigan reaksiya qo‘llaniladi

($C_6H_5-NH-C_6H_5$). Difenilamin dezoksiriboza yoki DNK bilan ko‘k rangli, riboza yoki RNK bilan yashil rangli birikma xosil qiladi.

Kerakli asbob va reaktivlar: a) dezoksiribonukleoproteid cho‘kmasi (avvalgi ishga qaralsin) b) difenilamin reaktivi: 1 gr difenilamin 100 ml muzlagan sirka kislotasida eritiladi. Eritmaga 2,75 g konsentrlangan N_2SO_4 qo‘shiladi ($R_o = 1,836$) v) 0,4% NaOH eritmasi.

Dezoksiribonukleoproteid cho‘kmasining bir qismi probirkaga solinadi va 0,5-1 ml 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.

25 – laboratoriya mashg‘uloti

DNKni bukkal epiteliydan ajratish

O‘tkaziladigan tajriba yordamida qurollanmagan ko‘z bilan nuklein kislotalarni ajratishning oddiy va tezkor usuli amalga oshiriladi.

Kerakli materiallar: og‘iz bo‘shlig‘i shilliq qavati; 5% NaCl; etil spirti yoki izopropilen spirti muzlatilgan holda, xech bo‘lmasa yuzi muzlatilgan bo‘lishi maqsadga muvofiqdir; sovun eritmasi; kimyoviy buyoq eritmasi; shisha voronka; bir martalik qog‘oz salftka; yog‘och tayoqcha; distillangan suv; shisha stakan, kimyoviy probirkalar.

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 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.

Suyuqliklar chegarasida DNK cho'kishi jarayonini oq ipsimon cho'kma sifatida kuzatish mumkin. Ularni yog'och tayochaga 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.

26 – laboratoriya mashg'uloti

Oqsillarning gel-elektroforezi

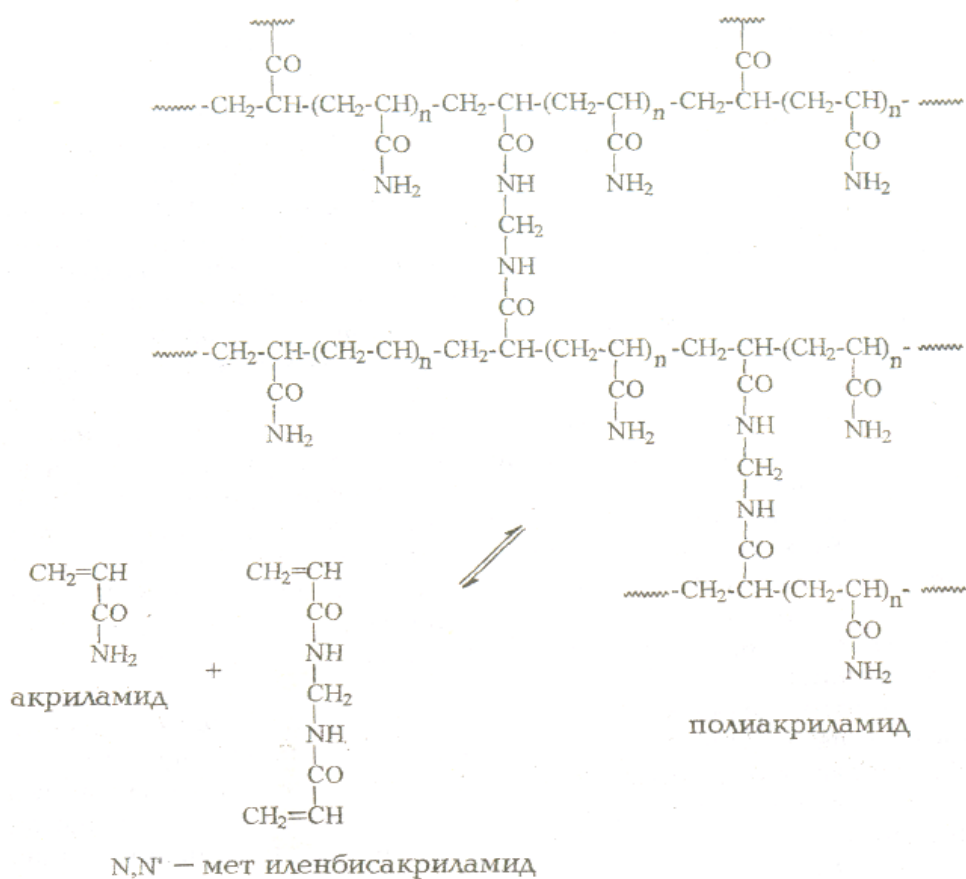
PAG elektroforez keng qo'llaniladigan usul hisoblanadi. Tashuvchi muhit sifatida akrilamid va metilenbisakrilamid sopolimerlari qo'llaniladi. Monomerlarning uzun poliakrilamid zanjiri ma'lum joylarida metilen ko'prigi yordamida o'zaro birikishi xisobiga eleksimon teshiklar hosil qiladi. Bir —biridan bir xil uzoqlikda joylashgan amid gruppalari bu strukturaning yuqori gidrofilligini ta'minlaydi. Akrilamidning polimerlanish TEMED (tetrametiletildiamin) indikator, persulfat katalizatori yordamida yoki riboflavin ishtirokidagi fotokataliz hisobiga boradi. O'zining elaksimon strukturasi tufayli PAG molekulyar elak vazifasini ham o'taydi. Gelning qovushqoqligi, chidamliligi, elastikligi va teshiklarning o'lchami poliakrilamidning polimerlanish darajasiga, ya'ni N, N — bisakrilamid soniga bog'liq. Gelning g'ovaklik darajasini polimerlanish vaqtida eritmadagi akrilamidning konsentratsiyasi belgilaydi. Akrilamid va biriktiruvchi monomer— N, N — metilenbisakrilamidning nisbati 40:1 (og'irligiga ko'ra) ni tashkil yetadi. Demak akrilamidning to'g'ri keladigan konsentratsiyasini tanlab, kerakli o'lchovdagi g'ovakli gelni hosil qilish mumkin.

Yuqori malekulali oqsillarni (100000 va undan ortiq) ajratishda 7% li akrilamiddan foydalaniladi (g'ovak diametri 50 A).

Kichik molekulali oqsillarni ajratish uchun kichik g'ovakli gel ishlatiladi (15% va 20% li akrilamid, g'ovak diametri 30A).

Sintetik PAG tabiylariga (M: kraxmal, agar geliga) nisbatan bir qator afzalliklarga ega: kimyoviy jihatdan inertligi; mexanik jihatdan turg'unligi; rN o'zgarishlariga chidamliligi; ultrabinafsha nurida tiniqligi; ko'pchilik erituvchilarda erimasligi; adsorbsiya va elektroosmos sodir bo'lmasligi bilan ahamiyatlidir. Uslub yuqori sezgirlikka ega (aniqlash uchun 50—100 mkg oqsil kifoya) bo'lganligi sababli kam reaktiv talab yetadi.

Bu usul bo'yicha oqsillarni fraksiyalarga ajratish boshqalariga ko'ra ancha samaradorligini, texnik jihatdan oddiyligini, elektroforez tez sodir bo'lishi xisobiga vaqtning tejallishini va aniq natijalar olish imkoniyatini berishini hisobga olgan holda disk—elektroforezning mohiyati va ishni olib borish tartibi haqida batafsil to'xtalib o'tamiz.

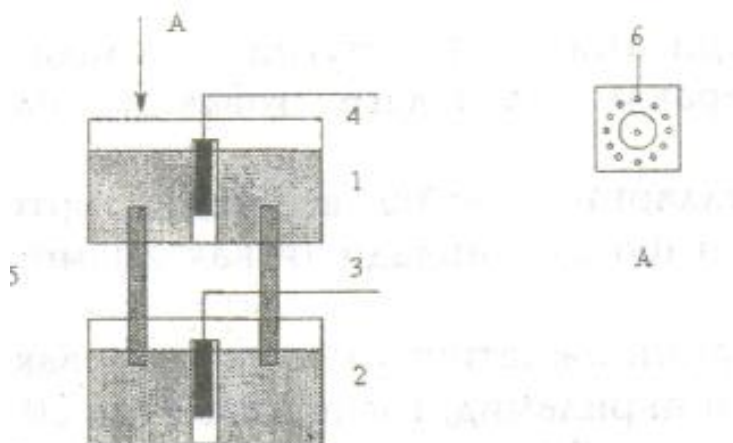


Disk-elektroforez

Bu uslubda oqsillarning elektr maydonida harakatlanishi va fraksiyalarga ajrashi PAG bilan to'lg'azilgan silindrsimon shisha naychalarda amalga oshiriladi. Kolonkada oqsil fraksiyalari disk ko'rinishida ajraladi, shu sababli disk — elektroforez deb nomlangan.

Asbobning tuzilishi. Disk — elektroforez o'tkaziladigan asbobning asosiy qismi yuqori (1 rasm) va pastki idishdan, gel to'ldiriladigan shisha naychalardan (1—rasm) iborat. Yuqori va pastki idishga platina simli yoki ko'mir plastikali elektrod (1—rasm) o'rnatilgan. Ikkala idish o'rtasida gel to'ldirilgan shisha naychalar vertikal holatda joylashadi. Yuqorigi idishning tubida bir xil uzoqlikda joylashgan teshiklar bo'lib, mahkamlovchi xalqa (1—rasm) yordamida gelli naycha biriktiriladi. Shisha naychaning ichki diametri 5 mm, tashqi diametri 7 mm, naycha uzunligi 65 — 70 mm. Naychaning ichki yuzasi bir tekis bo'lishi lozim, aks holda oqsillar aniq fraksiyalarga ajralmaydi va gelni shishadan ajratib olish qiyinlashadi.

Akrilamid gelning yaxshi polimerlanishiga shisha naychaning tozaligi ham ta'sir qiladi, shuning uchun ishlatishdan avval shisha naychalarni xrom aralashmasida bir soat bo'ktirib qo'yib, suvda chayiladi va termostatda quritiladi. YOg'dan tozalash uchun atsetonga botirib olib, yana quritiladi.



1—rasm. Disk — elektroforez o'tkazish uchun mo'ljallangan asbob

1 — asbobning bufer to'ldirilgan yuqori qismi,

2 — asbobning bufer to'ldirilgan pastki qismi,

3 —gelli shisha naycha,

4 — elektrodlar,

5 — mahkamlovchi xalqa,

6 —shisha naycha o'rnatiladigan teshik.

Elektroforez o'tkazish, uchun kerakli asbob va reaktivlar: elektroforez asbobi, mikropipetka, shprits, shisha naycha uchun shtativ, fotopolimerlash uchun lampa, elektr toki manbai, biriktiruvchi simlar, tris, akrilamid, TEMED, NS1, BIS, riboflavin, saharoza, ammoniy persulfat, glitsin yoki (alanin), bromfenol ko'ki (metilen yashili), toza sirka kislotasi, KON kerak bo'ladi.

Eritma tayyorlash. Gel tayyorlash uchun asosiy eritmalar.

Nordon oqsillar uchun:

A ishqoriy eritma: (rN8,9)

48,0 ml I N NS1

36,6 g tris

0,23 ml- TEMED 100 ml gacha distillangan suv bilan keltiriladi;

48,0 ml I N NS1

5,98 g tris

0,46 ml TEMED

100 ml gacha distillangan suv solinadi;

28,0 g akrilamid

0,75 g BIS

100 ml gacha distillangan suv solinadi;

10 g akrilamid

2,6 g BIS

100 ml gacha distillangan suv solinadi;

400 mg riboflavin

100 ml gacha distillangan suv solinadi;

40 g saharoza
 100 ml gacha distillangan suv solinadi;
 0,14 g ammoniy persulfat 100 ml gacha distillangan suv solinadi;
 6,0 g tris
 28,8g glitsin
 1000,0 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%-lisirkakislotasi solinadi.
 Ajratuvchi – quyultiruvchi eritma; 1000 ml 7%-li sirka kislotasi
 Ishqoriy oqsillar uchun
 A nordon eritma; 5,8 ml I N KON
 (rN 4,3) 17,2 ml toza sirka kislotasi
 4,0 ml TEMED
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 V nordon eritma; 48,0 ml I N KON
 (rN 7,8) 2,87 ml toza sirka kislotasi
 0,48 ml TEMED
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 S nordon eritma; 60 g akrilamid
 0,4 g BIS
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 E nordon eritma; 4 mg riboflavin
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 G' nordon eritma; 40 g saharoza
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 K nordon eritma; 0,28 g ammoniy persulfat
 100 ml gacha distillangan suvsolinadi.
 Elektrod buferi eritmasi 31,2 g β -alanin
 rNq4,5 ; 8,0 ml toza sirka kislota
 1000,0 ml gacha distillangan suv solinadi.
 Ishlatishdan avval 10 marta suyultirilishi lozim.
 Indikator — bo'yovchilari: 0,1 g metilen yashili
 100 ml gacha distillangan suv solinadi.
 Ajratuvchi — quyultiruvchi eritma va fiksirlovchi — bo'yovchi eritmalar ishqoriy oqsillar uchun berilganidek qilib tayyorlanadi.
 «K» eritmadan tashqari barcha eritmalarini muzlatkichda saqlash mumkin. «K» eritma bevosita ishlatishdan oldin tayyorlanadi.
 Ishning borishi: 1. Muzlatkichda saqlangan eritmalar xona haroratiga keltirildi.
 2. SHisha naychalar gelni polimerlash uchun mo'ljallangan shtativga o'rnatiladi.

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

1 hajm A eritma

2 hajm S eritma

1 hajm dist. suv

4 hajm K eritma

Vakuum 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%-li (rN 8,9), nordon muhit uchun 15%-li (rN 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 extiyotlik bilan shisha naycha devori orqali quyiladi, bunda monomer va distillangan suv ajralib ketmasligi kerak.

5. Polimerlanish 30 minut davom yetadi. Bu jarayon tugaganligini suv bilan monomer gel o'rtasida hosil bo'lgan aniq chegaradan bilish mumkin.

b. Asosiy eritmalardan quyultiruvchi gel monomeri tayyorlanadi. Buning uchun:

nordon oqsillar uchun ishqoriy oqsillar uchun

1 hajm V eritma V eritma

2 hajm D eritma G' eritma

1 hajm E eritma S eritma

4 hajm G' 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. SHisha naychalar joylangan shtativ 260 — 500 Vt-li ultrabinafsha lampasi ostiga qo'yiladi. Riboflavin ishtirokida boradigan fotopolimerlanish jarayoni 15 — 20 minut davom yetadi. Polimerlanish jarayoni tugaganligani 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'ozyordamida 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 saharoza eritmasida eritiladi.

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

12. Pastki idishga — 4° S gacha sovutilgan bufer eritma solib, yuqori va pastki idishlar birlashtiriladi. YUqoridagi idishga ham extiyotlik bilan sovuq bufer va 1—2 ml indikator bo'yog'i qo'shiladi. Asbob muzlatkichga o'rnatiladi va polyarligi bo'yicha tok manbaiga ulanadi. Dastlabki yarim soatda har bir shisha naychaga 2 mA-dan tok kuchi berilishi kerak. Bu vaqtda elektrokimyoviy konsentrlanish jarayoni boradi, agar birdaniga katta tok kuchi berilsa issiqlik ta'sirida

broun harakati kuchayib, oqsil bufer eritmaga chiqib ketishi mumkin. Oqsil molekulalari konsentrllovchi geldan o'tib ajratuvchi gel chegarasi etib kelganda, tok kuchi har bir naycha uchun 5 mAgacha oshiriladi.

13. Elektroforez tugaganligini indikator bo'yog'i shisha naychaning pastki chegarasiga etib kelganidan bilish mumkin.

14. Elektroforez tugagach shisha naychalar asbobdan chiqarib olinadi.

15. Naychadan gelni ajratib olish uchun suv to'lg'azilgan shpritsdan foydalaniladi. Buning uchun naycha va gel orasiga shprits ninasini spiralsimon yo'nalishda aylantirib suv yuboriladi. SHunda gel asta tashqariga chiqadi.

16. Gel fiksirlovchi bo'yoqda I soat ushlanadi.

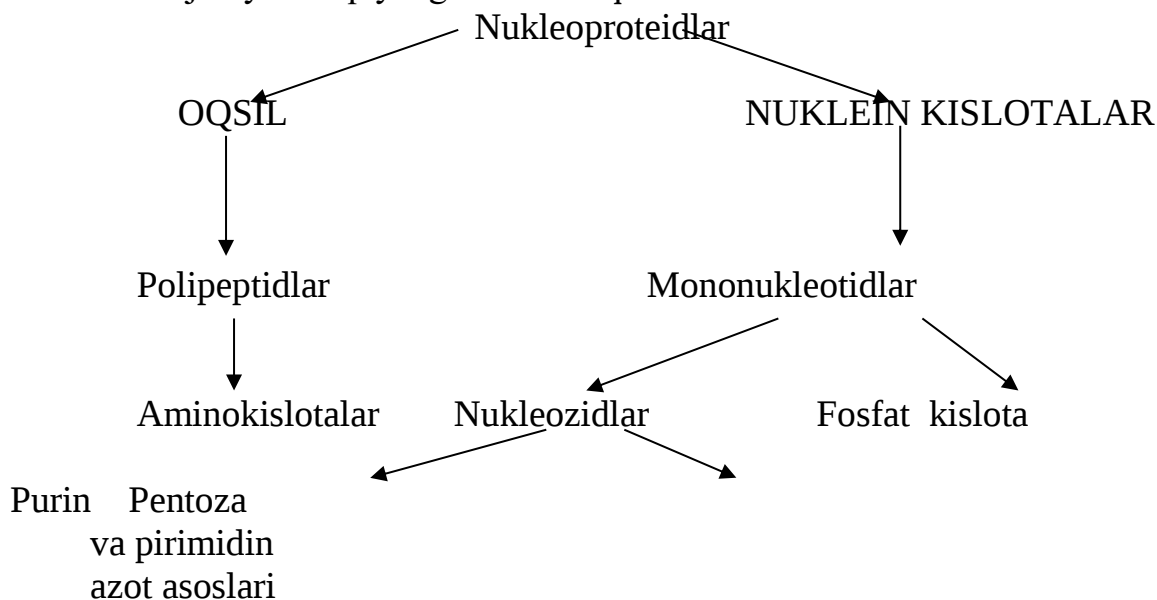
17. Bo'yalgan gel bir necha marta distillangan suv bilan chayqaladi va ajratuvchi eritmaga solinadi. Bu jarayon geldan ajratuvchi eritmaga bo'yoq chiqmaydigan bo'lguncha davom ettiriladi. YUvish jarayoni tugaganligini gelniig oqsilli fraksiyalari bo'yolib, oqsil bo'lmagan qismining rangsizlannishidan bilish mumkin.

18. 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.

27 – laboratoriya mashg'uloti

Nukleoproteidlar gidrolizi va gidroliz mahsulotlarini aniqlash

Nukleoproteidlar gidrolizi suyultirilgan sulfat kislota bilan qaynatilganda sodir bo'ladi. Bu jarayonni quydagi sxema orqali tasvirlash mumkin:



Reaktiv va materiallar: 1) nukleoproteidlar cho'kmasi (avvalgi ishga qaralsin); 2) 5% sulfat kislota eritmasi; 3) konsentrlangan sulfat kislota; 4) 10% o'yuvchi natriy eritmasi; 5) konsentirlangan ammiak (20-25%); 6) 1% mis sulfat; 6) 1% timolning spirtli eritmasi 7) kumush oksidining ammiakli eritmasi: 1-2% li kumush nitrat eritmasiga xosil bo'lgan cho'kma eriguncha konsentrlangan ammiak eritmasi qo'shiladi; 8) molibden reaktivi: 3,75 g ammoniy molibdatini 50 ml suvda eritiladi va

unga 32% nitrat kislota 50ml qo'shiladi ($R_o=1,2$). Tuzning to'liq erishi azot kislota qo'shilgandan keyin sodir bo'ladi.

Nukleoproteidlar cho'kmasi dumaloqtagli kolbaga solinadi, 5% sulfat kislota bilan yuviladi. Hammasi bo'lib 20-25ml eritma sarflanadi. Kolbani og'zini probka bilan yopib teskiri muzlatgichga ulab, astbestli setkagaustiga qo'yib past olovda qaynatiladi. Qaynatish 1-1,5 soat davom yetadi. So'ng olingan gidrolizat sovutiladi va qog'oz filtrdan filtrlab olinadi. Olingan filtrat bilan peptid bog'lariga, purin asoslariga, pentozaga va fosfor kislotasiga hos bo'lgan sifat reaksiyalari bajariladi.

Ilova: Nukleoproteidlarni proteolitik pachalanishini ularning achitqidan ajratmagan holda ham o'tkazish mumkin. Buning uchun 1 g quruq achitqini dumaloq tagli kolbaga solib unga 30-40 ml 5% li sulfat kislota solinadi. Kolbani havo muzlatgichiga ulangan probka bilan yopamiz va past olovda 1-1,5 soat qaynatamiz. So'ng kolbani sovutib gidrolizatni filtrlaymiz.

28 – laboratoriya mashg'uloti

Nukleoproteidlar gidroliz maxsulotlarini aniqlash

Polipeptidlarni aniqlash. Filtratni bir qismi bilan (1-2 ml) biuret reaksiyasi o'tkaziladi (2 ml o'yuvchi natriy va 1-2 tomchi mis sulfat qo'shiladi).

Purin asoslarini aniqlash. 2 ml filtratga konsentrlangan ammiak lakmus qog'ozini ishqoriy reaksiya ko'rsatguncha qo'shiladi va unga 1ml ammiakli kumush oksidi qo'shiladi. Bir necha daqiqadan so'ng purin asoslarining kumush tuzlari cho'kmaga tushadi.

Pentozalarni aniqlash asosida pentozalarning timol va konsentrlangan sulfat kislota bilan reaksiyaga kirishishi yotadi. Sulfat kislota pentozalarning degradatsiyasiga va furfurol hosil bo'lishiga olib keladi. Furfurol timol bilan birgalikda qizil rangli birikma (kondensat maxsuloti) hosil qiladi.

1 ml filtratga 2-3 tomchi 1% timolni spirtidagi eritmasini qo'shamiz, keyin extiyotkorlik bilan probirka devoridan 1 ml konsentrlangan sulfat kislotani quyamiz. Suyuqligimizda qizil rang xosil bo'ladi.

Fosfor kislotasini aniqlash molibden reaktivi bilan sariq kristalik ammoniyning fosforli molibden oksidi cho'kmasini hosil qilishga asoslangan:



1-2 ml filtratga teng hajmda molibden reaktivi qo'shib, 2-3 daqiqa qaynatiladi. Natijada ammoniyning sarig' rangli fosforli molibden oksidi hosil bo'ladi. Bu birikma uzoq vaqt turganda cho'kmaga tushadi.

29 – laboratoriya mashg'uloti

Nuklein kislotalarning gel-elektroforezi

Reaktivlar: 3,8% li natriy sitrat, DNK ajratish uchun Diatom™ DNA Prep 200 reagentlar to'plami («Izogen laboratoriyasi»), PZR o'tkazish uchun GenePak™ 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, dN₂O.

Asbob va jihozlar

1. PZR- amplifikator– Applied Biosystems 9700;
2. Real vaqtdagi(Real-time PCR) PZR-amplifikator– Applied Biosystems 7500, AQSH
2. Transillyuminator– WiseDoc, Koro'ya;
3. Sentrifuga– Eppendorf 5417C, Germaniya;
4. Vorteks –FLV-2400N, Combi-Spin, BIOSAN;
5. Elektroforez uskunalari– helicon;
6. Energiya manbai– Elf-4, DNK-texnologiya, Rossiya;
7. Elektqon tarozi– Denver INSTRUMENT, APX-203;
8. Ditsillyator– Thermo scientific, AQSH;
9. Eppendorf probirkalari 1 ml, 0,2 ml;
10. Mikroto'lqinli pech;
11. Mikropipetkalar – Labpette;
12. Sovutgich va muzlatgich – 4 °C, - 20 °C li;
13. Termostat – Termit, DNK-texnologiya;
14. Kimyoviy idishlar.

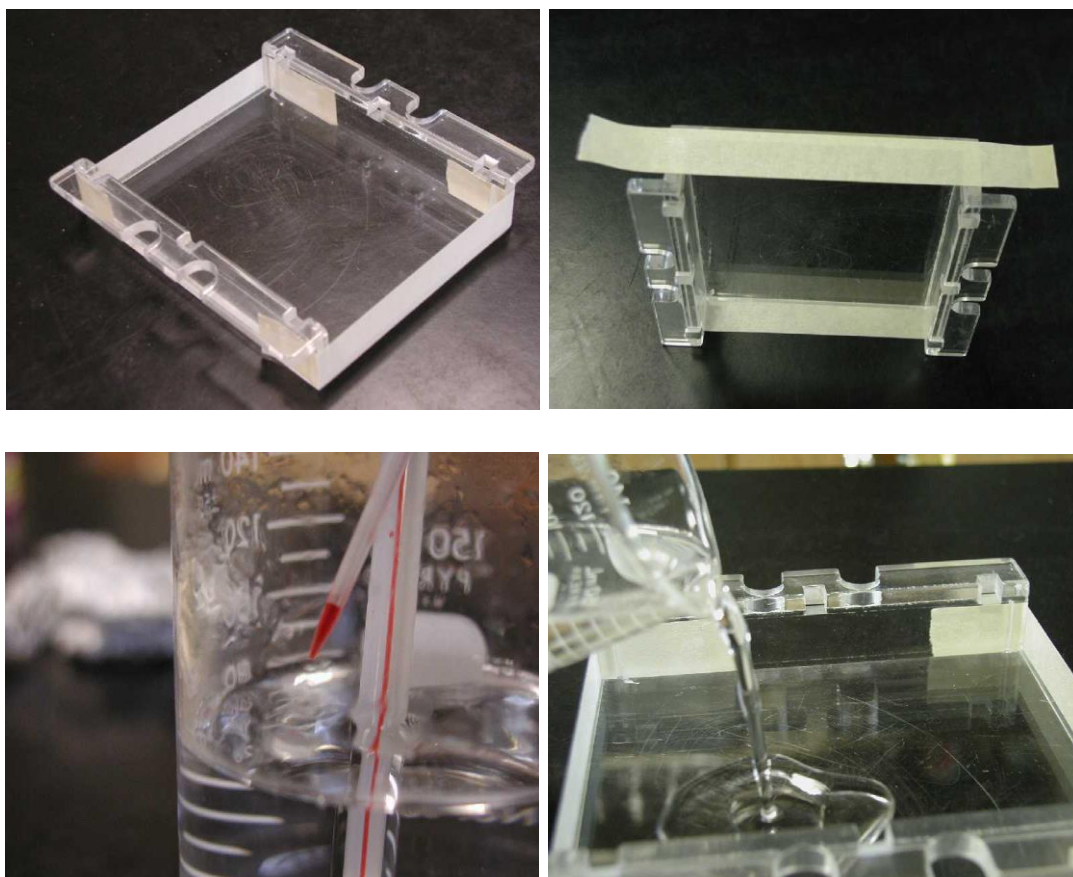
DNK ajratish uslubi

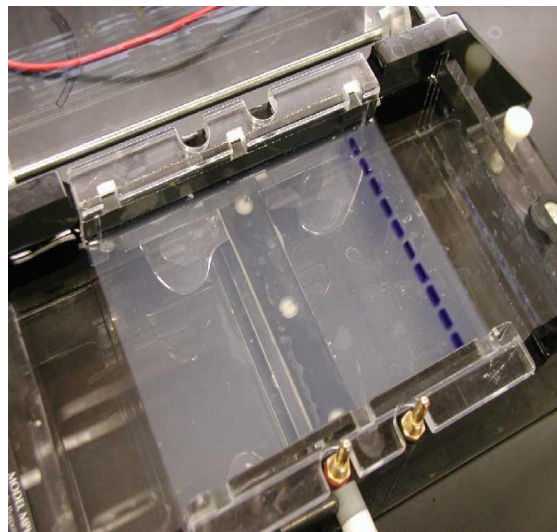
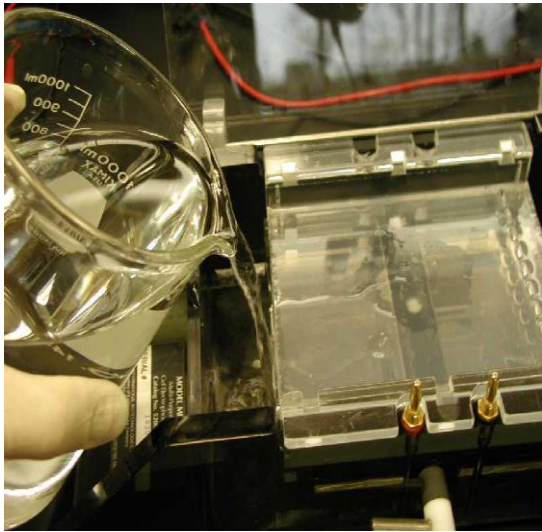
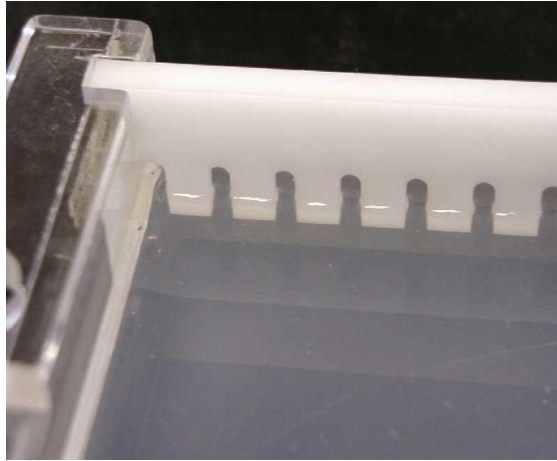
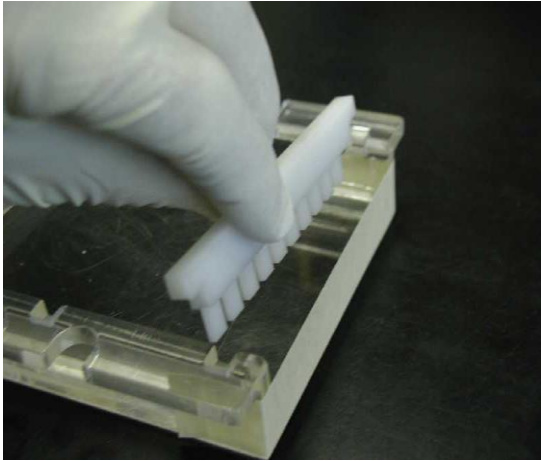
TBGP kasalligining klinik belgilari namoyon bo'lgan 20 ta bemorlardan 1 ml dan qon olindi va 100 mkl dan natriy atsetat (antikoagulyant) solingan probirkalarga qo'shildi. qondan DNK ajratish DiatomTM DNA Prep 200 reagentlar to'plami yordamida amalga oshirildi.

DiatomTM DNA Prep 200 reagentlar to'plami yordamida DNK ajratish metodikasi quyidagicha:

1. Ishchi eritma sifatida tuzli bufer tayyorlandi. 10 karrali tuzli buferdan flakonga 1 ml solindi va o'lchamli silindrga o'tkazilib, 10 ml gacha biditsillangan suv qo'shildi. Uni ustiga 96% li etil spirtidan silindrning 30 ml ko'rsatkichigacha quyildi va aralashtirildi. Tayyor ishchi eritma – tuzli buferni 40C haroratda germetik yopiq holatda saqlanadi.
2. 1,5 ml hajmli Eppendorf probirkaga 200 mkl o'rganilayotgan ob'ektdan solindi, uni ustiga Lizis reagentidan 800 mkl qo'shildi va probirkalarni 5-10 marta ag'darib to'ntarildi. Intensiv silkitib aralashtirish tavsiya qilinmaydi.
3. Termostatga 650C ga 5-7 minutga qo'yildi.
4. So'ngra probirkalarga NucleotsM sorbentdan 20 mkl qo'shildi va vorteksda gomogen sistema hosil bo'lgancha aralashtirildi.
5. 10 min davomida qo'lda aralashtirildi.
6. 15 sek 5000 ayl/minsentrifugaga qo'yildi.
7. CHo'kmani qoldirib, ehtiyotlik bilan supernatant to'kib tashlandi.
8. CHo'kma ustiga Lizis reagentidan 400 mkl qo'shildi va uni gomogen sistema hosil bo'lgancha vorteksda aralashtirildi.

9. Probirkalarga tuzli buferning ishchi eritmasidan 1 ml quyildi.
 10. Probirkani 5-10 marta qo'lda ag'darib to'ntarildi.
 11. 15 sek 5000 ayl/min sentrifugaga qo'yildi.
 12. Ehtiyotlik bilan cho'kmani qoldirib, supernatant to'kib tashlandi.
 13. Probirkalarga tuzli buferni ishchi eritmasidan 1 ml quyilib, vorteksda gomogen sistema holiga keltirildi. 15 sek 5000 ayl/min sentrifugaga qo'yildi. Sentrifugadan olib supernatantni to'kilib, cho'kma qoldirildi.
 14. 13-ish takrorlandi.
 15. Cho'kmasi bor probirkalarni 650C ga termostatga cho'kma qurigancha qo'yildi.
 16. Probirkalarni termostatdan olib, ustiga 100 mkl EkstraGenETM qo'shildi.
 17. Gomogen sistemagacha 5-10 sek vorteksda aralashtirildi, 4-5 min termostatga qo'yildi.
 18. Yana bir bor sentrifugadan oldin vorteksda aralashtirildi.
 19. 1 min 10000 ayl/minutga sentrifugaga qo'yildi.
 20. DNK li supernatantni toza probirkaga olib, -200C haroratda saqlashga muzlatgichga qo'yildi.
- Ajratib olingan supernatantda DNK bor yoki yo'qligini tekshirish uchun 0,5xTBE buferda, 120 V da 30-60 min davomida gel-elektroforez o'tkazildi. Bunda 0,9% li agaroz gelidan foydalanildi.





30 – laboratoriya mashg`uloti

Polimeraza halqali (sepnaya) reaksiya (PZR) usuli bilan tanishish

Ajratilgan DNK PZR metodi yordamida aniqlanildi. CYP21geni bo'yicha PZRni o'tkazishda GenePakTM PZR Core liofilizatsiyalangan reagentlar to'plamidan (OOO "Laboratoriya IzoGen", Moskva, Rossiya) foydalanildi. Bu reagentlar to'plamiga quyidagilar kiradi:

- (+) control (musbat kontrol namuna);
- (-) control (manfiy kontrol namuna);
- MasterMix (MasterMiks): tarkibida liofilizatsiyalangan quruq, ingibirlangan holatdagi Taq-DNK-polimeraza, dezoksinukleotidtrifosfatlar va magniy xlorid, shuningdek, standart PZR amplifikatsiyani o'tkazish uchun ishlatiladigan optimallashtirilgan bufer sistemani tutadi;
- PZR Diluent (PZR erituvchi);
- PZR Oil (PZR uchun yog').

SHunday qilib, PZR amplifikatsiyasini GenePakTM PZR Core liofilizatsiyalangan 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 PZR 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 biditsillangan suv solindi.
6. Probirkalarni og'zini yopgan holda PZR-amplifikatoriga qo'yildi va tegishli amplifikatsiya dasturi tanlandi. Amplifikatsiya PZR- amplifikator (Applied Biosystems 9700) uskunasiida o'tkazildi.

CYP21genini amplifikatsiya qilish uchun ishlatilgan praymerlar:

Forward (U1-F) 5'-GAGTACCTTGGAGGGCCTGCT-3';

Reverse (F3-R) 3'-GCTACACTCCAGCGTCTGAGG-5'.

PZR-amplifikatsiyani o‘tkazishda quyidagi dastur yordamida olib borildi.
PZR-amplifikatsiyasini o‘tkazish dasturi

Bosqich	Harorat, °C	Vaqt, min	Sikl
Denaturatsiya	95.0	4:00	1
	94.0	0:20	45
Renaturatsiya	64.0	0:40	
Elongatsiya	72.0	3:00	
YAkunlovchi elongatsiya	72.0	5:00	1

Amplifikatsiya tugagandan so‘ng, hamma probirkalarni elektroforez xonasiga ko‘chirildi va 5-10 mkl PZR mahsuloti 1,2 % elektroforez usuli bilan aniqlandi.

Real vaqtdagi (Real-time PZR) PZR-amplifikatsiyasini o‘tkazish TBGP bilan assotsiatsiyalangan **CYP21** genida tez-tez uchrovchi mutatsiyalarni aniqlash uchun yangi DNK-diagnotsika sistemasi ishlab chiqarilgan bo‘lib, uning asosida Real vaqtdagi PZR-amplifikatsiya (Real-time Polymerase Chain Reaction) yotadi, tez-tez uchrovchi 8 ta mutatsiyalar uchun yangi allel-spetsifik praymer (qisqa oligonukleotid fragmentlari) va TaqMan zondi ishlatiladi. Avvaliga metod sun‘iy matritsada test qilib ko‘rilgan, bunda yo‘nalishli mutagenез yordamida analiz qilinuvchi mutatsiyaga kiritiladi va keyin giperandrojeniyaning klinik va bioximik belgilari namoyon bo‘lgan 20 ta bemorning klinik materiali bo‘lgan DNK da tekshirilgan va ulardan bittasida mutatsiya topildi: u nonsens (nukleotidlar ketma-ketligi almashishi natijasida aminokislotalar o‘zgarishidan yoki stop kodon paydo bo‘lishi natijasida yuzaga keladigan mutatsiya) – mutatsiya +318X bo‘lib, aminokislotalarning o‘rin almashishidan kelib chiqadigan mutatsiya hisoblanadi. SHunday qilib, **CYP21** genining PZR mahsulotlari real vaqtdagi PZR-amplifikatsiyada o‘tkazilib, natijada aniq natijalar olinadi.

Bu metod 5'-ekzonukleaza polimeraza faolligiga asoslangan. Reaktsion aralashmada muhim komponent hisoblangan DNK zondlar o‘zida 5' holatdagi fluoretssent bo‘yoq va 3' holatdagi fluoretssentsiyani o‘chiruvchi (masalan, FAM _TGATCGGGTGGAGTCCTGCC_BH1zondini oladigan bo‘lsak, bu erda FAM - fluoretssent bo‘yoq bo‘lsa, BH1 esa fluoretssentsiyani o‘chiruvchidir, ular orasida ma’lum bir nukleotidlar ketma-ketligi joylashgan) kabi qismlardan iborat hamda fosfat guruh 3' holatda joylashgan bo‘ladi. Bu zondlar amplifikatsiyalanayotgan sohada komplimentarlik asosida joylashadi. Fluoretssent o‘chiruvchi fluoretssent bo‘yoq tomonidan ajralayotgan yorug‘likni yutadi, fosfat guruhi esa 3' holatdagi polimerazani bloklaydi. Agar WT aralashmasi bo‘lgan namunada FAM flyuoretssent bo‘yog‘ini oshishi kuzatilsa C1994T mutatsiyasi namoyon bo‘lmaydi.

Geterozigota mutatsiyani mavjudligida esa bir vaqtning o‘zida Wild Type va Mutant aralashmalaridagi namunalarda flouressentsiya bo‘yoq – FAMni ko‘payishi

kuzatiladi. Faqat Mutant aralashmasidagi namunalarda flyuretssentsiya bo‘yoq – FAMni ko‘payishi esa gomozigota mutatsiyadan darak beradi.

21-gidroksilaza genidagi C1994T mutatsiyasini aniqlashda ishlatiladigan allel-spetsifik praymer va zondlar

Mutatsiya*	Praymer va zond nomlari**	Praymer va zondlar ketma-ketligi*** 5' $\Rightarrow$ 3'	Amplikon uzunligi j.n
C1994T	AW8-R	TTCGTGGTCTAGCTCCTCGTG	125
	AM8-R	GTTCGTGGTCTAGCTCCTCGTA	
	A8- F	ACTCAGGCTCACTGGGTTGCT	
	AP8	6FAMTGATCGGGTGGAGTCCTGCCBH1	

*Nukleotidlarni raqamlanishi initsirlovchi ATG kodonining birinchi nukleotididan boshlanadi.

**Allel spetsifik praymerlar, AW yovvoyi tip alleliga, AM mutant alleliga mos tushadi; F – to‘g‘ri , R – tekari praymer; AP – TaqMan zondi.

***Matritsani nokomplementar nukleotidi.

PZR jarayonida renaturatsiya bosqichida DNK zondi DNKning komplementar zanjiriga birikadi, qancha ko‘p amplifikatsiya mahsuloti hosil bo‘lsa, shuncha ko‘p zond molekulasi o‘ziga xos amplikonlar bilan birikadi. Elongatsiya bosqichida polimeraza komplementar DNK zanjirini sintezlaydi va zondga etganda 5'-ekzonukleaza faolligi yordamida uni parchalaydi. SHunday qilib, fluoretsent belgi va o‘chiruvchini ajralishi sodir bo‘lib, detektrlanayotgan yorug‘likni ko‘payishiga olib keladi. Ayonki, ayni vaqtda PZR davomida qanchalik ko‘p amplikonlar ishlab chiqarilsa shunchalik yorug‘lik intensiv bo‘ladi.

Real vaqtdagi PZR-amplifikatsiya uchun kerakli reagentlar to‘plami quyidagi funksiyalarni bajaradi: dd N₂O – erituvchi vazifasini bajarib, uning miqdori o‘zgarib turadi. PZR Buffer rN muhitni barqarorlashtirib turadi. dNTP–erkin dezoksinukleotidtrifosfatlar (dNTP - dATF, dSTF, dGTF, dTTF) bo‘lib, ular yangi DNK zanjiri uchun zarur. MgCl₂ – DNK zanjirini turg‘unligini ta‘minlab turadi. Praymer – com (F, R) – DNKning ikkinchi zanjirini sintezlaydi. Praymer – (angl. primer) – nishon DNK yoki RNKga komplementar bo‘lgan qisqa nuklein fragmenti (oligonukleotid) bo‘lib, DNK-polimeraza yordamida komplementar zanjirini sintezlash uchun “tomizg‘i” sifatida xizmat qiladi. ”Tomizg‘i” DNK-polimerazalar uchun yangi zanjirni praymerning 3'-uchidan (ONdan) sinto‘zini initsiatsiyasi uchun kerak. DNK-polimeraza praymerni 3'-uchiga matritsa zanjiriga komplementar bo‘lgan nukleotidlarni qo‘shadi. Bu praymerlar umumiy. Primer – Wt (Mut) – bitta probirkaga yoki Wild ture, yoki Mutant solinadi. Zond – Real vaqtdagi natijani olish uchun ahamiyatli va u flouressensiyani beradi .Har bir CUR21 geni mutatsiyalari uchun alohida zondlar ishlatiladi. Tak-polimeraza–DNK zanjiri sinto‘zini ta‘minlaydi.

Real vaqtdagi PZR-amplifikatsiya uchun quyidagi ketma-ketlikdagi ishlar qilinadi: avval 2 ta probirkalarga Matser mix Mutant va Matser mix Wild Ture reaksiya aralashmalarini tayyorlab olinadi. Matser mix Wild Ture yovvoyi tip (mutatsiya yoq) allelini aniqlash uchun qo‘llaniladi. Matser mix Mutant (mutatsiya

bor) esa mutant allelini aniqlash uchun qo'llaniladi. Mutant allel va yovvoyi tip allelini aniqlash uchun allel-spetsifik oligonukleotidli praymerlar va amplikonga mos keluvchi Taq-Man zondi ishlab chiqarilgan. Fluorofor sifatida 6-karboksifluoretsen (FAM) yoki karboksi-X-rodamin (ROX) ishlatiladi. Ikkala probirkaga ham com praymeri ishlatiladi. Buning uchun har ikki probirkalarga 7.4mkl dan dd N₂O solinadi, ustiga esa 10x PZR Buffer dan 1.5 mkl dan solinadi, keyin dNTF dan 1.5 mkl solinib, ustidan MgCl₂ dan ham 1.5 mkl miqdorda solinadi, yana Praymer com (Forward (A8_ACTCAGGCTCACTGGGTGCT) dan 0.6mkl solinadi, keyin esa Matser Mix WT probirkasi uchun praymer Wild Type AW8_R TTCGTGGTCTAGCTCCTC**GTG** praymeri ishlatilsa, Master Mix Mutant uchun esa AM8_R GTTCGTGGTCTAGCTCCTC**GTA** praymeri ishlatiladi. Bulardan mos ravishda 0.6mkl dan solinadi. Aniq natijaga erishish uchun esa zondan 0.6mkl solinadi. Taq- polimeraza fermentidan esa 0.1mkl miqdorda solinadi. Hosil bo'lgan umumiy miqdordan mos ravishda probirkalarga 13.8 mkl dan Matser mix Mutant va Matser mix WT lardan solib, utsiga esa 1.2 mkl dan PZR-mahsulotdan solinadi. Keyin esa Real vaqtdagi (Real-time PZR) PZR-amplifikatorga joylashtiramiz. Real vaqtdagi PZR-amplifikatsiyani o'tkazishda quyidagi datsur yordamida olib boriladi.

Real vaqtdagi PZR-amplifikatsiyasini o'tkazish datsuri

Bosqich	Harorat, °C	Vaqt, min	Sikl
Denaturatsiya	95.0	5:00	1
Renaturatsiya	66.0	0:50	40
Denaturatsiya	95.0	0:15	

Asosiy va qo'shimcha o'quv adabiyotlar hamda axborot manbalari

1. Valixonov M.N.. Biokimyo. Toshkent. Universitet, 2009.
2. Afonina S.N., Lebedeva E.N., Golinskaya L.V., Nikonorov A.A. Bioximiya vitaminov (uchebnoe posobie). GBOU VPO «Orenburgskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet», Orenburg, e-mail: lebedeva.e.n@mail.ru 2015.
3. V.P. Komov, V.I. Shvedova, Bioximiya. M., Drofa, 2008 y.
4. Mirziyoev SH.M. Buyuk kelajagimizni mard va olijanob xalqimiz bilan birga quramiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
5. Mirziyoev SH.M. Qonun ustuvorligi va inson manfaatlarini ta'minlash-yurt taraqqiyoti va xalq farovonligining garovi. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2017.
6. Mirziyoev SH.M. Erkin va farovon, demokratik O'zbekiston davlatini birgalikda barpo etamiz. Toshkent, O'zbekiston nashriyoti, 2016.
7. 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.
8. To'raqulov YO.H. Biokimyo. Toshkent. «O'zbekiston», 1996 y.
9. Knorre D.G., Mызina S.D. Biologicheskaya ximiya. Moskva. «Vysshaya shkola» 2000 y.

10. Berezov T. Biologicheskaya ximiya. M. 2000 y.
11. Kolman YA. Ryom K. Naglyadnaya bioximiya. M., 2000 y.
12. Severin E.S. Bioximiya. M., GEOTAR-MED, 2004 y.
13. Nelson D., Koks M. Основы bioximii Lenindjera: v 3 t./M., BINOM.Laboratoriya znaniy, 2011 y.
14. Morozkina T.S., Moyseyonok A.G. Витамины. Kratkoe rukovodstvo dlya vrachey i studentov meditsinskix, farmatsevticheskix i biologicheskix spetsialnostey. Minsk, "ASAR", 2002 y.
15. Igamnazarov R.P., Abdullaeva M.M., Umarova G.B.. Biokimyoviy tadqiqot uslublari. Toshkent. 2003 y.
16. Oliy ta'lim jarayonida zamonaviy pedagogik texnologiya asosida o'quv faoliyatini tashkil etish uslub va vositalari. Toshkent Davlat Texnika universiteti. Toshkent. 2007 yil.

MUNDARIJA

BIOKIMYO QISM

Лаборатория машғулотилари техникаси билан таништириш	4
Эритмалар классификацияси ва уларни тайёрлаш	5
Оқсил ва аминокислоталарнинг ранг ҳосил қилиш реакциялари	10
Оқсилларни чўктириш реакциялари	14
Оқсилларни диализ қилиш ва изоэлектрик нуқтасини аниқлаш	18
Оқсил миқдорини биурет усули бўйича аниқлаш	20
Ферментларнинг юқори температура таъсирида инактивацияси	20
Ферментларнинг спецификлиги	21
Сўлакдаги амилаза ферментининг активлигига рН-нинг таъсири	22
Моносахаридларга хос сифат реакциялари	23
Дисахаридларга хос реакциялар	27
Полисахаридларга хос реакциялар	28
Қондаги глюкоза миқдорини Хагедерон - Иенсен усули бўйича аниқлаш	29
Липидларга хос рангли реакциялар	31
Сувда эрийдиган витаминларга хос сифат реакциялари	34
Ёғда эрийдиган витаминларга хос сифат реакциялари	38

MOLEKULAR BIOLOGIYA QISM

Тухум оксидан альбуминни кристалл ҳолда ажратиш	44
Қонда гликопротеидларни аниқлаш	44
Мускул тўқимасидан оқсил фракцияларини ажратиш	45
Буғдой унидан оқсилларни ажратиш ва улар таркибини ўрганиш	46
Мураккаб оқсиллар таркибини ўрганиш.	52
Ачитқидан нуклеопротеидларни ажратиш. Ловиядан нуклеопротеидларни ажратиш. ДНКни пиёздан ажратиш	53
Жигардан нуклеопротеидларни ажратиш. ДНКни буккал эпителийдан ажратиш	54
Оқсилларнинг гель-электрофорези	56
Нуклеопротеидлар гидролизи ва гидролиз маҳсулотларини аниқлаш	61
Нуклеин кислоталарнинг гель-электрофорези	62
ПЦР усули билан танишиш	65