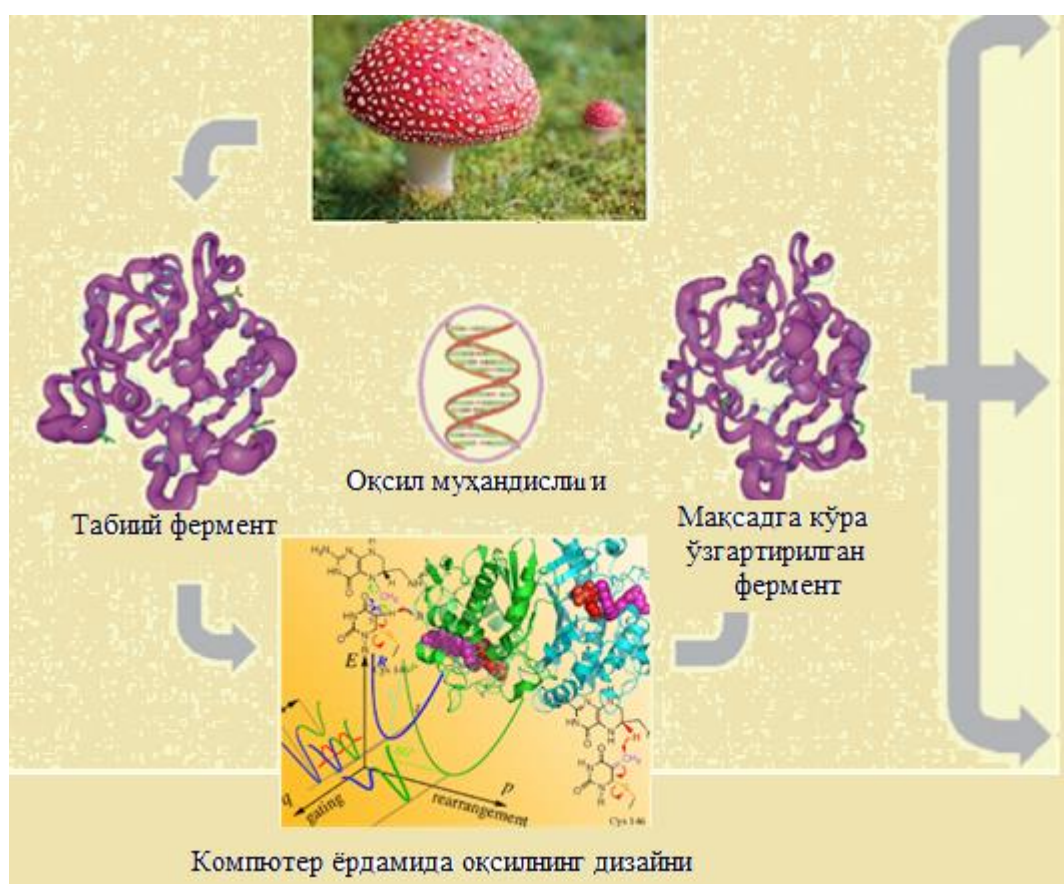


**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

С.С.Муродова

ОҚСИЛЛАР ВА ФЕРМЕНТЛАР МУҲАНДИСЛИГИ



<https://sites.google.com/site/enzproyh/home>

Тошкент 2021

Мазкур ўқув қўлланма Қишлоқ хўжалик олий ўқув юртининг 5410200 – Агробιοтехнология ва 5320500 Биотехнология (тармоқлар бўйича) йўналишлари талабалари учун мўлжалланган

(Аннотация)

Ўқув қўлланма Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлигининг олий ўқув юртлири учун Давлат таълим стандартлари ва ўқув дастурларига мос ёзилган. Мазкур қўлланма Давлат тилида биринчи бор яратилган бўлиб, талабаларга ушбу фандан амалий ва назарий билимларини мустақил ўзлаштиришига тўлиқ имконият яратиб беради.

Қўлланмада оқсил ва ферментлар муҳандислигидаги асосий тушунчалар, оқсил ва ферментлардан фойдаланиш, оқсил ва ферментларни ажратиш усуллари, улар асосида метаболитик хусусиятлари кучайтирилган организмлар олишнинг замонавий технологиялари ҳақида ҳамда биотехнологик жараёнларда оқсил ва ферментлардан фойдаланиш каби масалалар ёритилган. Бундан ташқари олинган билимларни мустаҳкамлаш учун назорат саволлари ва баъзи таянч иборалар изоҳи келтирилган.

Тақризчилар:

Алимова Р.А – Қишлоқ хўжалигида экологик хавфсизлик
ва ботаника кафедраси доценти, биология фанлари
номзоди

Р.М.Артикова – Тошкент фармацевтика институти Биотехнология -
кафедраси доценти, биология фанлари номзоди

МУНДАРИЖА

Оқсил ва ферментлар муҳандислигига кириш	9
§1. Оқсилларни ажратиш усуллари (умумий тушунчалар)	12
§2. Оқсилларни полиакриамид гел электрофорезида ажратиш	19
§3. Оқсилларнинг спектрини ўрганиш.....	23
§4. Тасодифий мутагенез усули.....	26
§5. Йўналтирилган мутация усули	30
§6. Ферментларни ажратиб олиш (флуоресцент оқсиллар мисолида).....	
Флуоресцент таҳлил.....	48
§7. Ферментларнинг фаоллигини аниқлаш усуллари.....	51
§8. Оқсилларнинг концентрациясини биурет реакциясида аниқлаш	55
§9. Оқсилларни аниқлашнинг лоури усули	57
§10. Кумасси ёрдамида оқсил концентрациясини аниқлаш	59
(Брадфорд усули).....	59
§11. Оқсиллар концентрациясини эритманинг ютишига кўра аниқлаш	60
§12. Оқсилларни ажратишнинг преципитация усули	62
§13. Оқсилларни аниқлашнинг нингидринли усули	66
§14. Оқсилларни ажратиб олишнинг диализ усули.....	68
§15. Оқсилларнинг концентрациясини 2-нафтол-1-карбоксиальдегиддан фойдаланиш орқали аниқлаш.....	75
§16. Оқсилларни бромциан билан фаоллаштирилган агароза билан боғлаш.	76
§17. Ферментлар миқдорини аниқлаш.....	78
Картошканинг каталаза фаоллигини аниқлаш	83
§18. Ферментларни нейлон шарикларга микрокапсулалаш	85
нейлон коптокчалар микрокапсуляциялаш.....	85
§19. Ферментларни полиакриламид гелга киритиш.....	88
§20. Порасиз шиша юзасига ферментларнинг ковалент иммобилизацияси ...	90
§1. Амалий машғулот. Янги оқсилларни лойиҳалаш. Компьютерда визуализация қилиш усули	93
§2. Амалий машғулот. Оқсил муҳандислигида гомологларни моделлаштириш ва биоинформацион ёндашувлар	114
§3. Амалий машғулот. Ички молекуляр ва молекулараро ўзаро муносабатларни таҳлил қилиш ва ҳисоблаш усули	125
§4 Амалий машғулот. Оқсил муҳандислиги учун қидирув алгоритмларини тузиш	134
§5. Амалий машғулот: Оқсилларнинг табиий хусусиятларини оқсилларнинг табиий хусусиятларини ҳисоблаш усулларида моделлаштириш	141
§6. Амалий машғулот. Оқсилларни компьютерда дизайнерлаш усули	164

(Аннотация)

Учебное пособие написано в соответствии с Государственными образовательными стандартами и учебными планами вузов Министерства высшего и среднего специального образования Республики Узбекистан. Данное пособие создано впервые на государственном языке и дает студентам полную возможность самостоятельно осваивать практические и теоретические знания по данному направлению.

В учебной пособии приводятся основные понятия в белковой и ферментной инженерии, использовании белковых ферментов, методы разделения белков и ферментов, современных технологиях получения организмов с улучшенными метаболическими свойствами, использование белков и ферментов в биотехнологических процессах. Кроме того, для закрепления полученных знаний предоставляются контрольные вопросы и объяснения некоторых основных фраз.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение. Общие методы извлечения белков, используемых в белковой и ферментной инженерии	9
§1. Разделение белков электрофорезом в полиакриламидном геле.....	12
§2. Изучение спектра белков.....	19
§3. Метод случайного мутагенеза в белковой и ферментной инженерии	23
§4. Метод случайного мутагенеза в белковой и ферментной инженерии	26
§5. Метод направленной мутации в белковой и ферментной инженерии	30
§6. Выделение ферментов (на примере флуоресцентных белков). Флуоресцентный анализ	48
§7. Методы определения ферментативной активности	51
§8. Биуретовая реакция определение концентрации белка.....	55
§9. Метод Лоури для определения белков.....	57
§10. Определение концентрации белка с помощью Кумасси Определение концентрации белка с помощью Кумасси (метод Брайфорта).....	59
§11. Определение концентрации белка по абсорбции раствора	60
§12. Метод преципитации разделения белков	62
§13. Нингидриновый метод определения белков	66
§14. Метод диализа разделения белков.	68
§15. Определение концентрации белка с использованием 2-нафтол-1- карбоксихальдегида	75
§16. Связывание белков с бромциан-активированной агарозой.....	76
§17. Методы определения активности ферментов	78
§18. Микрокапсулирование ферментов в нейлоновые шарики.	85
§19. Введение ферментов в полиакриламидный гель.....	88
§20. Ковалентная иммобилизация ферментов на поверхности пористого стекла.	90
§1. Практические занятия Компьютерная визуализация, моделирование гомологов и биоинформационные подходы в белковой инженерии.	93
§2. Практическое занятие моделирование гомологов в белковой инженерии и биоинформатические подходы	114
§3. Практическое занятие. Расчет и анализ участков внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий.	125
§4. Практическое занятие. Поисковые алгоритмы в расчетной белковой инженерии.	134
§5. Практическое занятие. Моделирование естественных свойств белков в расчетных методах.....	141
§6. Практическое занятие. Компьютерное проектирование белков.	164

Қисқартирилган атамалар

БЗА - Буқа зардобы альбумини

Лиганд - (лот. Лигаре-дан "боғлаш" дан) - донор-акцептор ўзаро таъсири орқали бошқа атом (акцептор) билан боғланган атом, ион ёки молекула. Ушбу тушунча бир ёки бир нечта марказий (комплес ҳосил қилувчи) металл атомларига бириктирилган зарраларни билдириб, мураккаб бирикмалар кимёсида қўлланилади.

ИЭН – изоэлектрик нуқта

ϵ -Ютилиш коэффиценти

A -Ёруғликни ютилиши

A, B, C -Специфик лигандлар (масалан, субстратлар)

BARNA N-Бензоил-L-аргинин-п-нитроанилид

BСА- Бицинхонин кислотаси

E- Фермент

E -Электроҳаракатлантирувчи куч

F- Фарадей константаси

h -Доимийлик планкаси

I - Ёруғлик нури интенсивлиги

k -Тезлик константаси

k_{cat} -Каталитик константа

K_d -Диссоциация константаси

KM- Михаэлис константаси

M_r -Нисбий молекуляр масса

P, Q, R - Реакция маҳсулотлари

PMSF -Фенилметилсульфонильфторид

PN -микроорганизмлар маҳсулдорлиги

R -Универсал газ доимийси

S -Субстрат

SMCC- (4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоновол кислотанинг N-гидроксисукцинимидли эфири

SUPHERA- N-Сукцинил-L-фенилаланин-п-нитроанилид
TES N-Трис[гидроксиметил] метил-2-аминометан-сульфон кислотаси
TLCK L-1-Хлор-3-(4-тозиламидо) 7-амино-2-гептанон
TPCK L-1-Хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон
V_{max} - Максимал тезлик
АБТС - 2,2-Азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфон кислотаси
АДГ - Алкогольдегидрогеназа
АНС - 1-Анилинонафталин-8-сульфонат
АсАТ- Аспартатаминотрансфераза
Г6ФДГ - Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГАФДГ - Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
ГДГ - Глутаматдегидрогеназа
ГО - Глюкозооксидаза
ДМСО - Диметилсульфоксид
ДТТ - 1,4-Дитио-L-трейтол (Клеланд реагенти)
ДХФИФ - 2,6-Дихлорфенолиндифенол
ИФА - Иммунофермент анализ
КДИ - Карбонилдидиимидазол
КоА - Кофермент А
ЛАП - Лейцинаминопептидаза
ЛДГ - Лактатдегидрогеназа
МБС – 3 - Малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид
МДГ - Малатдегидрогеназа
ХБ - Халқаро бирликлар (фермент фаоллигининг)
НАД - Никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ - Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ОГДГК - α -Оксоглутаратдегидрогеназа комплекси
НФГ - о-Нитрофенил- β -D-галактопиранозид
ПААГ - Полиакриламид гели
ПДГК - Пируватдегидрогеназа комплекси

ПК - Пируваткиназа
ПО - Пероксидаза
РИА - Радиоиммуноанализ
ТДФ - Тиаминдифосфат
Трис - Трис(гидроксиметил)аминометан
ТХУ (ТХС) - Трихлорсирка кислотаси
ФГК – 3 - Фосфоглицераткиназа
ФМН - Флавинмононуклеотид
ФТБ - Фосфат-тузли буфер
ФТА - Фосфотрансацетилаза
ЦС - Цитратсинтаза
ЭГТА - Этиленгликоль-бис- β -аминоэтилэфир)-N,N,N,N-тетраацетат
ЭДТА - Этилендиаминтетраацетат

ОҚСИЛЛАР ВА ФЕРМЕНТЛАР МУҲАНДИСЛИГИГА

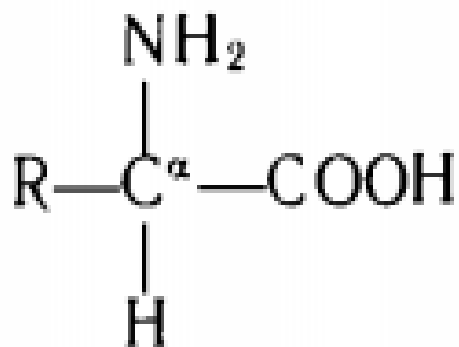
КИРИШ

Оқсил муҳандислиги ва ферментлар муҳандислиги - фойдали ёки қимматли оқсиллар, ферментларни ишлаб чиқаришда иштирок этадиган биотехнология бўлими. Бу нисбатан янги фан бўлиб, у оқсил ва ферментларни конструкция қилиш ва оқсил ва ферментларга ўзгартириш киритиш ўзгартириш ва яратиш тамойилларини ўрганишга қаратилган.

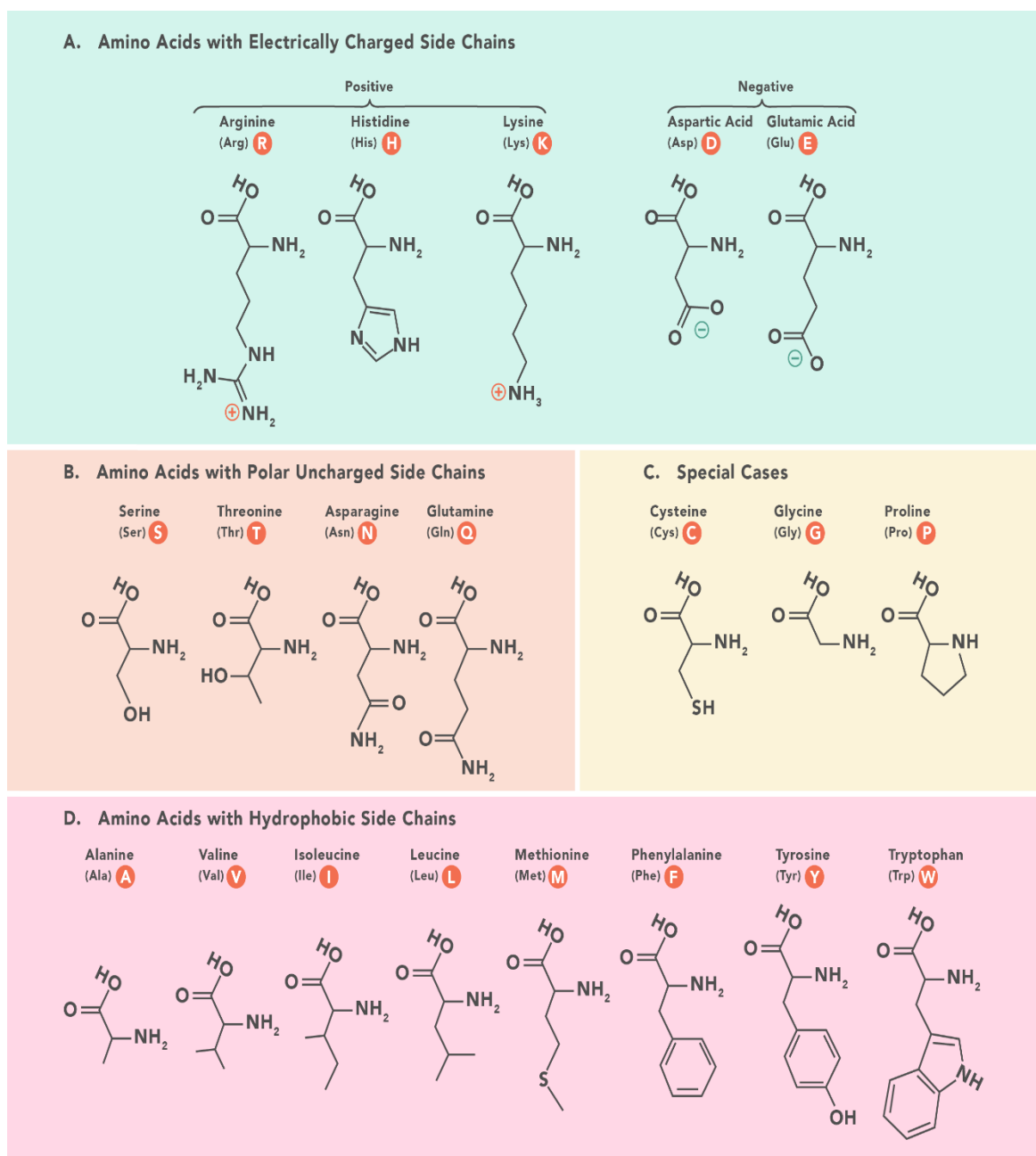
Тухум оқига ўхшаш, таркибида азот тутувчи шу хилдаги моддаларни голланд олими Мульдер (1802— 1880) мунтазам равишда тадқиқ қилган, ўша замоннинг машҳур химики Берцелиуснинг (1779-1848) таклифига кўра, биринчи марта 1838 йили бу моддаларга нисбатан **п р о т е и н** (юнонча — протос — биринчи даражали демак) номи қўлланилди, бу атама уларнинг ҳаёт учун жуда муҳим аҳамиятга эга эканлигини ифодалайди.

Оқсил номи тухум оқи сўзидан келиб чиққан содда атама. Биохимия адабиётида протеин ва оқсил атамалари бир хил маънода (синонимлар сифатида) ишлатилади. Оқсиллар ҳақида XIX асрнинг иккинчи ярмида ва XX асрнинг биринчи чорагида олинган маълумотлар, асосан, гидролиз қилиш йўли билан улар таркибига кирадиган аминокислоталарни аниқлаш ва сўнгра оқсил таркибида **п-пептид** шаклида боғланишини белгилаш билан чегараланади.

- ✓ Оқсиллар макромолекулалар бўлиб, уларнинг молекуласиси бир неча мингдан бир неча млн. га тенг.
- ✓ Оқсил молекуласининг қурилиш ашёси сифатида **α-аминокислоталар** хизмат қилади, **α-амнокислотанинг** бир карбон атомига (**α-углерод атоми**) аминогуруҳ ва карбоксил гуруҳ бирикади (1-расм).
- ✓ Оқсилларда 20 та **α-аминокислота** учрайди, улар бир-биридан **R-гуруҳи** билан фарқ қилади, у **гирофил** ёки **гидрофоб**, асосли, кислотали ёки **нейтрал** бўлиши мумкин (2-расм).

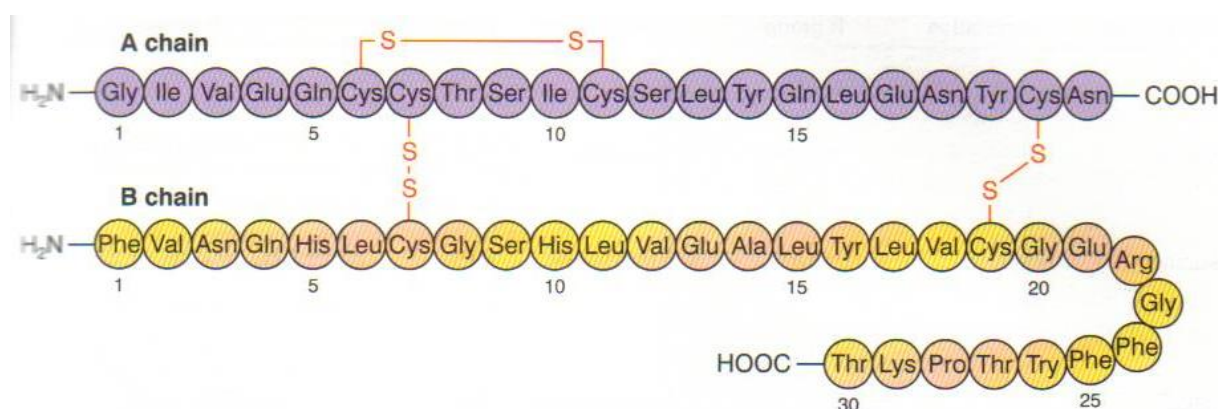


1- расм. Аминокислотанинг структураси



2-расм. Оксил таркибини ташкил этадиган аминокислоталар.

Протеинлардаги аминокислоталар бир-бири билан пептид боғлари, яъни амид боғлари билан бириккан, бу боғ бир аминокислота α -карбоксил қолдиғининг иккинчи аминокислота α -аминогурӯҳли қолдиғи билан боғланиши ҳисобига ҳосил бўлади. Шу кўринишда тузилган полимерлар пептидлар деб аталади, ди-, три-, тетра ва ҳ. к. деб номланган олд кўшимчалар, молекула таркибидаги аминокислота қолдиқлари сонига боғлиқ, масалан, дипептидда 2 та қолдиқ, трипептидда – учта қолдиқ ва бошқа(лар). Унча катта бўлмаган аминопептидлардан фарқли ўлароқ, полипептидлар 20 ёки ундан ортиқ (оқсил табиатига кўра, тахм. 50 тадан 2500 тагача) аминокислота қолдиқлари тутади (3-расм).



3-расм. Оқсилларнинг бирламчи тузилиши.

Оқсил ва ферментлар муҳандислигининг иккита асосий стратегияси мавжуд: йўналтирилган оқсил модификацияси ва йўналтирилган эволюция.

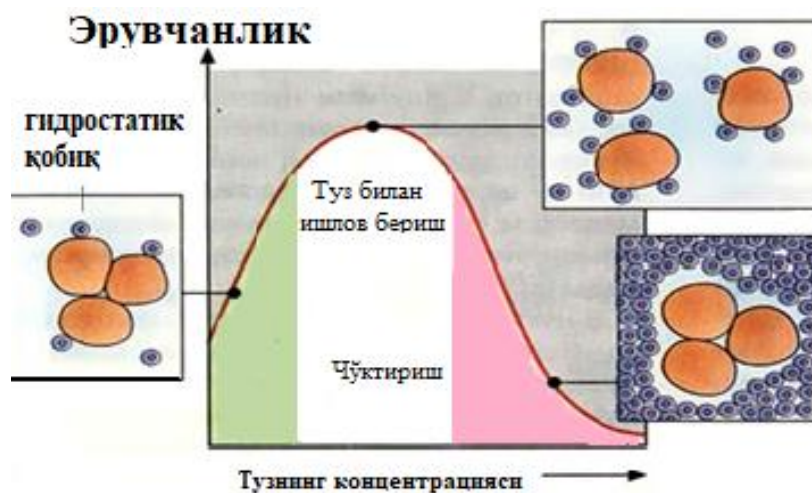
Ушбу усуллар бир-бирига мутлақо бир биридан фарқ қилади; Тадқиқотчилар кўпинча иккаласини ишлатадилар. Келажакда оқсилларнинг тузилиши ва функциялари ҳақида олинган батафсил маълумотлар, шунингдек, юқори технологиялардаги ютуқлар оқсил муҳандислиги имкониятларини сезиларли даражада кенгайтириши мумкин. Натижада генетик код асосида янги аминокислоталарни киритишга имкон берадиган янги усул орқали ҳатто табиий бўлмаган аминокислоталар ҳам киритилиши мумкин. Оқсиллар устида турли муолажалар ўтказишдан олдин биз уларни ажратиб олиш, таҳлил қилиш, ўлчами, молекуляр оғирликларини аниқлаш ва

компьютерда моделлаштириш каби усулларни билишимиз талаб этилади. Сизга такдим этилган ушбу қўлланмада уларнинг баъзилари тўғрисида маълумотлар келтирилган.

§ 1. ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИШ УСУЛЛАРИ (УМУМИЙ ТУШУНЧАЛАР)

Табиий оқсилларни (фазовий тузилишини ўзгартирмасдан) биологик эритмадан ажратиш учун қуйидаги усуллар қўлланилади:

1. Тузлар билан ишлов бериб чўктириш: ишқор ва ишқорий ер металлари (натрий хлорид, магний сульфат), аммоний сульфат билан чўктириш; бунда оқсилнинг бирламчи тузилиши бузилмайди;
2. Чўктиришда: сувсизлантирувчи моддаларни: спирт ёки ацетоннинг паст ҳароратларда (тахминан -20°C) чўктириши.



4-расм. Оқсилларни туз эритмаси ёрдамида чўктири усули.

Ушбу усуллардан фойдаланганда оқсиллар гидратланиш қобиғидан маҳрум бўлиб, эритмада чўкади.

Денатурация - бу оқсилларнинг фазовий тузилишини бузиш (молекуланинг бирламчи тузилиши сақланиб қолади). Денатурация натижасида оқсилнинг структураси қайта тикланиши мумкин – ренатурация (оқсил таркибидан денатурация агенти олиб ташланганидан кейин у қайта тикланади) ёки қайтмас реакция (молекуланинг фазовий тузилиши

тикланмайди, масалан, оксиллар концентрланган минерал кислоталар, оғир метал тузлари билан чўкканда) га учраши мумкин.

Оксилларни ажратиш усуллари. Оксилларни паст молекуляр оғирликдаги аралашмалардан ажратиш

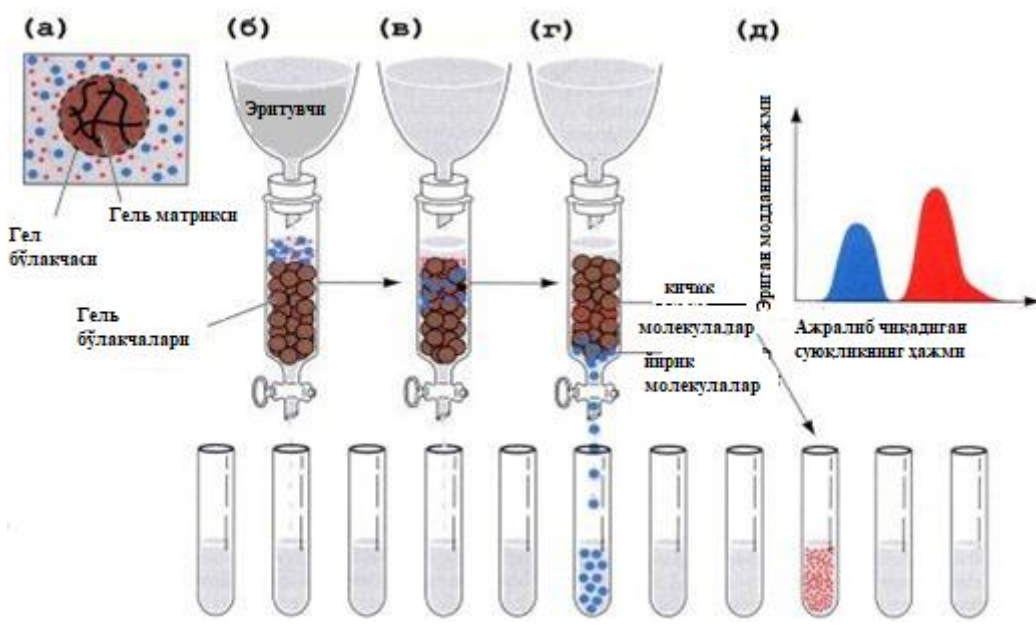
Диализ

Диализда муайян ўлчамдаги махсус полимер мембраналаридан фойдаланилади, унинг ўлчамлари пораларига боғлиқ бўлади. Кичик молекулалар (паст молекуляр оғирликдаги аралашмалар) мембранадаги тешиклардан ўтиб, катта бўлганлари (оксиллар) сақланиб қолади. Шундай қилиб, оксиллар кераксиз аралашмалардан ювилади.

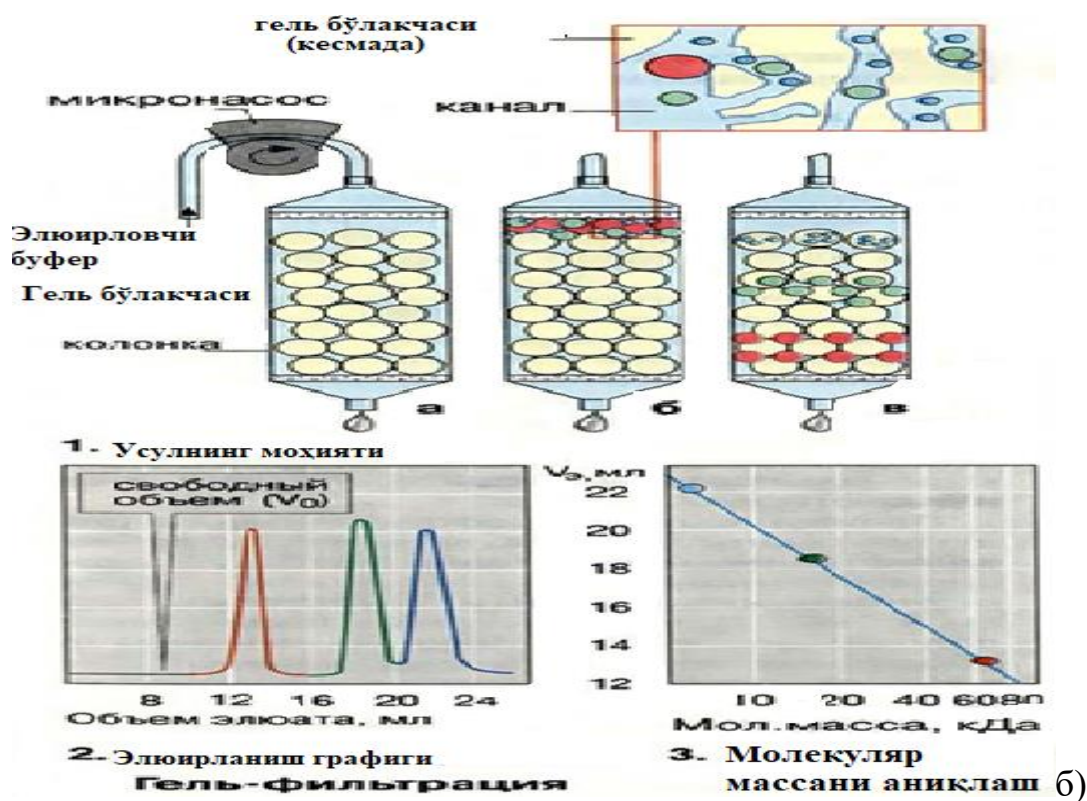
Оксилларни молекуляр оғирликлари бўйича ажратиш

Гель хроматографияси

Хроматографик колонка маълум ўлчамдаги пораларга эга гель гранулаларига (Сефадекс) билан тўлдирилади. Колонкага оксиллар аралашмаси солинади. Колонкада оксилларнинг ўлчами сефадекс пораларига нисбатан кичиги пораларга “тиқилиб” қолади, қолганлари колонкадан эркин тушиб кетади. Оксилнинг ўлчами унинг молекуляр оғирлигига боғлиқ бўлади.



a)



5- а ва б -расмлар. Гель хромотаграфия йўли билан оксилларни ажратиш

Ультрацентрифугалаш

Ушбу усул турли хил зичлик градиентлари (сахароза буфери ёки цезий хлорид) билан эритмалардаги оксил молекулаларининг ҳар хил чўкиш (седиментация) тезлигига асосланган (6-расм).

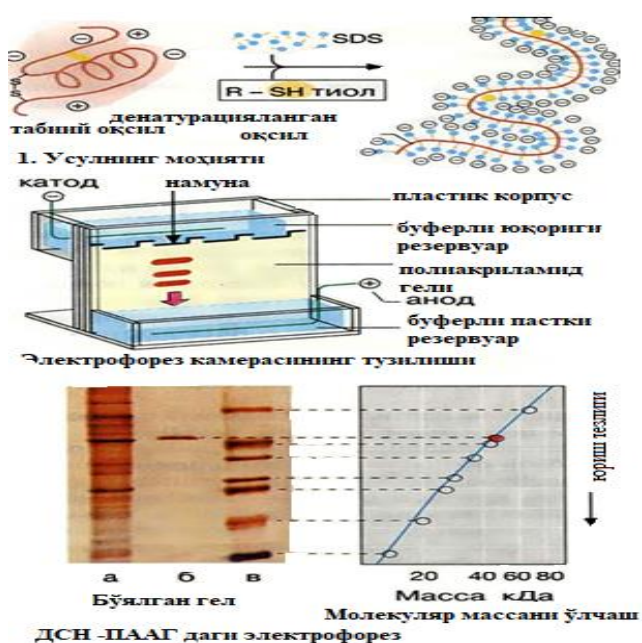


6- расм. Оксилларни ультрацентрифугалаш йўли билан ажратиш

Электрофорез

Ушбу усул зарядга қараб, оксил ва пептидларнинг электр майдонида турли хил силжиш тезлигига асосланади. Электрофорез учун ташувчилар сифатида турли геллер, ацетат целлюлоза, агароза хизмат қилиши мумкин.

Ажраладиган молекулалар ҳажмига қараб гелда ҳаракатланади: каттарок бўлганлари гелнинг поралари орқали ўтиб келганда тутилиб қолади ва ҳаракатланиши кечикади. Кичикроқ молекулалар камроқ қаршиликка дуч келади ва шунинг учун тезроқ ҳаракат қилади. Натижада, электрофорездан кейин каттарок молекулалар кичик қисмларга қараганда стартга яқинроқ бўлади (7-расм).



7-расм. Оқсилларни гел электрофорез ёрдамида ажратиш

Электрофорез ёрдамида оқсилларни молекуляр оғирлик билан ажратиш мумкин. Бунинг учун натрий додецилсулфат (ДДС-На) иштирокида ПААГ-полиакриламид гелдаги электрофорез қўлланилади. ДДС-На дифиль модда бўлиб, зарядланган ва гидрофоб гуруҳга эга. Протеинлар бир вақтнинг ўзида ўзларининг гидрофобик радикаллари ва денатурацияси билан ДДС-На билан боғланади. Электрофорезда оқсиллар шакл ва заряд бўйича ҳаракатланади. Электрофорез пайтида оқсилнинг ҳаракатчанлиги фақат унинг молекуляр оғирлигига боғлиқ бўлади.

Индивидуал оксилларни ажратиш

Аффин хроматографияси

Усул оксилларнинг турли молекулаларга ковалент бўлмаган алоқалар билан маҳкам боғланиш қобилиятига асосланган. У ферментларни, иммуноглобулинларни, рецепторлар оксилларини ажратиш ва тозалаш учун қўлланилади. Баъзи оксиллар махсус боғланадиган моддаларнинг молекулалари (лигандлар) инерт модданинг зарралари билан ковалент равишда боғланади. Протеинлар аралашмаси колонкага киритилади ва керакли протеин лигандга маҳкам ўрнашади. Қолган оксиллар колонкадан тушиб кетади. Таркибида сақланиб қолган оксилни колонкадан эркин ҳолда лиганд сақловчи буфер эритма билан ювиб олиш мумкин. Ушбу жуда сезгир усул бўлиб, юзлаб жуда оз миқдордаги оксилларни хужайра экстрактидан соф ҳолда ажратиш олишга имкон беради.

Изоэлектрик фокуслаш

Усул оксилларнинг ИЭН-изоэлектрик нуқтасининг турли қийматларига асосланган. Протеинлар амфолини (рН кўрсаткичи 3 дан 10 гача бўлган ораликда олдиндан келтирилган модда) пластинкада электрофорез билан ажратилади. Электрофорез пайтида оксиллар ИЭН қийматига қараб ажралади (ИЭН да оксил заряди нолга тенг бўлади ва у электр майдонида ҳаракат қилмайди).

2 ўлчамли электрофорез

Бу изоэлектрик фокуслаш ва ДДС-На электрофорези билан уйғунлашган шаклидир. Дастлаб, электрофорез амфолини пластинкада горизонтал йўналишда амалга оширилади. Протеинлар зарядига (ИЭН) кўра ажралади. Кейин пластинкага ДДС-На эритмаси билан ишлов берилади ва электрофорез вертикал йўналишда амалга оширилади. Протеинлар молекуляр оғирликларига кўра ажралади.

Иммуноэлектрофорез (Вестерн-блоттинг)

Намунадаги муайян специфик оксилларни аниқлаш учун ишлатиладиган аналитик усул (8-расм).

Босқичлар:

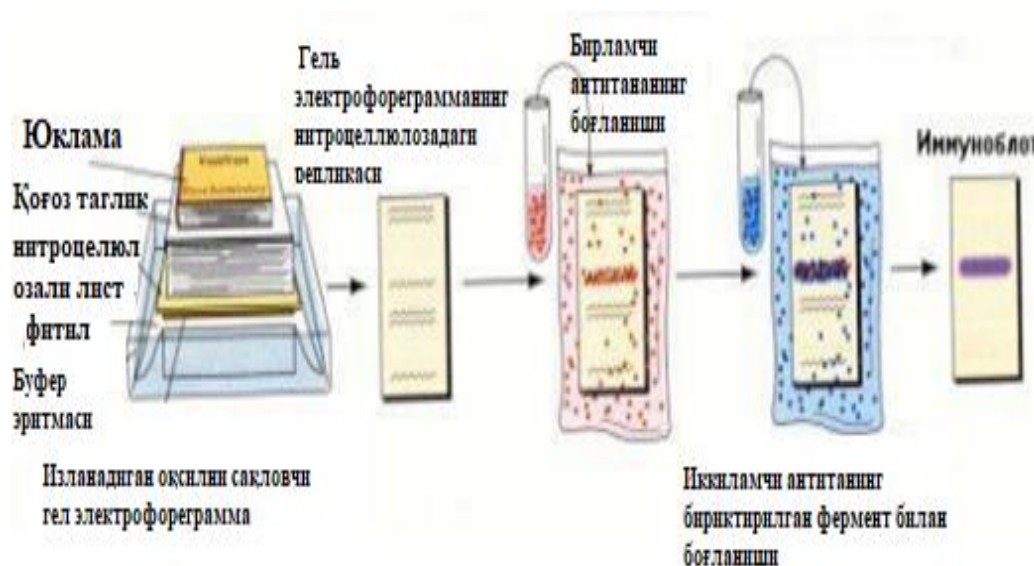
1. Оқсилларни биологик материалдан ажратиш.
2. ПААГ да ДДС-Na билан оқсилларни молекуляр оғирлик бўйича электрофорез ёрдамида ажратиш.
3. Кейинги ишни осонлаштириш учун оқсилларни гелдан полимер пластинкасига ўтказиш.
4. Қолган пораларни тўлдириш учун пластинкага носпецифик оқсил эритмаси билан ишлов бериш.

Шундай қилиб, ушбу босқичдан сўнг пораларида ажратилган оқсиллар бўлган пластинка олинади ва улар орасидаги бўшлиқ носпецифик оқсил билан тўлдирилади. Агар бирон-бир касаллик учун жавобгар бўлган оқсиллар орасида керакли протеин мавжудлигини аниқлаш керак бўлса, аниқланиш учун антитана билан ишлов бериш усулидан фойдаланилади.

Бирламчи антитаналар деганда мақсадли оқсилга нисбатан антитаналар тушунилади. Иккиламчи антитаналар деганда бирламчи антитаналарга нисбатан антитаналар тушунилади. Иккиламчи антитаналарнинг таркибига кўшимча махсус (молекуляр зонд деб аталадиган) нишон киритилади, нишон натижани кўриш имконини беради. Нишон сифатида радиоактив фосфат ёки иккиламчи антитана билан маҳкам боғланадиган фермент ишлатилади. Дастлаб бирламчи ва кейин иккиламчи антитаналар билан боғлашда иккита мақсадга кўзда тутилади: усулни стандартлаштириш ва натижаларни яхшилаш.

5. Бирламчи антитаналар эритмаси билан ишлов бериш пластинканинг антигени (оқсил) мавжуд бўлган жойида боғланиш юзага келади.
6. Боғланмаган антитаналарни олиб ташлаш (ювиш).
7. Кейинги акс эттириш учун нишонланган иккиламчи антитаналар эритмаси билан ишлов бериш
8. Иккиламчи антитаналарни олиб ташлаш (ювиш).

9. Акс эттириш - автография радиоактив фосфатдан фойдаланганда ёки пластинкага субстрат эритмаси билан ишлов беришда – нишон фермент билан ишлов бериш.



8-расм. Намунадаги муайян специфик оқсилларни аниқлаш учун ишлатиладиган аналитик усули

Иммуноэлектрофорез

Агар биологик материалда керакли протеин бўлса, пластинкада чизик пайдо бўлади, бу оқсилнинг тегишли антитаналар билан боғланганлигини кўрсатади.



9-рам. Иммуноэлектрофорез.

Назорат саволлар:

1. Оқсилларни ажратишнинг қандай усуллари биласиз?
2. Оқсилларни туз ёрдамида чўктириш усули қачон қўлланилади?
3. Диализ усули нимага асосланади?
4. Гель фильтрация усулининг моҳияти нимада?
5. Оқсилларнинг молекуляр оғирликлари қандай таҳлил қилинади?
6. Оқсил электрофорезининг асосий принциплари нимага асосланади?
7. Иммуноэлектрофорез усулининг афзаллиги нимада?

Адабиётлар

1. <http://www.drau.ru/article/115.html>
2. <https://studfile.net/preview/3883713/page:4/>

§2. ОҚСИЛЛАРНИ ПОЛИАКРИАМИД ГЕЛ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗИДА АЖРАТИШ

Ишнинг мақсади: Оқсилларни ПААГ гель электрофорези ёрдамида ажратиш усуллар ва принциплари билан танишиш.

Ишнинг вазифаси: VT10 камераси ёрдамида ПААГ да табиий (натив) вертикал гель-электрофорезни ўтказиш.

Назарий қисм: оқсилларни ажратиш сули оқсил молекулаларининг электр зарядига эга бўлганлиги сабабли уларнинг ўлчами ва тури, оқсил аминокислоталарининг таркиби, рН кўрсаткичлари ва уни ўраб турган муҳит ион кучини аниқлашга асосланади. Ташқаридан таъсир эттирилган электр майдони туфайли оқсил молекулалари эритмада қарама – қарши қутбларга томон ҳаракатланади. Оқсил қисмларининг кўчиши уларнинг зарядига тўғри пропорционал бўлса, ўлчами ва гидрадациясига тескари пропорционалдир.

Полиакриламидли гел (ПААГ) ташувчи сифатида энг мақбул ҳисобланади. У молекуляр ғалвир хусусиятига эга бўлиб, оқсил аралашмаларининг нафақат заряди, балки ўлчами ва қисмларининг шаклига биноан электрофоретик ажралишини таъминлайди. ПААГ электрофорезида гель коваклари диаметрига мувофиқ равишда оқсилларнинг йирик

молекулалари секин ҳаракатланса, майда молекулалари эркин ҳаракат қилиб, гел ковакларидан тезда ўтиб кетади.

ПААГ ни акриламид (чизиқли “асос” ҳосил қилувчи) ва N, N'-метиленбисакриламид (чизиқли занжирларни кўндалангига “тикиш” учун хизмат қиладиган) ни биргаликда полимеризация қилиш асосида шакллантирилади.



Акриламид

N, N' -метиленбисакриламид

Табиий (натив) ПААГ электрофорези денатурацияга учрамаган оқсиллар (яъни табиий –натив ҳолатдагиси) ни ажратишга хизмат қилади. Оқсилларнинг ферментатив ёки бошқа исталган функциясини сақлаб қолиш зарурати бўлганда қўлланилади.

Материаллар ва асбоб ускуналар:

Доимий ток манбаига эга бўлган вертикал электрофорез ўтказиш камераси (Стадиера ускунаси).VT-10 камераси билан бирга "Эльф-4" ток манбаи қўлланилади.

Гел ҳосил қилиш учун спейсерлар билан мустаҳкалланган ойналар, иккита тароқча, скальпеллар, қайчилар.

Кимёвий колбалар, стаканлар, 50 мл ли пластик пробиркалар, белгиланган ҳажмни бошқариладиган автомат пипеткалар-дозаторлар, 20 мл ли бир марталик ишлатиладиган шприцлар.

pH-метр.

Хроматографик ёки фильтр қозоғи - 0,5 варақ.

Совутиш камераси.

Гель тайёрлаш учун 30% акриламид-бисакриламидли АБ-қуйма эритмаси (100 мл) ишлатилади. Уни тайёрлаш учун 29,6 г акриламидни оз миқдордаги сувда эритилади ва 0,4 г бисакриламид қўшиб, эритма ҳажмини 100 мл га етказилади. Эритмани ёпиқ шиша идишда музлаткичда қоронғуда сақланади.

Диққат! Акриламид билан ишлаш махсус қўлқопларда ва мўрили шкафта бажарилади.

Концентрацияловчи (25 мл) гелни тайёрлаш учун рН 6,8 бўлган 0,625М ли Трис-НСl буферини ярим ҳажм (12 мл) сув билан эритилади ва эритманинг рН и тегишли кўрсаткичга қадар хлорид кислота ёрдамида келтирилади. Кейин сувни белгиланган ҳажмга қадар қўшилади.

Ажратувчи гелни тайёрлаш учун буфер (50 мл). 1,5 М kb Трис-НСl буфери, рН 8,8. Аммоний персульфати (ПСА). 10% (1 мл). Гелни тайёрлайдиган пайтда қилинади. ТЕМЕД (100 мкл). Уни персульфатга нисбатан эквивалент ҳажмда нейтрал ва ишқорий муҳитлар учун ишлатилади. Кислотали муҳитларда полимеризация қилиш учун ТЕМЕД миқдорини сезиларли даражада оширилади.

Электрод буфери (500 мл). 0,025 трис-0,192 М глицин, рН 8,3.

“Гувоҳлик берувчи” бўёқ (метчик) (0.5 мл). Электрод буферига 0,001%-ли бромфенол кўки ва 10% сахароза ёки глицерин қўшиб тайёрланади.

Ишнинг бориши:

1 босқич. Камерани йиғиш.

VT-10 камераси йиғилмаган ҳолда рамка, иккита ойнали тўплам (ўйиқли ва ўйиқсиз), винтли тўртта пластик қисқичлар ва электроди буфер учун ванначалардан иборат бўлади. Ўйиқсиз ойналарга спейсерлар мустаҳкамланган бўлади.



10-расм. Электрофорез қурилмасининг тузилиши.

Ички ойна (ўйиқли) га камеранинг резина ғилофли рамкасига киритилади, юқори томондан (ўйиқсиз) ташқи ойнани жойлаштирилади.

Ойналарни икки ёқлама қисқич винтларини бураш йўли билан қисилади. Қисқичларнинг узун томони пастга қаратиб қўйилади. Худди шу тарзда ойнанинг тескари томонидан рамкалари мустаҳкамланади. Зарурат бўлганда ойнанинг иккинчиси тегишли ўлчамга эга қалин ойна билан алмаштирилиши ҳам мумкин.

Гельни қуйиш учун махсус таглик столчадан фойдаланилади. Терилган камерани столчанинг силиконли тўшамасига жойлаб, столчанинг усти копоқ билан ёпилади ва қисқич винтлар билан мустаҳкамланади. Винтларни бир вақтнинг ўзида етарлича зич қилиб буралади.

2 босқич. Гелларни тайёрлаш ва қуйиш

Дастлаб ажратувчи гельни қуйиб, совиши кутилади, кейин ойналар орасига тароқчани жойлаб, концентрацияловчи гел қуйилади. 15% ли (битта пластика учун 10 мл керак бўладиган) гелни тайёрлаш учун қуйидагиларни аралаштирилади:

*4,5 мл ли АБ эритмаси,
2,5 мл трис-НСI буфери, рН 8.8,
3 мл сув,
20 мкл ТЕМЕД,
160 мкл ПСА.*

Олинган эритмани (аралашини учун) тезда чайқатилади ва шу заҳоти автомат пипетка ёрдамида ойналар орасига қуйилади.

Концентрацияловчи гелни тайёрлаш учун қуйидагиларни аралаштирилади:

*1 мл АБ эритмаси,
1 мл трис-НСI буфери, рН 6,8,
3 мл сув,
20 мкл ТЕМЕД,
160 мкл ПСА,*

Чайқатилади ва тезда қуйилади. Ойналар орасига тароқчани зудлик билан жойлаштирилади.

3 босқич. Намуналарни солиш ва камерани ишлашга тайёрлаш.

Геллар қотгач, тароқчани олиб, ҳосил бўлган чуқурчаларга намуналар ва бўёқ солинади. Столчани қисмларга ажратилади, камерани олиб, қисқичларни ечмасдан ванначага солинади (камера ванначада мустаҳкам туриши лозим). Юқори томондан электродли қопқоқ ёпилиб, қутблари мавжудлигига эътибор қаратилади (клеммалар ранги қопқоқдаги электродлар рангига мос келиши зарур).

Ванначали камерани музлаткичга қўйилади. Ванначалар ва камеранинг ички қисмига ойналарнинг юқори чегараси (гель юзасини бир неча миллиметр қоплаши) га қадар электрод буфери қўйилади.

4 босқич. Электрофорезни ўтказиш

Эльф-4 ток манбаини ёқиб, бериладиган кучланиш ёки ток кучи параметрларини белгилаб, жараён бошланади. Одатда электрофорезни концентрацияловчи гель учун 120-140 В, ажратувчи гелга эса 180 В кучланиш бериб олиб борилади. Бўёқли чегара пластиканинг охирига келиши билан қурилмани ток манбаидан узилади, гелни эҳтиёткорлик билан ойналар орасидан чиқариб олиб, тенг бўлақларга бўлинади ва таҳлил қилинади.

Назорат саволлар:

1. Оқсил электрофорези учун қандай реактивлардан фойдаланилади?
2. Оқсил электрофорезида ишлатиладиган акриламид билан ишлаш қоидаси қандай?
3. Электрофорез қурилмасининг таркибий қисмларига нималар киради?
4. Электрофорез ўтказиш босқичларни санаб беринг.
5. Полиакриламид гелини бўйаш қандай амалга оширилади?

§ 3.ОҚСИЛЛАРНИНГ СПЕКТРИНИ ЎРГАНИШ

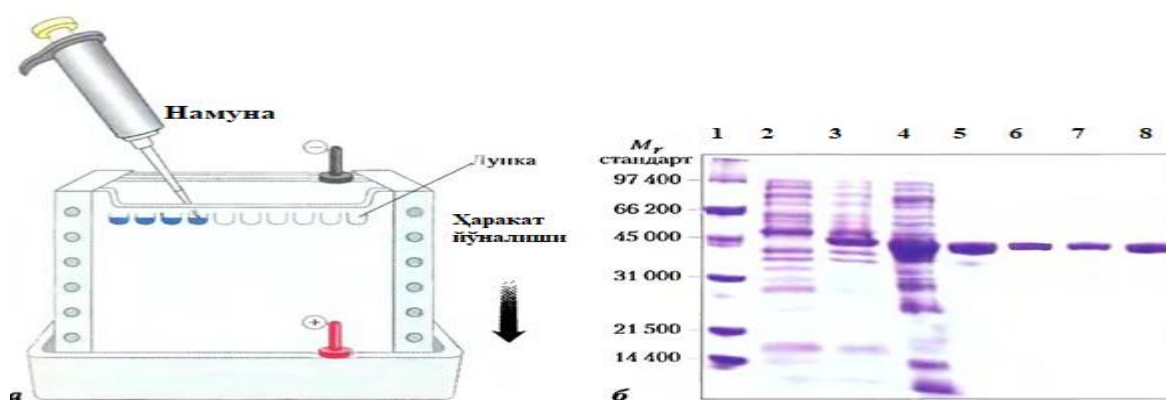
Ҳар бир оқсилнинг старт чизиғи бўйлаб босиб ўтган масофаси аниқланади. Бунинг учун визуал (кўз билан) ёки 550-00 нм ли

денситометрдан фойдаланилади. Кейин калибровка графиги тузилиб, абсциссалар ўқига оксилнинг босиб ўтган йўли узунлиги ва ордината ўқига унинг молекуляр оғирлиги логарифми қўйиб чиқилади. Оксилнинг нисбий ҳаракатини таҳлил қилишда оксил қисми узунлигининг гелнинг умумий узунлиги ёки олдинга ҳаракат қилувчи бўёқ модданинг босиб ўтган йўлига нисбатан ҳисоблаб чиқилади.

Шундан сўнг оксилларнинг нисбий ҳаракатининг улар молекуляр массаси логарифмига нисбатан боғлиқлиги бўйича калибровка чизиғи чизилади. Молекуляр оғирлиги номаълум I_x бўлган оксилнинг босиб ўтган йўлини ҳисоблашда калибровка графиги асосида ўрганиладиган оксилнинг молекуляр оғирлиги ҳисобланади. Стандарт сифатида молекуляр маркер оксилларидан фойдаланилади (10-11 расмлар).

Олинган натижаларни қуйидаги жадвалга ёзиб чиқилади:

Старт чизиғидан сўнгги нуктага қадар масофа зунлиги (mm)	Маркер оксилнинг молекуляр оғирлиги (D)	Маркер оксилнинг электрофоретик ҳаракати кўрсаткичи (Rf)	Ўрганиладиган оксилнинг молекуляр оғирлиги (D)	Ўрганиладиган оксилнинг электрофоретик ҳаракати кўрсаткичи (Rf)



10-расм. Оксилларнинг молекуляр массасини гел электрофорез ёрдамида аниқлаш.

А-электрофорез курилмасига намуни солиш. Б-Электрофорез натижасининг кўриниши (Гельнинг электрофореграммаси). 1- маркер, 2- индуцирланмаган хужайралар оқили (мисол), 3-индуцирланмаган хужайлар (мисол), 4-тозаланмаган хом ашё экстракти намунаси, 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ да чўктирилган чўкма, 6-анионалмашинувчи, 7- катионалмашинувчи, тозаланган оқсил



11-расм. Оқсилларнинг молекуляр оғирлигини калибровка чизиғи ёрдамида таҳлил қилиш.

Назорат саволлар:

1. Нима учун оқсил молекуласида суммар (умумий) заряд ҳосил бўлади?
2. Нима учун унинг ўлчами, pH ўзгартирилганда ҳам у ўзгармасдан қолади? Электрофоретик ҳаракат нима?
3. Электрофоретик ҳаракатни ҳисоблаш формуласини изоҳлаб беринг.
4. Полиакриламид гелининг структура формуласини ёзиб беринг.
5. Нима учун ПААГ суюқ фазаларни ташишда энг яхши ташувчи бўлиб ҳисобланади?
6. Гельни тайёрлашда нима учун қуйидаги компонентлар: а) ПСА б) акриламид в) бисакриламид г) SDS ишлатилади. Ушбу бирикмаларнинг формулаларини ёзинг.

Адабиётлар:

1. Сова В.В., Кусайкин М.И. Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу «Химия и биохимия белков и ферментов». Владивосток: Дальневост. ун-т, 2006. 42 с.
2. Голицын В.М. Неденатурирующий электрофорез. Фракционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и белков плазмы крови // Биохимия. – 1999. Т.64. С. 64-70.

§4. ТАСОДИФИЙ МУТАГЕНЕЗ УСУЛИ

Мутациялар генетик рекомбинациялар сингари ирсий ўзгарувчанликнинг дастлабки манбаи сифатида сунъий танлаш учун материал етказиб беришга хизмат қилади. У генетик ва биокимёвий тадқиқотларда қимматли восита ҳисобланади.

Мутациялар генетик мутация усуллари асосида амалга оширилиб, генда, муайян ўзгаришлар чақириб, нафақат генни идентификация қилиш, балки унинг хромосомалардаги плазмида ёки ДНК нинг бошқа молекулаларидаги жойлашувини аниқлашда генетик маркер сифатида хизмат қилади.

Мутация тўпламига эга бўлиш метаболизм ва унинг назорати жараёнларини тадқиқ этиш имкониятини ва мутация натижасида ўзгарган оқсилларни ўрганиш уларнинг структураси ва фаолиятини аниқлашга имкон беради. Мутациялар фойдали белгиларга эга микроорганизм штаммлари (масалан, антибиотикларнинг продуцентлари) ни танлаш жарёнида асос бўлиб ҳисобланади.

Спонтан (тасодифий мутациялар)

Спонтан мутациялар табиий шароитларда хужайрадаги нормал жараёнлар натижасида ёки хужайраданнинг атроф муҳит билан муносабати натижасида келиб чиқади. Мутаген омил хусусиятига ташқи муҳитнинг

бошқариб бўлмайдиган омиллари, масалан, табиий радиация киради. Озуқа муҳитларининг муайян компонентлари ҳам мутаген таъсирга эга бўлиши мумкин. Спонтан мутацияларнинг келиб чиқишида рекомбинация, репликация ва репарация жараёнлари ҳам таъсир кўрсатади. Хужайралар популяциясида турли генлар бўйича спонтан мутациялар жуда паст частотада (10^{-5} - 10^{-7} чегарасида) рўй беради. Агар мутант фенотипини танлаш усули (селекцияси)мавжуд бўлса жуда кам учпайдиган мутацияларни ҳам қайд этиш мумкин. Танлаб олишнинг бундай усулларимавдуд бўлганд, айнан спонтан мутацияларни илғаб олишга эътибор қаратилади, чунки кўплаб мутант омиллар одам учун потенциал хавф туғдиради, кимёвий мутагенлар эса бундан ташқари атроф-муҳитни ифлослантиради.

Индукцирланган мутациялар

Мутация чакирувчи физикавий, кимёвий ва биологик воситалар мутаген таъсирловчилар деб аталади. Мутаген таъсирловчиларга ультрабинафша нурлари (УБ), ионлаштирувчи нурлар, бир қатор кимёвий бирикмалар, транспозон элементлари, тарнспозонсимон фаглар (масалан Ми фаги) эга бўлиб, бундан ташқари мутациялар муайян генлар (мутатор генлар) да юзага чиқиши мумкин.

Мутагенни танлаш

Мутагенни танлаш мутация типи, яъни азотли асоснинг ўрнини алмаштириш, делеция, ўқиш рамкасининг силжишига кўра белгиланади, шунингдек, мутагенезнинг самарадорлиги муайян микроорганизмга нисбатан олинади. Масалан, делецион мутантлар ҳар доим яққол кўринадиган фенотипга эга бўлади, ҳароратга боғлиқ ва нисбий летал (ҳалокатга олиб келувчи) ҳақиқий *реверсиялар* ёввойи типга нисбатан уларда бўлмайди.

Микроорганизмларнинг турли хил турлари самарали мутагенез учун турли хил меъёрларни талаб қилиши мумкин. Шу боис тажрибани бошлашдан олдин мутант омилнинг дозасига нисбатан ёки ишлов бериш вақтига нисбатан хужайралар яшовчанлиги эгри чизиғини тузилади.

Ультрабинафша нурлар

Бир қатор микроорганизмларда мутант олишнинг қулай усули УБ нурлар билан нурлантириш ҳисобланади. Бунинг учун ёруғликнинг қисқа тўлқини ҳудудида максимал нурлантирадиган (254 нм), масалан, бактериоцид лампалардан фойдаланилади. УБ нурлар нисбатан кучсиз мутаген ҳисобланиб, ҳужайраларнинг паст яшовчанлик ҳолати (0,1-1,0%) да яхши натижалар олишга эришилади. Шунинг учун лозимки, УБ тўлиқ равишда ойнага ютилади, шунинг учун вегетатив ҳужайралар суспензиясини ёки спораларни нурлантиришда очиқ идишга солинади, масалан Петри ликобчасига. Экран эффектига йўл қўйилмаслиги учун суспензияларнинг концентрацияси 5×10^8 ҳужайра/мл бўлиши ва нурлантиришнинг буфер эритмарда ўтказилиши лозим.

УБ нурларнинг летал самараси ҳужайраларнинг физиологик ҳолатига боғлиқ бўлиб, бу энг аввало ҳужайраларнинг ёши билан белгиланади. УБ нурлар билан нурлантиришга стационар фазадагига нисбатан экспоненциал фазада ўсиб турган ҳужайралар нисбатан сезгир бўлади. Бундан ташқари нурлантириш ва кейинги ҳужайраларни инкубация қилиш даврида фотореакцияни истисно этадиган, масалан, қоронғида амалган ошириш талаб этилади.

Нитрозогуанидин. N –метил-N-нитрогуанозин (НГ) энг кучли ва кенг қўлланиладиган мутаген ҳисобланади.

Дастлабки НГ эритмаларини бевосита ишлатиш олдидан тайёрланади, тегишли буфер масалан, 0,1 М ли цитратли буфер (рН 5,5) да концентрацияси 1 мг/мл бўлгунга қадар эритилади. НГ нинг ишчи эритмаси 50-500 мкг/мл ни ташкил этади.

Ҳужайралар (одатда, 5 мг ҳужайраларни экспоненциал фазадаги) центрифугалаш йўли билан чўктирилади, тенг ҳажмдаги цитрат буфери билан ювилади, 5 мл буферда ресуспендирланади. НГ қўшиб, 30-37 °С да муайян вақт давомида инкубация қилинади. Ишлов бериш вақти шундай танланадики, ҳужайраларнинг яшовчанлиги тахминан 50% ни тагкил этсин.

Хужайраларга охирги концентрацияси 50-100 мкг/мл бўлган НГ билан 30 дақиқагача ишлов берилади.

Ишлов берилган хужайраларни центрифугалаш йўли билан чўктирилади.

НГ олиб ташлаш учун хужайраларни фосфатли буфер (рН 7,0) билан ювилади ёки минимал муҳитда ювилади. Бундан кейин хужайраларни бой озуқа муҳитига кўчириб ўтказиб, тун давомида инкубация қилинади.

Азот кислотаси

Азот кислотаси эритмаларини бевосита ишлатиш олдидан тайёрланади, цитрат натрийни 0,1М Na-ацетат буферида (рН 4,6) охирги концентрацияси 0,05 М бўлгунга қадар эритилади.

Хужайралар (одатда, 5 мг хужайраларни экспоненциал фазадаги) ни центрифуга қилиб чўктирилади, тенг ҳажмдаги Na-ацетат буферида ювилади. 1 мл азот кислотаси билан ресуспендирланади. 30-37⁰ С да инкубация қилинади.

Ишлов бериш вақтини, хужайралар яшовчанлиги 0,01-0,1% бўлгунга қадар танланади ва азот кислотаси билан хужайраларга 10-20 дақиқа давомида ишлов берилади.

Инкубация даври тугагач, хужайраларга 5-10 мл минимал озуқа муҳити кўшилиб реакцияни тўхтатилади.

Кейин хужайраларни центрифугалаш йўли билан чўктирилади. 10 мл бойитилган озуқа муҳити билан ресуспендирланиб тун давомида ўстиришга қўйилади.

Алкилирловчи бирикмалар

Алкилирловчи воситаларни мутаген сифатида ишлатишда этил метан сульфонат (ЭМС) кенг қўлланилади. Хужайраларни экспоненциал фазаси охирида танлаб олинади. Центрифуга қилиш йўли билан чўктирилади. Чўкмани 2 мл углерод манбаини сақламайдиган таркибида 0,2 М Трис HCl (рН 7,5) бўлган минимал озуқа муҳити билан ресуспендирланади. Хужайралар суспензиясига 0,03 мл ЭМС қўшилиб, тўлиқ эриб кетгунига

кадар тезлик билан аралаштирилади. Хужайраларни 1-2 соат давомида (иложи борича чайқаткичда) инкубация қилинади. Кейин хужайралар суспензиясига 10-15 мл минимал ёки бойитилган озуқа муҳити солиниб тун давомида инкубация қилинади.

Мутагенлар билан ишлашда эҳтиёт чоралари

Физикавий ва кимёвий мутагенлар нафақат мутация частотасини оширади, балки канцероген таъсирга эга бўлиб сут эмизувчиларда саратон касаллигини келтириб чиқаради. Бундан ташқари кимёвий мутагенлар терига тушганда куйиш ва заҳарланишга олиб келади.

Мутагенлар билан ишлашда куйидаги қоидаларга амал қилиш лозим бўлади. Ҳар қандай кимёвий мутаген билан ишлаганда ишни мўрили шкафта ўтказилади, унинг ишчи юзаси фильтр қоғоз билан қопланади. Қўлга резин ёки пластик қўлқоп кийилади. Мутагенлар эритмасини оғизда тортиб олинмайди, бунинг учун автомат пипетка билан ёки у бўлмаса резина нокчадан фойдаланилади. Мутагенлар эритмасини раковинага тўкилмасдан қаттиқ материаллар, масалан вермикулитга жойлаб бошқа хавфли чиқиндилар билан бирга утилизация қилинади.

Назорат саволлар

1. Мутация деганда нимани тушунилади?
2. Тасодифий мутагенз нима?
3. Мутаген омилларга нималар киради?
4. Нитрозогуанидин билан мутацияни қандай чақирилади?
5. Мутагенлар билан ишлаш қоидалари ҳақида нималарни биласиз?

§5. ЙЎНАЛТИРИЛГАН МУТАЦИЯ УСУЛИ

Тушунтириш

Генетик хилма-хилликнинг самарали генерациясида ДНК синтезини нишонлаш, ноёб молекуляр маркерларни яратиш ёки оксилларни лабораторияда ишлаб чиқариш учун қўлланилиши мумкин бўлган бебаҳо молекуляр восита ҳисобланади. Берилган муайян мақсадли кетма-кетлик

учун йирик (>1011) мутант библиотекаларни яратишга имкон берадиган протоколни тақдим этилади. Ушбу усул *ColE1* плазмидасининг керакли кетма-кетлигини ДНК полимеразаси I (*LF-PolI*) нинг кам мувофиқ келадиган варианты билан кодлашга асосланган. Мақсадли плазида, *E.coli* штаммининг мутаторига айланади ва мақсадли геннинг жойлашган жойига қараб қаттиқ озуқа муҳити 0,2 дан 1 мутация / кб гача бўлган колониялар билан қопланади. Мутагенезнинг ушбу жараёнини такрорлашлар орқали юқори мутацион частоталарга эришилади.

Мутагенезнинг муқобил усуллари билан таққослаганда, мазкур протокол соддалиги билан ажралиб туради, чунки ҳеч қандай клонлаш ёки ПЗР (Полимераза занжир реакциясидан) фойдаланилмайди. Шундай қилиб, ушбу усул плазмидлар ёки бошқа *Pol* шаблонларининг мутацион нишонлаш ёки дастлабки мақсадда бўлмаган ҳаракат эволюциясидаги кетма-кетликларнинг йирик қисмларини ўрганиш учун жуда мос келади. ПЗР ёки тасодикий (рандомизирланган) олигонуклеотидларга асосланган усулларни тақлиф қиладиган кескин фазовий назоратга асосланган библиотеканинг муайян бўлимларини тузишга кейинчалик клонлаш орқали ҳам эришиш мумкин. Бу ерда тасодикий мутант библиотекасини қандай яратишни ва янги биокимёвий фаолликни намойиш этувчи мутантларни аниқлаш учун *E. coli* да антибиотик моддаларга асосланган танловларни қандай ташкил этишни кўрсатадиган протоколлар тақдим этилади.

Протокол

Тасодикий мутант библиотекасини яратиш. *ColE1* плазмиданинг репликацияси бошланишида *Pol I* воситачилик қилади (1-3-да кўриб чиқилган) Бу мутагенез усули мақсадли кетма-кетликни *ColE1* плазмидига жойлаштириш ёки унинг репликацияси ва ҳужайраларда тарқалиши уни паст аниқликдаги ДНК полимеразаси I (*LF-Pol I*). *LF-Pol I* нинг ҳужайралардаги экспрессиясига асосланган. *LF-Pol I* мутант ДНК полимеразаси бўлиб, репликациянинг аниқлигини камайтирадиган учта мутацияни кодлайди, хусусан *I709N* (*мотивда*)), *A759R* (Б мотивида) ва *D424A* (*инактивацион*

корректур) (нофаол тахрирлаш) *E.coli* JS200ЖС200 штаммида, ҳарорат 37⁰С да *Pol I* (*polA12*) аллели ҳароратга таъсирчан бўлиб, шунда *LF-Pol I* устунлик қилади. Чекланган шароитларда *polA12* таъсири остида мақсадли (нишон) кетма-кетликларнинг ҳужайраларидаги репликацияси тасодикий мутант библиотекаларини яратишга олиб келиб, мутагенез тўйинган культураларда самаралидир.

Ҳали ҳам аниқ бўлмаган сабабларга кўра мутагенез доимий жараён эмас, яъни мутация частотаси сон билан чизикли равишда ошмайди. Янги муҳитда авлодлар сони ортишига билан ҳужайраларда янада тўйинишга эришса ҳам, ҳатто ҳужайраларнинг янги ахборотни янада кенгайтиш имкони бўлса ҳам берилса ҳам мутация даражаси ортиб кетмайди. Шунинг учун библиотеканинг мутацияси юкини янада ошириш мутагенезнинг итератив босқичлари ва плазмидани тикланишни талаб қилади. Бу ерда биз ЛФ-Пол И мутагенези учун протоколларни тақдим етамиз. Тақдим этилган протоколлар исталган мутация юкига эришиш жараёнининг итерациясини енгиллаштириш учун дастлабкиларига нисбатан анча соддалаштирилган (1-расм).

Материаллар

Ҳужайралар: S200 recA718 polA12 (TS) uvrA155 trpE65 LON-11
JS200 WT-Pol I: JS200 ҳужайралар: ёввойи турини (WT)ни экспрессия қилади;
JS200 LF-Pol I: JS200 паст аниқликка эга Pol I(LF) билан ифодаланган.
Деформацияни солиштириш учун JS200 штамми WT-Pol I ёки юклама мавжуд бўлмаган маълум бир фаолиятга эга бўлмаган штамм
Мақсадли плазмидалар
Мақсадли ген билан клонланган ColE1 репликациясининг бошланғичини сақловчи плазмидалар

Мутагенездан олдинги босқич: *JS200 LF-Pol* электро-ўтказувчан ҳужайраларини тайёрлаш

LB – агарли пластинкасида ўсиб турган битта *JS200 LF-Pol I* колониясини танлаб олиниб кечаси 30⁰С ҳароратда (рухсат этилган шароитларда) ўстирилади, *LF-Pol I* плазмидига тегишли антибиотик (0,03

мг/мл хлорамфеникол) да ўстирилади. Синов ўтказиладиган таркибида хлорамфеникол сақловчи 8 мл *LB* бўлган пробиркага колонияни ўтказилади ва культурани 30°C 250 rpm тезликда тун давомида чайқатиб ўстирилади.

Эрталаб хужайраларга 8 мл *JS200 LF-Pol I* ни 400 мл хлорамфеникол сақловчи *LB* озуқа муҳитини колбага қуйиб, культурани кўпайтиради. 250 айл/дақиқа да чайқатиб OD₆₀₀ 0,4-0,7 га етгунча (одатда 3-4 соат) культурани 30 ° C да ўстирилади.

OD₆₀₀ 0,4-0,7 бўлган хужайраларни 15 дақиқа давомида сувли муз устида тутиб турилади.

Совутилган культураларни центрифуга идишига ўтказилади. 4°C ҳароратда центрифугаланади. Чўкма усти суюқлигини тўкиб ташланади, сўнгра 10 мл стерил ва (хўл муз устида) совутилган серологик пипетка ёрдамида 10% глицеринни қўшиб, хужайраларни қайта тўхтатилади.

Қайта тўхтатилган хужайраларни 50 мл коник колбага ўтказилади. коник колбани 45 мл ҳажмгача 10% глицерин билан тўлдирилади, сўнгра 4°C ва 4000 айл/дақ тезликда 15 дақиқа давомида центрифугақилинади.

Чўкма усти суюқлигини тўкиб ташланади, коник колбага яна 10 мл 10% глицерин қўшиб, серологик ёки оддий пипетка ёрдамида хужайраларни яна тўхтатиб турилади. Яна коник колбага 45 мл миқдорида 10% глицерин солинади ва центрифуга билан 15 дақиқа давомида 4°C ва 4000 айл/дақ тезликда айлантририлади. Тузларнинг барча қолдиқларини олиб ташлаш учун ушбу жараёни икки марта такрорланади.

Охирги марта центрифугада айлантиришдан сўнг, хужайралар чўкмасига 10% глицеринни тенг қисмида қўшиб (яъни, 2 мл 10% глицерин билан 2 мл хужайра) ўсиш тўхтатиб қўйилади.

Ўсишдан тўхтатилган хужайралар 100 мклдан 500 мкл гача бўлган алюминийли сақлаш найчаларига киритилади. Тезда хужайраларни қуруқ музга солиб музлатиб қўйилади ва кейин уларни -80°C ҳароратда сақланади.

Электрокомпетент хужайраларни олиш учун ишлатишдан олдин хужайраларни муздан аста-секин эритиб олинади.

2. Мутагенез: Мақсадли плазмидани шакллантириш

1. 40 мкл электрокомпетент *JS200 LF-Pol* хужайраларга тешиклари 2-2 мм бўлган электропорацион кюветада ва 30-250 нг оралиғидаги ДНКнинг солинади.

Изоҳ №1: *GFP* оксили генини сақловчи *ColE1* плазида мутагенези назорат сифатида мақсадли ген билан параллел равишда амалга оширилади. Солиштириш босқичи тугагандан сўнг, *GFP* ни *LB* агарли пластиналарда жойлашиши ҳисобига мутагенезни кўриш мумкин. Қорамтир ёки хира бўлиб кўринадиган колонияларда фаол бўлмаган мутациялар мавжуд бўлади.

2. Аралашмани *electroporator* на 1800V да импульс берилади. Ҳар бир намуна учун бир хил электропорация шароитларини таъминлашда вақт доимийлигини (ТС) текшириб турилади; идеал даражада ТС = 5-6 сек бўлади.

3. Хужайра/ДНК аралашмасини 1 мл 37°C да *LB* булонида 40 минут давомида 250 айл/дақ тезликда мартада чайқатиб (чекловли шароитларда) тикланади.

4. *LB* агар солинган 100 мм ли Петри идишига 50 мкл тикланган культурани солиб, хлорамфеникол ва мақсадли плазмидани танлаш учун учун антибиотик солинган агарли пластинани 37°C га қадар олдиндан иситилади.

Изоҳ: № 2: "Майсзор яқинида" хужайраларни концентрациялаш мақсад қилинади. "Майсзор яқинида" концентрацияси турлича, аммо сон-саноксиз колониялар сифатида белгиланади (>1000 колония/100мм идиш). Агар суюлтиришдан кейин хужайралар колонияси мавжуд бўлса, хужайраларнинг электрокомпетентлиги билан боғлиқ бўлади. Агар хужайралар жуда электрокомпенет бўлмаса ва "майсзор" ни тиклашни "тоза" культуранинг ҳисобига иложи бўлмаса, тиклашни центрифугада 4000 *rpm* да 2 минут давомида айлантириб, чўкма усти суюқлигини тўкиб ташлаб ва 50 мкл хужайрани *LB* булондан тайёрланган пластинада солинади.

5. Тунда 37°C даража ҳароратда Петри ликобчасини инкубация қилинади.

3. Мутагенез: Плазмидни тиклаш

1. Эртаси куни хужайралар устига 2 мл *LB* булонини томизиб, Петри ликобчаларини ювилади. Бактериал колонияларни *LB* агарли Петри ликочаларидан стерилизация қилинган учбурчак шпатель билан пластинкадан "сидириб олиш" орқали *LB* булонига ўтказилади. Аввал 1 мл *LB* булонини қўшилади, ювилади ва иккинчи марта яна 1 мл *LB* бульони билан жараёни такрорланади.

2. Пластинадан ювиб олинган колониялардан ДНКни ажратиб олинади. (Ушбу плазмид ДНК библиотекасини ташкил қилади).

Изоҳ № 3: *LB* пластинкасида йиғилган ювилма тўлиқ ҳажмда мини-препарат учун жуда қуюқ бўлиши мумкин. Агар шундай бўлса, мини-препарат ажратиб олинган массанинг максимал миқдорини максимал даражагача суюлтирилади (одатда, ювиш миқдорини $OD = 1$ гача суюлтириш ва суюлтирилган культуранинг ~ 3 мл миқдорида аралаштиришни ўз ичига олади).

4. Интеграция

1. Ажратиб олинган қилинган плазмид ДНКнинг 1 мкг миқдорини *LF-Pol I* плазмидини чизик шаклга ўтказиб берадиган аммо мақсадли плазмидни кесмайдиган рестрикция фермент билан кесилади. (Қўшимча 1-расм).

2. Ортиқча ДНК ни тозаловчи тўпламидан фойдаланиб тозаланadi.

Эслатма № 4: Ушбу босқичда буфердан рестрикция ферменти ва унинг қолдиқларининг барча изларини олиб ташланади. Ушбу босқич кейинги электро-компетент шаклларни олиш учун тузлар концентрациясини паст даражада ушлаб туриш учун зарурдир.

3. *Re*-шаклларда 30-250ng библиотека мутагенезнинг кейинги турларини ўтказиш учун – рестрикция қилинган мақсадли плазмидли библиотекани янги *S200 LF-Pol I* хужайраларига қайта киритилади.

Эслатма № 5: рестриктаза ферменти ёрдамида *Pol I* плазмидини чизикли шаклга ўтказишдан мақсад фақат мақсадли плазмидни қайта шакллантиришдан иборатдир.

4. 2 ва 3 бўлимлардаги муолажаларни қайта такрорланади.

5. Солиштириб ўқиш

1. Изоляция қилинган плазмид ДНК ни ва мақсадли плазмидни ҳам, *Pol I* плазмидини ҳам кесувчи рестриктаза фермент (лар)и билан кесилади, чизиқли шаклга ўтказилади. Плазмидларнинг миқдори ва сифатини таъминлаш учун рестрикцияни 1% агароза гелда ўтказилади. Изоляция қилинган рестрикция плазмид ДНКнинг ~ 400нг миқдори одатда таҳлил қилиш учун етарлидир.

2. Изоляция қилинган плазмид ДНКнинг 1 мк ни *LF-Pol I* плазмидини чизиқли шаклга ўтказадиган рестрикция ферменти билан қирқилади, аммо мақсадли плазмидани кесилмайди.

3. ДНК тозалаш тўпламидан фойдаланиб, рестрикциядан қолган қолдиқларни тозаланади.

4. Мутацияларни тавсифлаш учун мақсадли плазмидани рестрикция қилинган библиотекасини солиштириб ўқилади.

Градиентли ўсиш пластиналари ёрдамида мутантларни акс эттириш ва таҳлил қилиш

Библиотекада мавжуд бўлган генетик хилма-хилликни функционал танлов билан қандай боғлаш мумкинлигини тушунтириш учун бу ерда биз *E.coli* билан *in vivo* шароитида дори воситаларига асосланган функционал танловни протоколи тақдим этилади.

Ушбу усул мутант хужайраларнинг дори градиенти бўйлаб қаттиқ агарда ўстиришга асосланган. У турли концентрациялар бўйича бир нечта (12 тагача) намуналарни бир вақтнинг ўзида тавсифлаш имконини беради, бу эса битта доридан кўра кенгроқ динамик диапазонни таъминлайди. Яна бир афзаллиги шундаки, ушбу таҳлилнинг чизиқли бўлмаган ўқилиши бўлиб, хужайралар ҳаётчанлигидаги давомийликда 2 карра мўътадил тафовутларга дуч келади. Шундай қилиб, цитотоксик қаршиликка асосланган таҳлил, мутант библиотекаларни танлаш ва индивидуал мутантларнинг фенотипик

ҳолатини аниқлаш учун кучли ва тезкор воситани таъминлайди. 2-расмда ундан фойдаланишнинг ҳар бирига мисоли кўрсатилган: А панелида одамнинг оксидловчи деметилазаси АБХ₂ библиотекасида индивидуал мутантлар танланган. WT устидан ўсиб чиққан колониялар метил сулфанат метилататор (MMC) туфайли юзага келадиган цитотоксикликдан юқори химоя қилиш учун танланган. 7. Б панелида индивидуал клон характеристикаси учун ишлатиладиган градиентларнинг мисоли кўрсатилган. Учинчи авлод цефалоспорин антибиотик цефотаксимиға қаршилик даражаси WT β-лактамаза учун агарли градиентда ва иккита кенгайтирилган спектрли *R164H* и *E104K R164S G267R*⁴ мутантлар учун кўрсатилган Таркибида кузатиладиган самаранинг кучига кўра, дорининг етарли миқдордаги миқдорни аниқлаш учун биттадан ортиқ пластинка керак бўлиши мумкин: 0.4мг / мл градиент назорат клонларини тўғридан-тўғри таққослашга имкон берадиган бўлса, энг кучли мутантнинг қаршилик даражаси ўта юқори концентрациядаги цефотаксим (4мг / мл) ёрдамида аниқланиши мумкин.

Материаллар ва ускуналар

100x100x15мм квадрат Петри идишлари (Fisher Sci #0875711A)
100 мм думалоқ Петри идишлари
25x75x1 мм микроскопнинг буюм ойнаси (Fischer Sci #1255015)
50 мл градиентли пробиркалар
Озуқа муҳитлари
LB агар: сув ҳаммомида эритилади ва 56 ° C да етказилади.

Изоҳ: №6 муҳитнинг ҳарорати текширилаётган препарат ёки аралашманинг барқарорлигига ва шу билан фаоллигига таъсир қилиши мумкин.

Юмшоқ агар: сув ҳаммомида эрийди ва 42°C га етказилади.

1. Градиентнинг тузилиши

Квадратнинг пастки четига бир текис жойлаштирилган ўнта бўлакни белгиланади.

Ликобчани нишаб қилиб жойлаштирилади чети 7 мм баланликда бўлиши керак. Ликобчани кўтариш учун таглик ёки бошқа текис буюмдан фойдаланиш мумкин. 25 мл илиқ ($\sim 56^{\circ}\text{C}$) LB агарни идишга танлаб олинган агентнинг тегишли концентрацияси билан яхшилаб аралаштирилади. Бу градиентнинг пастки қавати бўлади.

LB агарли Петри идишини тенг равишда қоплаганлигига ишонч ҳосил қилинади, бунда идишнинг баланд, белгиланган қисми ~ 1 мм LB агаридан иборат бўлса, пастки қисмида ~ 8 мм LB агар бўлсин. Кейин агарни 10-15 дақиқага қотишга қўйилади.

Изоҳ № 7: Препаратни ушлаб туриш ва бир текис тақсимланишини осонлаштириш учун LB агарига 0,2% сирт фаол моддалар (антикўпик Б эмулсияси) қўшилиши мумкин. Танланган воситани қўшишдан олдин кучли чайқатиш билан стерил LB агарига сирт фаол моддасини қўйилади. Сурфактантларнинг майда томчилари ножўя таъсирловчи сифатида тўхтатилиши керак, катта томчилар жуда иссиқдан ҳосил бўлиб, синов дори воситаларининг бир текис тақсимланишига тўсқинлик қилиши мумкин.

Биринчи 25 мл LB агар қаттиқлашгандан сўнг, идиш текис юзага ўтказилади. Кейинчалик, 25 мл LB агарини танлаб олинган дори воситаси бўлмаган ҳолда ҳам, LB агарнинг дастлабки юзасини қоплаш учун қўйилади. Бу градиентнинг юқори қатлами ҳисобланади. LB агарининг пастки қатламнинг бутун юзасини қоплаганлигига ишонч ҳосил қилинг. Шамоллатиш учун қопқоғини ёпилади ва 10-15 дақиқа давомида агарни қотишга солинади.

Изоҳ №8. Аэрозолнинг ҳавфлилиги ва синама таркибининг учувчан бўлиши мумкинлиги ҳақида огоҳ бўлинг; агар у кимёвий хавфсизлик талаблари билан белгиланган бўлса, градиентларни кимёвий ёки биологик хавфсизлик қутисида қўйинг.

Изоҳ №9: Градиентли идишлар 4 соат ичида препаратнинг градиенти концентрациясини ёки текшириладиган бирикманинг концентрацияни сақлаб қолиш учун ишлатилиб юборилиши керак.

Бактерияларнинг штаммга ўтказилиши

Юмшоқ агарни 42°C га етказилиши керак. 2 мл суюқ юмшоқ агарни 100 мм диаметрли Петри идишининг қопқоғига ёки тубига солинади. 40 мкл бактериал культурани юмшоқ агар ичига солинг ва кейин пластинкани силкитиб аралаштиринг.

Изоҳ № 10: Бактериал культуранинг ўсиш босқичида унга дори ёки ўрганиладиган бирикмаларига таъсир қилиши мумкин. Кундузги ва тунги ва стационар фазадаги культуралар бир хил натижаларга эришиш учун мунтазам кетма-кетлик билан ишлатилиши керак. Хужайра зичлиги ҳам нисбий натижаларни ўзгартириши мумкин, шунинг учун барча культуралар OD_{600} зичлиги қийматларига мос келиши учун суюлтирилиши керак. Тунги культуралар зичлиги OD_{600} да 1,0 дан кам бўлиши учун культураларни суюлтириш керак

Юмшоқ агар аралашмаси билан микроскопнинг буюм ойнасини узунасига ёпинг. Сўнгра, слайднинг қопланган четини пастки белгиси билан (паст даражадан юқори концентрацияга қадар) сенсор слайдни градиент ликобчаси юзасига текислаб, слайдни агар юзасига теккизилади. Секин тегиш юмшоқ агардан лентани градиент юзасига ўтказиш учун етарли. Кейин слайд тозалаш ва қайта фойдаланиш учун ажратилади.

Бактериал намуналарнинг қолган қисми учун ушбу жараёни такрорланади. Агар бир нечта градиент ишлаётган бўлса, намуналарни ҳар биир градиент идишга жойлаштирилиши керак.

Градиент ликобчани тунда 37°C га инкубация қилинг. Инкубация вақтлари ва ҳарорат турли хил бактериялар штаммлари учун фарқ қилиши мумкин, аммо тунда 37°C даги инкубация кўзга кўринадиган ўсиши учун етарлидир.

3. Ўсишни кўриш ва таҳлил қилиш

Тасвирлаш: Бир тунда ўсгандан сўнг, градиентлар тўғридан-тўғри тасвирланиши ёки фиксация қилиниши ва контрастни кучайтириш учун 95% этанол таркибида 0,2 мг / мл акридин оранж бўёғи эритмаси билан бўялиши

мумкин. Пластиналарни хона ҳароратида 5 минут давомида бўёвчи эритмада инкубация қилинади, сўнг 95% этанол билан ювилади ва кейин УБ нурли кутида тасвирга олинади.

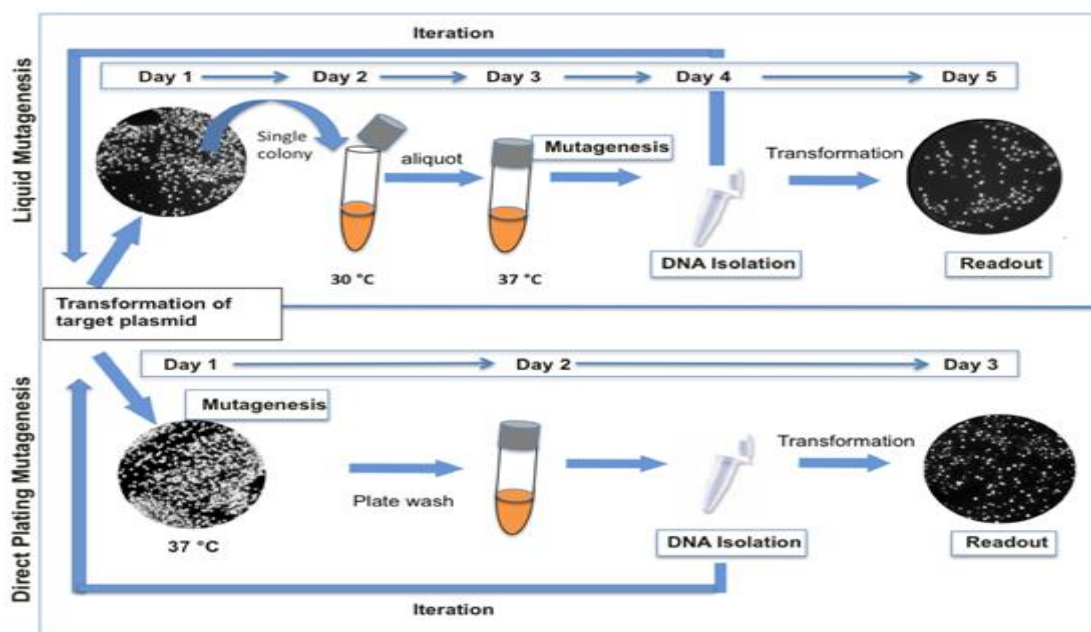
Изоҳ № 11: Колонияларни пластинкадан тозалашдан еҳтиёт бўлинг, бўёқ еритмаси ва ювиш воситаларини пластинка устидан силкитиб, эритмани бурчаклардан олиб ташланг.

Алоҳида мутант плазмидларнинг фенотипик таҳлили учун градиент концентрация нисбатан ўсиш масофаси ҳар бир градиент бўйича стандартгача нормаллаштирилади. Кейинчалик бу нисбий қийматларни градиентлар бўйича таққослаш мумкин.

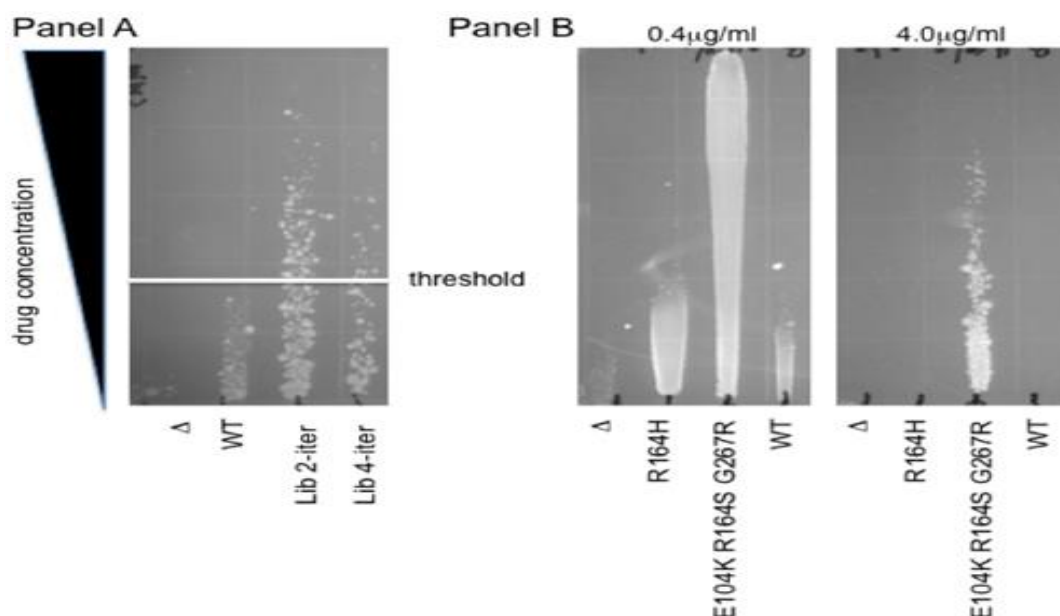
Изоҳ № 12: Цитотоксик таъсирнинг хусусиятига қараб, кучли ва ювилган томонни кузатиш мумкин (масалан, 2-расмда А ва Б панелларини солиштирилади). Ювилган четлари бўлса, мунтазам ўсиш чегарасини ўлчаш тавсия этилади, чунки алоҳида колониялар ўзгарувчанликни кўрсатишга мойилдирлар.

Библиотекани танлаш учун, ота-она ёввойи турига нисбатан юқори концентрацияларда ўсадиган алоҳида колонияларни бошқариш мутацияларни аниқлаш ажратиб олинади ва секвенирланади.

ИИИ.Мисоллари ва натижалар:



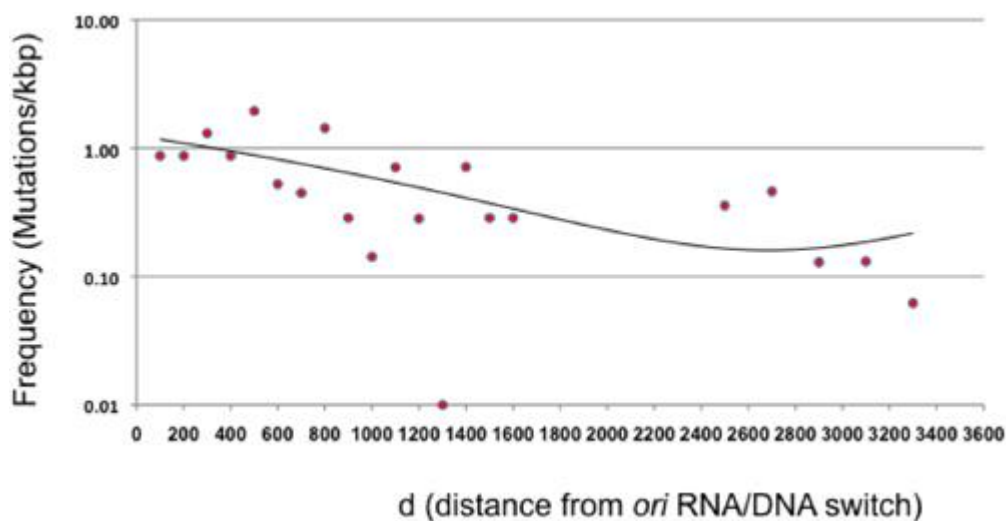
12-расм. Суюқ ва тўғридан-тўғри қоплама мутагенез протоколлари ўртасидаги таққослаш. Бу ерда тақдим етилган тўғридан-тўғри қоплама мутагенез протоколи тезроқ ва анъанавий суюқ мутагенез протоколи (юқоридаги) га қараганда бир оз кўпроқ қадам талаб қилади. *GFP* репортер сифатида ишлатилганда, флуоресценсиянинг ўзгариши библиотекада мавжуд бўлган ирсий хилма-хилликдан далолат беради. Одатда, мутагенезнинг бир цикли 12-18% колонияларда флуоресценсия даражасининг сезиларли даражада пасайишига олиб келади.



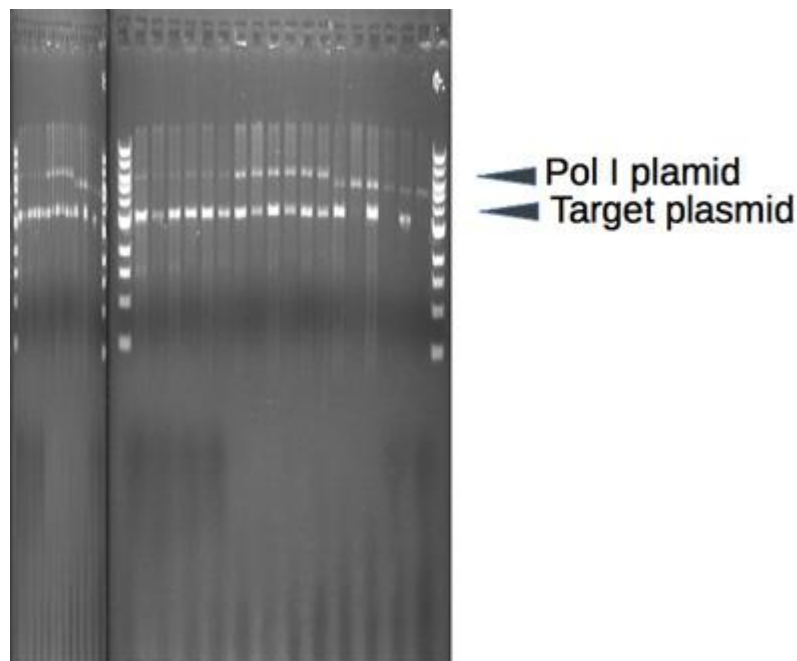
13-расм. Градиент қаршилиги таҳлили. Метил-Метанесулфонат (ММС) га юқори қаршилик кўрсатиш учун танлов гуруҳи. ММСга қаршилиқни кучайтириш учун одамдаги оксидловчи деметилаза АВН2 нинг плазмидли библиотекалари танланган. Мутагенез протоколининг икки ва тўртта итерациясини ифодаловчи иккита иккита библиотека ота-оналарнинг ёввойи тури (WT) ва бўш вектор (Δ) билан таққослаганда кўрсатилган. Оқ чизик юқорида кўрсатилган чегарани билдиради, бунда алоҳида мутант колониялари фенотипик таҳлил қилиш учун ажратилган. Б панелидаги цефотаксим ҳимояси, кенг спектрли β -лактамаза фаоллигини кўрсатади. Илгари LF- Pol I мутантлари азтрреонам селекцияси билан боғланган бета-лактамазанинг R164H ва E104K R164H G267R бўйича иккита мутанти 0,4кг / мл ва 4кг / мл цефотаксим градиентида кўрсатилган.

Эътибор беринг, ёввойи турдаги β -лактамаза ферменти бўш векторни ифода этувчи хужайраларга нисбатан ҳеч қандай ҳимояни амалга

оширмайди. Шунинг учун бу мутантлар янги биокимёвий фаолликка эга эволюцияни англатади.



14-расм. Мутация частотаси ори (д) дан масофа функцияси сифатида. Тўғридан-тўғри пластинка мутагенезининг бир циклидан сўнг юзага келадиган мутация частотаси кўпайтиришнинг ColEI келиб чиқиши РНК / ДНК калитига нисбатан 100 бп интервалда кўрсатилган. 1600 дан 2400 гача бўлган майдон кўрсатилмайди, чунки β -лактамаза нейтрал нишонни англатмайди. В-лактамазадан ташқаридаги нуқталар бу соҳада мутацияларнинг паст паст частотасини ҳисобга олган ҳолда 200 bp интервални билдиради. Тренинг ($P2 = 0.41$ бўлган биномиал тенглама) чизик сифатида кўрсатилган.



Қўшимча расм 15-расм. LF Pol I ўз ичига олган Pol I плазмиди. А кетма-кетлик (FastaА формат). Pol I плазмидини чизиш пайтида ҳам

интеграция учун (4-сонли тасодифий мутацион кутубхонани яратиш) ёки ўқиш (5-қадам) учун тўғри чеклаш ферментини аниқлаш учун кетма-кетлик ҳақидаги маълумот. Б Плазмиднинг умумий хусусиятлари ва чеклаш харитаси. Репликациянинг pCC101 келиб чиқиши, хлорамфеникол қаршилик кўрсаткичи (CAT) ва LF- Pol I гени кўрсатилган. Ягона чеклаш жойларининг жойлашуви ҳам кўрсатилган.

Саволлар

1. Йўналтирилган мутация нима?
2. Нима учун оксил муҳандислигида йўналтирилган мутациядан фойдаланилади?
3. Йўналтирилган мутацияни амалга ошириш босқичлари қандай?
4. Мутация частотасини қандай ошириш мумкин?

Адабиётлар

1. [file:///C:/Users/LinK/Desktop/Mutagenesis%20and%20Functional%20Selection%20Protocols%20for%20Directed%20Evolution%20of%20Proteins%20in%20E.%20coli%20%20Protocol%20\(Translated%20to%20Russian\).html](file:///C:/Users/LinK/Desktop/Mutagenesis%20and%20Functional%20Selection%20Protocols%20for%20Directed%20Evolution%20of%20Proteins%20in%20E.%20coli%20%20Protocol%20(Translated%20to%20Russian).html)
2. Camps, M. [*Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression*](#). Recent Pat DNA Gene Seq. **4**, 58-73 (2010).
3. Itoh, T., Tomizawa, J. [*Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H, and DNA polymerase I*](#). Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **43 Pt 1**, 409-417 (1979).
4. Polisky, B. [*ColE1 replication control circuitry: sense from antisense*](#). Cell. **55**, 929-932 (1988).
5. Camps, M., Naukkarinen, J., Johnson, B. P., Loeb, L. A. [*Targeted gene evolution in Escherichia coli using a highly error-prone DNA polymerase I*](#). Proc Natl Acad Sci U S A. **100**, 9727-9732 (2003).
6. Shinkai, A., Loeb, L. A. [*In vivo mutagenesis by Escherichia coli DNA polymerase I. Ile\(709\) in motif A functions in base selection*](#). J Biol Chem. **276**, 46759-46764 (2001).

7. Uyemura, D., Lehman, I. R. [Biochemical characterization of mutant forms of DNA polymerase I from Escherichia coli. I. The polA12 mutation.](#) J Biol Chem. **251**, 4078-4084 (1976).
8. Sedgwick, B., Robins, P., Lindahl, T. [Direct removal of alkylation damage from DNA by AlkB and related DNA dioxygenases.](#) Methods Enzymol. **408**, 108-120 (2006).
9. Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Mc, Q. G. S., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. [The 'evolvability' of promiscuous protein functions.](#) Nat Genet. **37**, 73-76 (2005).
10. Elena, S. F., Lenski, R. E. [Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation.](#) Nat Rev Genet. **4**, 457-469 (2003).
11. Itoh, T., Tomizawa, J. [Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H.](#) Proc Natl Acad Sci U S A. **77**, 2450-2454 (1980).
12. Bryan, S. K., Moses, R. E. [Sufficiency of the Klenow fragment for survival of polC\(Ts\) pcbA1 Escherichia coli at 43 degrees.](#) C. J Bacteriol. **170**, 456-458 (1988).

§ 6. ОҚСИЛЛАРНИНГ ПОСТРАНСЛЯЦИОН МОДИФИКАЦИЯСИНИНГ ИМИТАЦИЯ ҚИЛИШНИНГ КИМЁВИЙ УСУЛЛАРИ

(Ирсий ахборотнинг оқсил тилига таржима қилинганидан кейинги
ҳолатини моделлаштириш-ўхшатиш)

Оқсилларнинг пострансляцион модификацияси генлар экспрессиясининг муҳим босқичларидан биридир. Кўплаб эукариотик оқсиллар модификацияланган молекулалари функционал гуруҳларига ковалент бириккандан кейингина функционал фаоллашади. Бундан ташқари, фосфорилланиш ёки оқсил молекулаларини ацетилланиши каби пост-

трансляцион модификациялар уларнинг биологик фаоллигини тартибга солишнинг муҳим механизми ҳисобланади. Оксил фаоллигини уларнинг ковалент модификацияси таъсири остида тартибга солишнинг молекуляр механизмларини ўрганишга етарли модел тизимларининг йўқлиги тўққинлик қилмоқда. Масалан, махсус фосфорилланган оксилларни ишлаб чиқаришнинг стандарт усули - уларни субстратлар иштирокида тегишли оксил киназаси (протеинкиназа) билан инкубация қилиш ҳисобланади). Аммо, одатда, оксилнинг фосфорилланиш даражасини, шунингдек реакциянинг ўзига хос хусусиятларини бошқариш мумкин эмас.

Пост-трансляцион модификация - бу оксилнинг рибосомада синтезланганидан кейин ковалент кимёвий модификацияси ҳисобланади. Кўплаб оксиллар учун пост-трансляцион модификация биосинтезнинг якуний босқичи бўлган ген экспрессияси жараёнининг бир қисми ҳисобланади. Алтернатив сплайсинг билан бир қаторда, посттрансляцион (таржимадан кейинги ўзгаришлар) хужайрадаги оксилларнинг хилма-хиллигини оширади.

Бугунги кунга келиб, оксилларни трансляциядан кейинги модификациясининг икки юздан ортиқ вариантлари маълум ва, эҳтимол, оксилларнинг катта қисми модификацияга учрайди [2], бундан ташқари, бир хил оксил бир неча хил ўзгаришга дуч келиши мумкин. Посттрансляцион модификациялари оксилларга турли хил таъсир кўрсатади: уларнинг хужайрадаги мавжуд бўлиш вақтини, фермент фаоллигини ва бошқа оксиллар билан ўзаро муносабатларини тартибга солади. Бир қатор ҳолатларда, таржимадан кейинги ўзгаришлар оксил шаклланишининг мажбурий босқичидир, акс ҳолда у функционал жиҳатдан фаол бўлмайди. Масалан, инсулин ва бошқа баъзи гормонларнинг шаклланиш жараёнида полипептид занжирининг чекланган протеолизи талаб этилади, плазматик мембрана оксилларининг шаклланиши эса гликозилланишни талаб этилади.

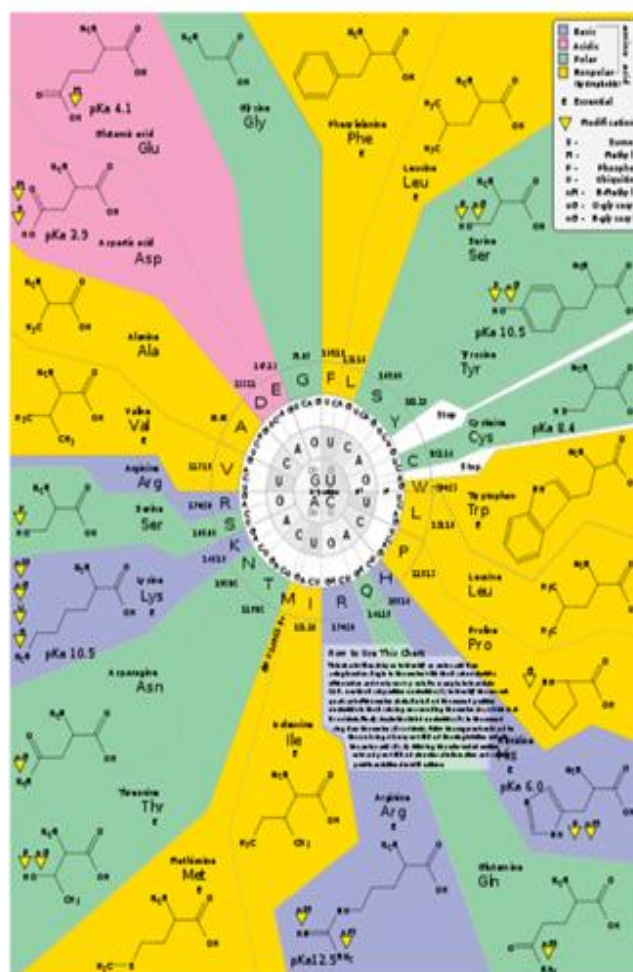
Посттрансляцион модификациялари ноёб бўлгангача кенг тарқалган ва ноёб бўлиши мумкин. Масалан, гликозилланиш энг кенг тарқалган

модификациялардан биридир: одам оқсилларининг ярми гликозилланади деб тахмин қилинади ва одамларнинг генларининг 1-2% гликозилланиш билан боғлиқ оқсилларни кодлайди [3]. Камёб модификацияга тирозин / детерозинланиш ва тубулиннинг полиглюкозилланиши киради [4].

Организмнинг нормал ишлаши учун пострансляцион модификациянинг ғоят муҳимлиги, пост-трансляцион оқсил модификацияси тизимининг бузилиши (муколипидоз, Алцгеймер касаллиги, саратоннинг ҳар хил турлари) асосидаги касалликлар мавжудлиги билан тасдиқланади. Бугунги кунга келиб, пост-трансляцион модификацияни ўрганиш учун масс спектрометрия ва Вестерн-блоттинг усуллари қўлланилади.

Оқсилларнинг пострансляцион модификацияси

- гликозилланиш
 - N- гликозилланиш
 - O- гликозилланиш
- гидроксилланиш
- ацетилланиш
- метилланиш
- γ- карбоксилланиш
- O- сульфаниланиш
- фосфорилланиш
- йодирланиш
- оксидланиш
- гликирланиш
- дисульфид боғлар ҳосил бўлиши
- деиминланиш
- карбомоирлиланиш
- дезамидирланиш



16 –расм. Оқсилларнинг пострансляцион модификацияси йўллари.

In vitro трансляция

In vitro қуйидаги усул бўйича амалга оширилади [5]. Матрица сифатда Нурланувчи қўнғизларнинг люцефразасининг мРНК си, *E. coli* нинг S100 экстракти ва ёввойи типдаги хужайралардан ажратиб олинган рибосомалар ва *ΔrimK* ишлатилади.

Реакция аралашмасининг таркиби:

- 1) *E.coli*нинг S100 экстракт – 3 мкл;
- 2) *A эритмасы* – 4мкл;
- 3) рибосомалар – 5 нмоль;
- 4) мРНК – 100 нмоль;
- 5) рибосомаларни ажратиш учун боғловчи буфер - умумий ҳажмнинг 10 мкл гача.

Реакция аралашмаси 37 ° C да 10 дақиқа давомида инкубация қилинади.

Реакцияни реакция аралашмасига рибонуклеаза қўшилиши билан тўхтатилади.

Люцефераза фаоллигини таҳлил қилиш учун тавсия этилган протоколлар ва люцефразани таҳлил қилиш учун реактивлар тўпламидан фойдаланилади.

10 мкл учун реакция аралашмасига 50 мкл Promega қўшилади.

Victor, Perkin-Elmer қурилмасида люминесценцияни ўлчанади.

In vitro да S6 оксилени модификация қилиш-ўзгартириш

Реакция аралашмаси қуйидагича тузилади:

1) тахмин қилинадиган субстрат (умумий 70S, 30S ёки 100S рибосомалар,

Рибосомалоқсил ёки S30 экстракт) – таркибида 10 нмол S6 оксилени ўз ичига олади.

2) RimK ферменти - 1 нмол;

3) АТФ - 1 мкл (100 нмол);

4) C¹⁴ нишонланган глютамин кислотаси - 5 мкл (1 нмол);

5) реакция буфери - умумий ҳажмнинг 20 мклигача.

Аралашмани аралаштирилади ва 1 соат давомида 37°C да инкубация қилинади. Шундан сўнг аралашмага ПААГ учун намуна тайёрлаш учун 5 мкл 5X буфер қўшилади ва инкубация 95°C да 5 дақиқа қилинади

Саволлар

1. Оқсилларнинг посттрансляцион модификациясининг қандай йўллари биласиз?
2. *In vitro* да S6 оқсилни модификация қилиш боқичлари нималардан иборат?
3. Люцефераза ферменти тўғрисида нималарни биласиз?
4. У нима учун ишлатилади?

Адабиётлар

1. Gramatikoff K. in Abgent Catalog (2004-5) p.263
2. ↑ *Jensen, O. N.* Interpreting the protein language using proteomics (англ.) // *Nat Rev Mol Cell Biol* : journal. — 2006. — Vol. 7. — P. 391—403. — doi:10.1038/nrm1939. — PMID 16723975.
3. ↑ *Walsh, G. and Jefferis, R.* Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins (англ.) // *Nature Biotechnology* : journal. — Nature Publishing Group, 2006. — Vol. 24. — P. 1241—1252. — doi:10.1038/nbt1252. — PMID 17033665.
4. ↑ *Rosenbaum, J.* Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last (англ.) // *Curr Biol* : journal. — 2000. — Vol. 10. — P. 801—803. — doi:10.1016/S0960-9822(00)00767-3. — PMID 11084355.
5. M.S. Svetlov, A. Kommer, V.A. Kolb, A.S. Spirin. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. P. 242-247.
6. <https://ru.wikipedia.org/wiki>

§7. ФЕРМЕНТЛАРНИ АЖРАТИБ ОЛИШ (ФЛУОРЕСЦЕНТ ОҚСИЛЛАР МИСОЛИДА). ФЛУОРЕСЦЕНТ ТАҲЛИЛ

ФЛУОРЕСЦЕНТ таҳлили жуда юқори сезгирликка эга бўлиб, 0,5 мкг гача оқсилни аниқлашга имкон беради. Таҳлил қилиш учун флуориметр талаб қилинади (филтрли флуориметрдан фойдаланиш етарлидир). Қуйидаги

тажрибага мувофиқ оқсилни аниқлашнинг сезгирлигини янада ошириш, оқсил билан боғланмаган бўёқни гел филтрлаш орқали олиб ташлаш мумкин. Бироқ, бу айниқса, мунтазам таҳлилда жараёни мураккаблаштиради ва фақат автоматик режимда олиб борилгандагина ўзини оқлайди. Варбург ва Кристиан (1941) усулига биноан оқсил ва нуклеин кислоталарни ультрабинафша нурларни ютилилиш қисми орқали аниқланади.

280 нм даги ютилиш кўрсаткичини 280 ва 260 нм ютилиш кўрсаткичидаги ютилиш коэффициентига нисбатан кўпайтириш, билан аниқланадиган оқсил концентрацияси аниқланади:

$$A = -\log (I/I_0) = \varepsilon cd$$

$$A_{280} \times f_p = \text{МГ}$$

оқсил / мл

Варбург ва Кристиан (1941) маълумотларига кўра, ультрабинафша минтақада ютилиши бўйича оқсил ва нуклеин кислота миқдорини аниқлаш. 280 нмдаги ютиш қобилиятини f_p омилга кўпайтириб, 280 ва 260 нм ютилиш нисбати ва юқоридаги формула бўйича оқсилнинг концентрацияси аниқланади (1-жадвал).

Оқсил концентрациясини ҳисоблаш жадвали.

Ютилиш нисбати 280/260 нм	Нуклеин кислота, %	Коэффициент f_p
1,75	0	1,10
1,60	0,25	1,07
1,50	0,50	1,05
1,40	0,75	1,02
1,30	1,00	0,99
1,25	1,25	0,97
1,20	1,50	0,95
1,15	2,00	0,91
1,10	2,50	0,87
1,05	3,00	0,83
1,00	3,50	0,80
0,96	3,75	0,78
0,92	4,25	0,75
0,88	5,00	0,71
0,86	5,25	0,70
0,84	5,50	0,69
0,82	6,00	0,67
0,80	6,50	0,64
0,78	7,25	0,62
0,76	8,00	0,59
0,74	8,75	0,56
0,72	9,50	0,54
0,70	10,75	0,51
0,68	12,00	0,48
0,66	13,50	0,45
0,65	14,50	0,43
0,64	15,25	0,41
0,62	17,50	0,38
0,60	20,00	0,35
0,49	100,00	

Керакли реактивлар:

1. 0,05 М натрий фосфат, рН 8,0
2. Флуорескамин эритмаси (100 мл диоксанда 30 мг)
3. Калибрлаш эгри чизигини қуриш учун БЗА эритмаси 1 мг / мл.
- 4.

Ишнинг бориши

Оқсил эритмаси (10-250 мкл) 0,05 М натрий фосфат, рН 8, флуорескамин эритмаси қўшилади ва кучли силкитилади. Флюоресценцияни 475 нм (қўзғалган тўлқин узунлиги 390 нм) билан ўлчанади. Оқсил миқдорини аниқлаш учун стандарт калибрлаш эгридан фойдаланилади.

Адабиётлар

1. Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W., and Udenfriend, S. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 213-220.

Саволлар

1. ФЛУОРЕСЦЕНТ таҳлил нима?
2. Қачон ФЛУОРЕСЦЕНТ таҳлилдан фойдаланилади?
3. Қандай қилиб оқсилларнинг концентрациясини таҳлилини ўтказиш мумкин?

§8. ФЕРМЕНТЛАРНИНГ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ УСУЛЛАРИ

Ферментатив фаоллигини ҳисоблаш

Ферментатив фаоллик куйидаги формула бўйича ҳисобланади.

$$\frac{\text{Фаоллик бирликлари}}{\text{фермент эритмаси мл}} =$$

$$\frac{\text{ўлчанган катталиқ} \times \text{реакция аралашмаси ҳажми} \times \text{суюлтириш концентрацияси (СФ)}}{\text{вақт} \times \text{концентрацион константа} \times \text{фермент ҳажми}} =$$

$$\frac{\text{вақт бирлигида ютилиши} \times \text{реакция аралашмаси ҳажми} \times (\text{СФ})}{\text{ютилиш коэффициенти} \times \text{фермент ҳажми}}$$

Каталларда ёки халқаро бирликларда бу ифода куйидаги кўринишда ифода этилади.

$$\frac{\text{Катал}}{\text{фермент эритмаси}} = \frac{(\Delta A / c \times \text{реакция аралашмаси ҳажми (мл) } \times \text{СФ}) \times 10^6}{(\epsilon \times n \times (\text{л} \times \text{моль}^{-1}) \times \text{см}^{-1} \times \text{фермент ҳажми (мл)} \times \text{мл фермент эритмаси})} =$$

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{реакция аралашмас ҳажми мл}}{(\epsilon \times n \times (\text{л} \times \text{моль}^{-1}) \times \text{см}^{-1} \times \text{фермент ҳажми (мл)})} \times \frac{\text{СФ} \times 10\,000}{(\epsilon \times n \times (\text{л} \times \text{моль}^{-1}) \times \text{см}^{-1} \times \text{фермент ҳажми (мл)})}$$

Бунда ферментатив реакция кечишини мунтазам оптик ёки спектроскопик усул ёрдамида мунтазам кузатиб бориш мумкин, деб ҳисобланади. Фақат биргина ўлчамга асосланган тажрибаларда ҳисоблар учун ушбу ягона ўлчов кўрсаткичи ва назорат кўрсаткичи ўртасидаги тафовут инобатга олинади.

Масалан, ферментатив реакцияни 10 минутдан кейин тўхтатилса, $A=0,71$ да назоратдаги аралашмада ютилиш кўрсаткичи 0,16 бўлса, $\Delta \frac{A}{\text{мин}} = 0,055$ бўлиб, бунинг асосида фермент фаоллигини юқорида келтирилгани каби аниқлаш мумкин.

Бу мулоҳаза агар бутун ўлчаш давомида барча реакция чизиқли кечса, ушбу мулоҳаза ўринли бўлади, акс ҳолда бошланғич тезлик топилган катталиқнинг ўндан бирига тенг келмасдан, балки ундан бирмунча катта бўлади. Шунинг учун танлаб олинган жойнинг чизиқли эканлигини текшириш учун турли вақт оралиғида бир неча тажриба нуқталарини аниқлаш талаб этилади.

Ферментатив фаолликни ифодалашнинг иккита асосий усули мавжуд. Ҳажм бирлигидаги фаоллик (1 мл да) фермент эритмасининг умумий ҳажмига кўпайтирилганда ферментнинг умумий фаоллиги аниқланади. Бу кўрсаткични, масалан, фермент ажратиб олишда ферментни тозалашнинг кетма-кет босқичларида таққослаш учун билиш талаб этилади. Тозалашнинг турли босқичларида фермент эритмаси ҳажми турлича бўлади. Ҳар бир босқичдаги фаолликни йўқолиши фермент чиқими фоизларда ифодаланиб, хужайраларни ёриш орқали олинган дағал экстракт 100% деб биринчи муайян кўрсаткични қабул қилинади.

Ферментатив фаолликни дастлабки миқдорини оксил миқдорига бўлиш (мг да) нисбий фермент фаоллигини беради. Ферментнинг максимал нисбий фаоллигига фермент фаоллиги тўлиқ сақланиб қолиб, бошқа бегона оксиллар аралашмалар, оксилни аниқлаш учун қўлланиладиган усулларда билинмайдиган, нуклеин кислоталардан ҳам холи бўлганда эришилади. Ушбу оптимал кўрсаткич ҳар бир фермент учун эмпирик ҳисобланади, чунки нисбий фаолликни аниқлашнинг умумий стандарт кўрсаткичи мавжуд эмас.

Ҳаттоки электрофорез натижасига кўра, бегона аралашма сақламайдиган ферментлар ҳам қисман денатурацияга учраган кучсизланган ёки умуман фаоллигини йўқотган оксилнинг муайян қисмини сақлайди. Шу боис, бир хилдаги тозалик даражасига эга ферментлар ҳам нисбий фаоллиги бўйича фарқ қилиши мумкин.

Нисбий фаолликнинг оксилни тозалашни муайян босқичида олинган оптимал кўрсаткичга яқин келиши бу тозалаш босқичининг самарадорлигидан далолат беради. Оксилни ажратиб олишда ушбу кўрсаткични оксилнинг тозалик даражаси деб аталади.

Каталитик константа реакциясининг максимал тезлигини ферментнинг умумий концентрациясига бўлиш йўли билан аниқланади $K_{cat} = V_{max} / [E]_0$; биринчи тартиб реакция тезлиги константаси каби, каталитик константа ҳам ўлчовга эга $k_{cat}/\text{моль}=\text{с}^{-1}$.

Фермент айланмаси сони каталитик константани акс эттириб, фермент молекуласидаги фаол марказлар сонига бўлинган бўлади. (мономерли ферментлар учун айланмалар сони каталитик константага тенг). Мазкур кўрсаткич ферментнинг фаол марказида бир секундда қайтарилган субстратнинг Мол сонини кўрсатади. Турли хил ферментлар учун айланмалар сони мутлақо фарқ қилади: 20 сукцинатдегидрогеназа учун, 210 β-галактозидаза учун, 330 гексокиназа учун, 1500 холинэстераза учун, 90000 каталаза учун ва 600000 с^{-1} карбогидраза учун.

Михаэлис константасига нисбатан каталитик константани аниқлашни катализ эффекти деб аталади. Бу муносабат иккинчи тартиб реакциялари

тезлиги константаси билан ўлчамга эга ва ферментнинг субстратга нисбатан спецификлигининг кўрсаткичи ҳисобланиб, кўрсаткич қанча катта бўлса, унинг спецификлиги юқори бўлади.

Фермент фаоллигини аниқлаш

Ферментнинг фаоллиги (МЕ, 1 М Е ~ 16, 67 н кат) детекция – аниқлашнинг фотометрик усулда ҳисобланиб, қуйидаги тенгламалар билан ифода этилади.

Ҳажм бирлигидаги фаоллик (бирлик. мл):

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{реакция эритмаси ҳажми} \times \text{суюлтириш коэффиценти}}{\text{ютилиш коэффиценти} \times \text{оптик йўли узунлиги}} - \text{фермент эритмаси ҳажми}$$

Нисбий фаоллик: (бир/мг):

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{реакция эритмаси ҳажми} \times \text{суюлтириш коэффиценти}}{\text{Ютилиш коэффиценти} \times \text{оптик йўли узунлиги} \times \text{фермент эритмаси ҳажми} \times \text{мг оқсил} / \text{мл}}$$

Агар аниқлашнинг бошқа усуллари қўлланилса, ΔA нинг ютилиш ўзгариши ва ютилиш коэффиценти ўрнига бошқа катталиклар ва пропорционалликнинг бошқа омилларидан фойдаланилади.

Қуйида келтирилган оптик аниқлаш усулларида реакция аралашмасининг ҳажми 1 мл ни, фермент ҳажми 0,02 мл ни, оптик йўл узунлиги -1 см ни ташкил этиб, бу тенгламалар қуйидаги кўринишни олади:

Ҳажм бирлигидаги фаоллик (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{суюлтириш коэффиценти}}{\text{суюлтириш коэффиценти} \times 0,02}$$

Нисбий фаоллик (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{суюлтириш коэффиценти}}{\text{ютилиш коэффиценти} \times 0,02 \times \text{мг оқсил} / \text{мл}}$$

Саволлар

1. Ферментлар фаоллигини аниқлаш учун қайси формуладан фойдаланилади?
2. Ферментатив фаолликни дастлабки миқдорини оксил миқдорига бўлиш нимани беради?
3. Катализ эффекти нима?
4. Ферментнинг фаоллиги детекцияси нима?

Адабиёт

1. Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).

§ 9. ОКСИЛЛАРНИНГ КОНЦЕНТРАЦИЯСИНИ БИУРЕТ РЕАКЦИЯСИДА АНИҚЛАШ

Биурет реагенти пептид боғлар билан ўзаро таъсир қилади ва шунинг учун оксиллар концентрациясини аниқлаш учун ўзига хос реагент бўлиб, бошқа моддалар мавжудлигига нисбатан сезгир эмасдир. Истисно – сифатида мочевино ва буферлар ҳисобланади. Гуда (цвиттер- ионлар асосидаги буферлар) ва Трис биурет реактиви билан ижобий реакция беради.

Аммо, бу усул жуда сезгир эмас (0,1-0,8 мг) ва жуда кўп оксил бўлишини талаб қилади. Мазкур усул дағал экстракт таркибидаги оксил концентрациясини аниқлаш учун, шунингдек катта ҳажмда ажратиб олинган оксил маҳсулотлари учун қулайдир, аммо уни қимматли фермент препаратлари концентрациясини аниқлаш учун ишлатиш тавсия этилмайди.

Оксилларни ажратишда доимо концентрацияни аниқлаш учун бир хил усулдан фойдаланиш керак, чунки бошидан шу усулни ёки бошқа усулни ишлатиш талаб этилади.

Оксиллар концентрациясини аниқлаш Биурет реакцияси Керакли эритмалар

А эритма (биуретולי реагент)
 400 мл дистиλλанган сувда қўйидаги моддаларни бирин-кетинликда эритилади:
 9,0 г натрий-калий тарtrat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, Mr 282,2)
 3,0 г мис сульфат ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Mr 249,7)
 8,0 г натрий гидроксиди (NaOH, Mr 40,0)
 5,0 г калий йодид (KI, Mr 166,0)
 Кейин дистиλλанган сув H_2O нинг ҳажми 500 мл га етказилади.
Б эритма
 3 М учхлоруксирка кислотаси (ТХУ, $C_2HCl_3O_2$ ва Mr 163,4; 49 г дистиλλанган су 100 мл етказилади)
В эритма
 20 мг/мл БЗА (буқа зардоби альбумини) нинг сувдаги эритмаси ни калибровка эгри чизигини тузиш учун ишлатилади. А ва Б эритмасини хона ҳароратида ойлаб сақланса, БЗЭ ни музлатилган ҳолда 20 °C да сақланади.

Ишнинг бориши

Оқсил намунасининг 10 до 50 мг оқсил/мг сақловчи турли хил миқдорларини (0,01-0,1 мл), 1 мл ҳажмгача сув билан суюлтирилади. Солиштириш эритмаси сифатида 1 мл сувдан фойдаланилади.

Ферментатив реактивларга 0,15 мл 3 М УХС (уч хлор сирка кислотаси) қўшилади ва 3 дақиқа давомида 5000 айл./дақ тезликда центрифуга қилинади.

Супернатантни тўкиб ташланади ва эритмани 1 мл биурет реагенти билан эритилади. Эритмани 30 дақиқага хона ҳароратида қолдирилади, кейин 540 нм тўлқин узунлигида кичик ҳажмдаги кюветаларда солиштира эритмага нисбатан ўлчаб олинади. Оқсилнинг концентрациясини БЗА га нисбатан тузилган калибровка эгри чизигида қўйидаги тенглама асосида аниқлаш мумкин.

$$\text{Оқсил (мг/мл)} = A546 \times 3,01 / \text{оқсил эритмаси ҳажми (мл)}$$

Адабиётлар

1. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Вьcher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., and Pfeleiderer, G. (1953)
2. Z. Naturforsch. 8b, 555-577.
3. Itzhaki, R.F. and Gill, D.M. (1964) Anal. Biochem. 9, 401-410.

Саволлар

1. Биурет реакцияси нимага асосланади?
2. Реакция учун қандай материаллардан фойдаланилади?
3. Оқсилнинг концентрациясини қандай аниқланади?
4. Оқсилнинг концентрациясини аниқлашда колибровка эгри чизиғини нима асосда қурилади?

§10. ОҚСИЛЛАРНИ АНИҚЛАШНИНГ ЛОУРИ УСУЛИ

Ушбу усул оқсил концентрациясини аниқлашнинг энг сезгир усулларида биридир. Аммо, кўплаб моддалар масалан, ЕДТА, сахароза, глицин, Трис, детергентлар (SDS, Тритон X-100, Lubrol, Brij 35, Chaps), шунингдек ноорганик тузлар (аммоний сульфат > 28 мМ, натрий фосфат > 0,1 М, натрий ацетат > 0,2М) кабиларнинг жуда паст концентрацияси ҳам оқсил концентрациясини аниқлашга тўсқинлик қилади. Усулнинг яна бир камчилиги шундан иборатки, бу оқсил концентрациясидан ютилишнинг чекланган чизиқли оралиғига боғлиқлигидир. Шунга ишонч ҳосил қилиш керакки, номаълум намуна учун олинган қийматлар, одатда, БЗА учун қурилган калибрлаш эгри чизиғида ичида бўлиши лозим.

Зарурий эритмалар

***А эритма.** Карбонат буфери*

0,4 г натрий тартрат ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$, Mr 230,1)

20 г $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ (Mr 124,0)

100 мл 1 Н да. 1 н. NaOH билан эритилади ва

200 мл гача сув билан суюлтирилади.

***Б. Эритма** Мис тартратнинг ишқорий эритмаси*

2,0 г натрий-калий тартрат ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, Mr 282,2)

1 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Mr 249,7 90 мл сувда эритиб олинади ва 10 мл 1 н. NaOH қўйилади.

***В эритма.** суюлтирилган Фолин -Чокалтеу реактиви*

1 қисм Фолина-Чокалтеу реактиви + 15 қисм сув

Г эритмаси

Калибрлаш эгри чизиғини қуриш учун БЗА нинг 1 мг / мл сувдаги эритмаси.

А ва Б эритмалари хона ҳароратида сақланади, В эритма таҳлил куни тайёрланади, БЗА эритмаси -20 ° С да музлатилган ҳолда сақланади.

Аниқлаш жараёни

Оқсил эритмасида 4-40 микрограмм оқсил бўлиши керак; эритма ҳажми сув билан 0,3 мл га етказилади, кейин 0,3 мл А эритма қўшилади, сўнгра 50°C да 10 минут давомида инкубация қилинади, ва уни хона ҳароратида совутилади.

Шундан сўнг ҳароратда, 0,33 мкл В эритмасини қўшилади ва хона ҳароратида 10 дақиқага қолдирилади.

Кейин 1 мл В эритмасини қўшилади ва дарҳол аралаштирилади, 50°C даража ҳароратда 10 дақиқа давомида инкубация қилинади. Сўнг уни хона ҳароратида совутилади ва 650 нм тўлқин узунлигида ютилиш миқдорини ўлчанади.

Калибрлаш эгри чизиг'ни қуриш

Эгри чизикни қуриш қийматларини намуналарни таҳлил қилиш билан бир хил тарзда олинади: БЗА эритмасидан 0 дан 40 мкл гача бўлган 12 та намунадан фойдаланилади.

Адабиётлар

1. Lowry, J.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
2. Peterson, G.L. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 201-220.

Саволлар

1. Оқсил концентрациясини аниқлашнинг Лоури усулининг бошқа усуллардан фарқи нимада?
2. Лоури усулида қандай реактивлардан фойдаланилади?
3. Калибрлаш эгри чизиг'ни қуриш қандай амалга оширилади?

§11 . КУМАССИ ЁРДАМИДА ОҚСИЛ ОНЦЕНТРАЦИЯСИНИ АНИҚЛАШ (БРАДФОРД УСУЛИ)

Кумасси бўёғидан фойдаланиб оқсилни аниқлаш усули дастлаб электрофоретик ажралишдан кейин гелда оқсил чизиқларини бўяш учун таклиф қилинган. Кислотали муҳитда Кумасси G-250 бўёқлари оқсилларга мустаҳкам боғланади; бу ҳолда максимал ютилиш кўрсаткичи 465 дан 595 нм гача ўзгаради. Ушбу усул оддий, тезкор ва қўшимча моддалар мавжудлигига нисбатан сезгир эмас (детергентлардан ташқари).

Тритон X-100 ва натрий додецил сульфат). Боғлашнинг кучи ва ўз навбатида бўяшнинг интенсивлиги муайян оқсилга боғлиқ. Шу сабабли, БЗА ёрдамида тузилган калибрлаш эгри чизиғи фақат тахминий маълумотларни олишга имкон беради ва вариациялар эҳтимоли 50% дан ошади; усулнинг сезгирлиги 10–100 мкгни ташкил қилади, аммо ушбу усулнинг минималлаштирилган қилинган вариантыда атиги 2 мкг оқсилни аниқлаш мумкин. Ушбу усулнинг камчилиги шундаки, кюветалар кўк рангда бўяшлиши мумкин, аммо бир мартали ишлатиладиган пластик кюветалардан фойдаланиш мумкин. Шиша кюветаларни ацетон билан ювилиши ёки 0,1 М 0,1 М HCl ичида бир неча соат давомида сақлаб турилиши мумкин.

Кумасси эритмасини тайёрлаш

100 мг Кумасси бриллиант кўки G-250 ни 50 мл этанолда эритиб, 100 мл 85% фосфор кислотасини (88%) қўшилади. Олинган эритмани 1 литр ҳажмгача суюлтирилади.

Филтрланади ва бир неча ҳафта давомида хона ҳароратида сақланади.

Аниқлаш жараёни

0 (солиштира эритма) ёки 2–40 мкг оқсил бўлган (0-50 мкл) ли намуналарни 50 мкл гача сув билан суюлтирилади, сўнгра 0,95 мл Кумасси эритмаси қўшиб аралаштирилади.

Тайёрланган намуналардаги оксил концентрациясини 2 дақиқадан сўнг (лекин 1 соатдан кечиктирмасдан), оксил ўрнига буфер эритмасини ўз ичига олган мос солиштира эритмага нисбатан 595 нм ютилиш даражасига нисбатан аниқланади. Оксил миқдори бир хил концентрация оралиғида БЗА учун мўлжалланган калибрлаш эгри чизиғи билан аниқланади.

Адабиётлар

1. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
2. Friedenauer, S., Berlet, H.H. (1989) *Anal. Biochem.* 178, 263-268.

Саволлар

1. Бадфорд усулининг моҳияти нимадан иборат?
2. Мазкур усулда қандай эритмалардан фойдаланилади?
3. Кумасси нима?
4. Кумасси билан оксилни аниқлаш жараёни қандай амалга оширилади?

§11. ОКСИЛЛАР КОНЦЕНТРАЦИЯСИНИ ЭРИТМАНИНГ ЮТИШИГА КЎРА АНИҚЛАШ

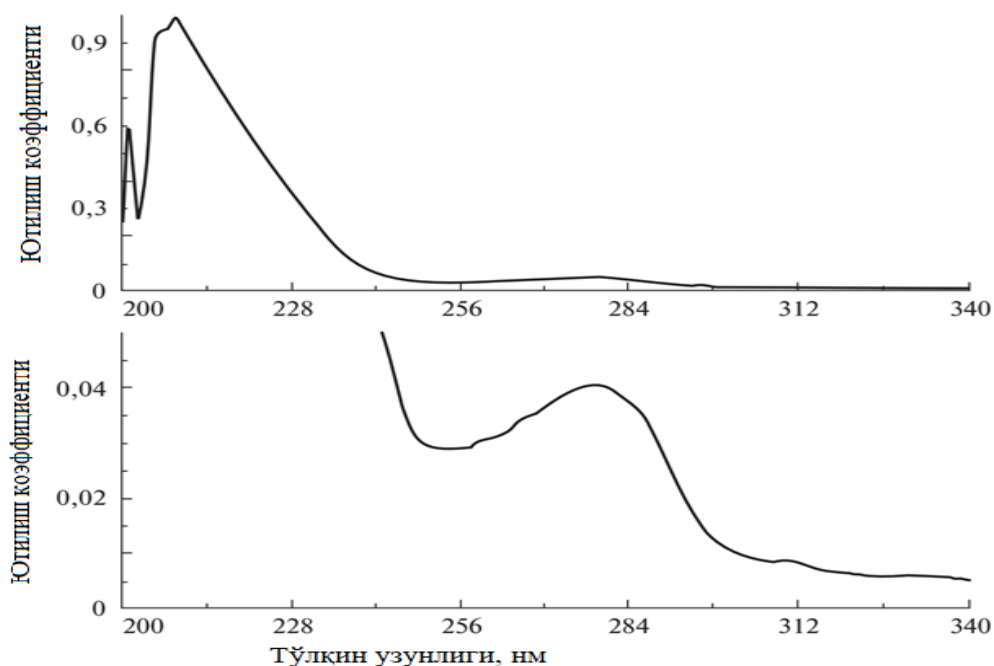
Ушбу таҳлил усулининг принципини тушуниш учун ҳужайрада ва ўз навбатида дағал ҳужайра экстрактларида мавжуд бўлган оксиллар ва бошқа моддаларнинг, айниқса, нуклеин кислоталарнинг спектрал хусусиятлари ҳақида тасаввурга эга бўлиш муҳимдир.

Оксиллар бирламчи кетма-кетликлари билан бир-биридан жуда катта фарқ қилсада, уларнинг барчаси деярли Ёлқинни бир хил ютиш спектрларига эга. Ушбу спектрлардаги УБ -қисмда иккита характерли чўққиларни ажратиб кўрсатиш мумкин: уларнинг юқори интенсивлиги 210 нм ва энг паст интенсивлиги 280 нм. Ушбу охириги чўққига учта ароматик аминокислоталар - фенилаланиннинг ютилиш (максимал тўлқин узунлиги 257 нм), тирозин (274,6 нм) ва триптофан (280 нм) чўққилари киради.

Ушбу аминокислоталар чўққиларининг интенсивлиги нисбати куйидагича: 1: 7.2: 28.4; Шундай қилиб, умумий чўққига максимал

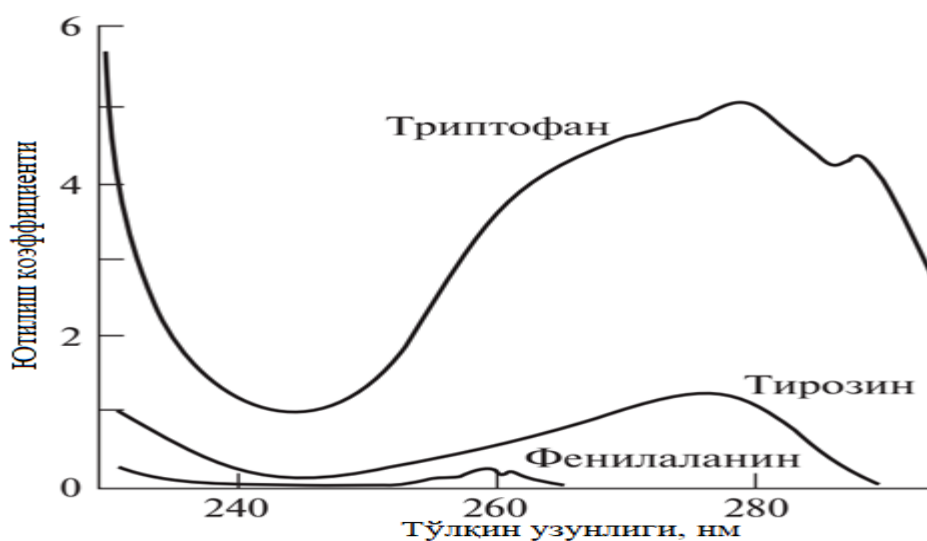
ютилишҳиссаси триптофанга тўғри келиб, фенилаланиннинг ҳиссаси эса эътиборга олинмаслиги ҳам мумкин.

Юқорида келтирилган аминокислоталар ҳақида улар оқсилда мавжуд бўлгандагина фикр юритиш тўғри бўлади. Бунга қарама-қарши фикр ҳам ҳақиқатга яқиндар: 280 нм максимал ютилиш коэффицентининг мавжудлиги намунадаги триптофаннинг борлигидан далолат беради.



17 расм. Буқа зардобы албуминининг ютилиш спектри.

Пастки спектр курилманинг юқори сезувчанлигида 280 нм пикни кўрсатиш (визуализация қилиш) учун олинган



18-расм. Уч хил ароматик аминокислоталарнинг ютилиш спектрлари.

Адабиёт

1. Warburg, O., Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384_421
2. Brand, L. and Withold, B. (1967)
3. *Methods Enzymol.* 11, 776856 Stryer, L. (1968) *Science* 162, 526533

Саволлар

1. Оқсиллар концентрациясини эритманинг ютишига кўра аниқлаш қандай амалга оширилади?
2. Ароматик аминокислоталар чўққиларининг интенсивлиги нисбати қандай аниқланади?

§12. ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИШНИНГ ПРЕЦИПИТАЦИЯ УСУЛИ

Оқсилларни концентрлашнинг энг аввалги усули бўлиб, ҳозирда ҳам кенг қўлланилади, чунки чўктириш билан бир вақтда концентрлаш ва намунани тозалаш имконини беради. Жиддий камчилиги шундаки, намунани чўктиришда унда структуравий ўзаришлар келиб чиқиб, ҳар доим ҳам чўктирувчи модда олиб ташлангандан кейин уни орқага қайтаришнинг имкони бўлавермайди.

Шунга қарамасдан полифермент комплекслар каби мураккаб тизимларни ушду усулда фаоллигини деярли ўзгаришларсиз концентрлашга муваффақ бўлинган. Агар намуна чўктириш давомида сезиларли ўзгаришга учрамаса, уни концентрлаш учун ишлатса бўлади.

Илгари ушбу усулнинг бир неча вариантлари қўлланилган (асосан, намуналарни тозалашда), чунки унда ажратиш олишнинг бир мунча нозик ва аниқ усули – юқори самарадор хромотаграфия ҳали кашф этилмаган эди.

Фермент перпаратларини тозалаш ва концентрлашда органик эритувчилардан, жумладан, ацетон ва этил спиртидан) фойдаланилган бўлиб, рН ни пасайтириш ва ҳароратни ошириш ҳисобига амалга оширилган. Бу усулларни ҳозирда қўлланилмайди. Чунки улар қўлланилганда ферментларнинг денатурацияси кузатилади. Истисно сифатида оқсилни рН

кўрсаткичи бўйича изоэлектрик нуқтасига мос келадиган бўлганда мувофиқ келадиган преципитацияга эришилади. Бунда ҳар био оксил сувда минимал эрувчанликка эга бўлади. Хлор ва хлорсирка кислотаси оксилнинг қайтмас денатурациясини келтириб чиқаради ва улар эритмадан оксилни йўқотиш, масалан, унинг концентрациясини аниқлаш учунгина қўл келади.

Аксинча хаотроп воситалар билан чўктириш ҳозиргача кенг қўлланилиб келинмоқда. Бунда мочевина (концентрацияси 6-8 М) ва гуанидин хлорид (бу самарага эришиш учун унинг бирмунча паст -4 -6 М гача концентрациясидан) дан, айниқса оксил агрегатларини диссоциацияланиши учун ва суббирликларининг янада кўп ёки кам “табiiй”шароитлар (солиштириш учун, масалан, додецисульфат натрий таъсирида) дан фойдаланилади.

Ферментларни концентрлаш учун баъзан $MgCl_2$ нинг юқори концентрацияси қўлланилади, бироқ ферментларни чўктириш учун баъзида классик реагентлар сифатида аммоний сульфат ва полиэтиленгликоль ишлатилади ва бу моддалар водород боғларининг барқарорлигини бузиб, оксил молекуласи юзаси атрофидаги гидрат қобикни бузади, натижада оксилларнинг агрегацияси ва чўкмага тушишига олиб келади. Бу реагентларни йўқотиш оксилнинг табiiй структурасини тўлиқ қайтарилишига имкон беради, деган фикрга асосланилади.

Сульфат аммоний ва полиэтиленгликоль билан чўктиришнинг афзаллиги шундаки, ҳар бир оксил реагентнинг муайян концентрациясида чўқади, бу эса қидириладиган оксилнинг бошқалар ичидан ажратиб олиш имконини беради. Ҳар бир оксил учун тажриба йўли билан оксилни чўктириш учун зарур реагентнинг концентрацияси диапозонини аниқлаш кеоак бўлади. Одатда, аммоний сульфатдан фойдаланилганда оксилларнинг чўкиши 20 дан 100% гача бўлган диапозонда бўлади. Полиэтиленгликольда эса 0-115% тўйинган диапозонда юзага чиқади.

Сульфат аммоний билан чўктиришда мавжуд иккала ёндошувнинг бирортасидан фойдаланилади, намуна эритмасига қурққ реагент сепилади,

ёки тўйинган эритмадан қуйилади. Биринчи ёндошув осон бўлиб, бундан ташқари унинг афзаллиги шундаки, аралашманинг охирги ҳажми жуда кўпўзгармайди. Аксинча, иккинчи ёндошувда, асосан, ўта тўйинган эритмани олиш зарур, аралашманинг охирги ҳажми жуда юқори бўлиб, 100% ли тўйинтиришга уйхуман эришиб бўлмайди. Сульфат аммонийнинг кристалларини эритилганда ҳаво пуфакчалари ажралиб чиқиб, улар бундан олдин кристалларга йиғилган бўлади. Бу пуфакчаларнинг сирт таранглиги кристалларнинг эриш жойига яқин бўлиб, доимо тузнинг юқори концентрацияси сақланиб туради. Бу оксилларнинг маҳаллий чўкишини чакиради, эритма тубида тузнинг тегишли даражасигача эримаган бўлса ҳам, бунда қидирилаётган оксил чўкмага тушади. Натижада, оксил кўп мартали чўктириш ва эришга учраб, бу сезгирлиги бирмунча юқори бўлган ферментлар учун ноқулай бўлиб ҳисобланади. Тузларнинг ножўя таъсирини пасайтириш учун намуна эритмасига сульфат аммонийнинг ҳисоблаб чиқилган миқдорини бир соат давомида қўшиб бориш тавсия этилади. Тузларни секин қўшиш учун бир неча махсус ускуналар мавжуд. Агар сульфат аммонийнинг тўйинтирилган эритмасидан фойдаланиб, мунтазам аралаштирилиб турилса, юқоридаги ножўя таъсирнинг олдини олса бўлади.

Оксилнинг ва тузнинг эрувчанлигига ҳарорат катта таъсир кўрсатади, шунунг учун тажриба ўтказишдан олдин чўктиришни хона ҳароратида ёки совуқда (4^0) да олиб борилиши бўйича бир тўхтамга келиш талаб этилади. Агар чўктириш оксилни концентрациялаш учун керак бўлса, намунадаги эритмага ортиқча тез солиб ундаги чўкмани центрифугалаш йўли билан олиб ташлаш мумкин. Бунда дастлаб, тузнинг шундай миқдорини танланадики, текширилаётган оксил ҳали эритмада бўлиб, балласт (қўшимча) оксиллар эса чўкмага туша бошлаган энг пастки чегарасига етиши мумкин бўлган бўлади, бунда чўкмани центрифугалаш йўли билан олиб ташлаш имкони мавжуд бўлиши лозим. Кейин сульфат аммонийни шундай миқдорда қўшиладики, текширилаётган оксил чўкмага тушиб, баъзи қўшимча оксиллар эритмада қоладиган энг юқори чегарасига эришилади. Аммоний сульфатнинг (0^0 С

даги) миқдори тўйинтиришнинг исталган (S) даражасига эришиш учун куйидаги формуладан фойдаланилади.

$$S_2 = \frac{(S_2 - S_1) \times 515}{100 - 0,27 \times S_2} \times V$$

Бунда S_2 – тўйинтиришнинг охириги чегараси, S_1 – тўйинтиришнинг бошланғич чегараси, V – оксил эритмаси ҳажми (мл).

Бундан ташқари қаттиқ сульфат аммонийнинг зарурий миқдорини аниқлаш имконини берадиган жадваллар ҳам мавжуд. Чўкмага тушгач, чўкмани центрифугалаш йўли билан ажратилади ва мос келадиган буферда қайта эритилади. Оксилни буфернинг минимал ҳажмида эритиш лозим бўлиб, чўкманинг озирги излари эритмага ўтганда буферни қўшиш тўхтатилади. Ортиқча буфер қўшмаслик учун шиша ёки пластик таёқчадан фойдаланиб аралаштириб турилади.

Адабиёт

1. Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).

Саволлар

1. Преципитация усулининг моҳияти нимадан иборат?
2. Аммоний сульфатнинг (0^0 С даги) миқдори тўйинтиришнинг исталган (S) даражасига эришиш қандай формуладан фойдаланилади?
3. Преципитация усулида қандай чўктирувчидан фойдаланилади?

2-жадвал.

Оксилларни сульфат аммоний ёрдамида чўктириш. 0^0 С ҳароратда оксилларни тўйинтиришнинг етарли даражаси S_2 га эришиш учун (юқоридаги сатр) 1 л эритмага қўшиш мумкин бўлган қаттиқ ҳолдаги сульфат аммонийнинг миқдори кўрсатилган. Дастлабки тўйиниш даражаси (S_1) чап устунда берилган (Green and Huges, 1955; Brewer et al., 1974).

S1/S2	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	67	70	75	80	85	90	95	100
0	53	80	106	134	164	187	194	258	258	291	326	361	398	421	436	476	516	559	603	650	697
5	27	86	79	108	137	162	166	197	229	262	296	331	368	390	405	444	484	526	570	615	662
10		28	53	81	109	133	139	169	200	233	266	301	337	358	374	412	452	493	536	581	627
15			26	54	82	87	111	141	172	204	237	271	316	327	343	381	420	460	503	547	592
20				27	55	75	83	113	143	175	207	241	276	296	312	349	387	427	469	512	557
25					27	46	56	84	115	146	179	211	245	264	280	317	355	395	436	488	522
30						17	28	56	86	117	148	181	214	233	249	285	323	362	402	445	488
33							11	40	70	101	133	166	200	214	235	271	309	347	387	429	472
35								28	57	87	118	151	184	201	218	254	291	329	369	410	453
40									29	58	89	120	153	170	182	212	258	296	335	376	418
45										29	59	90	123	138	156	190	226	263	302	342	383
50											30	60	92	107	125	159	194	230	268	308	348
55												30	61	76	93	127	161	197	235	273	313
60													31	44	62	95	129	164	201	239	279
65														13	31	63	97	132	168	205	244
67															19	52	85	120	156	194	233
70																32	65	99	134	171	209
75																	32	66	101	137	174
80																		33	67	103	139
85																			34	68	105
90																				34	70
95																					35

§13. ОҚСИЛЛАРНИ АНИҚЛАШНИНГ НИНГИДРИНЛИ УСУЛИ

Бу эркин аминокислоталар концентрациясини аниқлаш учун жуда сезгир усул. Бу эркин аминокислоталарни ҳосил қилиш учун гидролизланиши мумкин бўлган иммобилизация қилинган оқсилларнинг концентрациясини аниқлаш учун айниқса мос келади.

Керакли эритмалар

6 Н HCl (49,7 мл 37% хлорид кислотаси сув билан 100 мл ҳажмгача етказилади).

6 н NaOH (Mr 40,0; 100 г сувда 24 г эритилиб, пластик идишда сақланади)

2 М ацетат буфери, рН 5,4 (270 г натрий тригидрат ацетати (C₂H₃O₂Na₂•3H₂O, Mr 136,1) 200 мл сувда эритилади, 50 мл сирка кислотаси қўшилди ва ҳажми 1 л га етказилади)

10 мМ KCN (Mr 65,1; 100 мл сувда 65,1 мг эритилади) Диққат! Ўта заҳарли!

Ацетат буферидаги 0,2 мМ KCN (0,2 мл 10 мМ KCN + 9,8 мл ацетат буфери) эритмаси; янги тайёрланган нидидрин реагент эритмасидан фойдаланиш лозим (2,2-дигидрокси-1,3-индандион, Mr 178,1; маркали препарат).

50% этанол

БЗА стандарт эритмаси, 40 мкг / мл, суюлтирилган заҳира эритмасидан 100 мг да 25 мл 10 мМ лейцин (DL-лейцин, Mr 131,2; 131 мг ни 100 мл сувда) эритиб тайёрланади

Гидролиз

Маълум миқдордаги оксил ёки иммобилизация қилинган ферменти бўлган ташувчининг муаян қисми бир кеча (16 соат) 90° С ҳароратда 1 мл 6 НСl да инкубация қилинади, бунда уларни концентрланган кислотанинг сизиб чиқишини олдини олиш учун герметик ёпиқ флаконлар, яхшиси маҳкам боғланган қопқоқ билан ёпиб қўйилади. Кейин пуфакчалар очилади (хавфсизлик кўзойнақларини тақинг!), 0,5 мл суюқлик олинади ва 0,5 мл 6 NaOH қўшиб нейтралланади (рН назорат қилиб турилади).

Ишнинг бориши

0,2 мл гидролизат (ёки ҳажми сув билан 200 мкл га келтирилган намунанинг аликвотаси) 0,1 мл 0,2 мМ KCN ацетат буферидаги 0,1 мл нидидрин реактивини 10 дақиқа давомида қайнаб турган сув ҳаммомида ёки 100 ° С ҳароратдаги иситиш мосламасида жойлаштирилади, 1 дақиқа давомида музда совутилиб, 0,5 мл 50% этанол қўшилади. Кейин намунани 570 нм тўлқин узунлигида гидролизат ўрнига сув қўшилган назорат солиштирма эритмасига нисбатан ўлчанади.

Калибрлаш эгри чизиғи

Миқдорий таҳлил учун 10 мМ лейцин эритмасидан ёрдамида тузилган 12 аликвота (1 дан 50 мкл гача, ҳажмини 200 мкл гача етказилган) калибрлаш эгри чизиғидан фойдаланилади.

Адабиёт

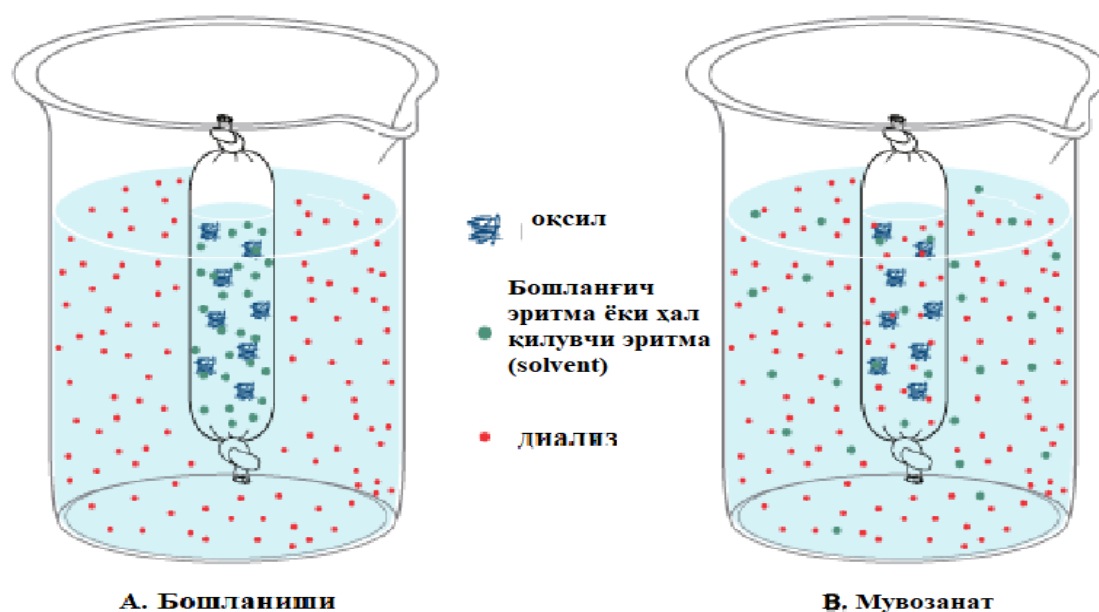
1. Rosen, H. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 10-15.

Саволлар

1. Оксилларни аниқлашнинг нингидринли усулининг моҳияти нимада?
2. Эркин аминокислоталарни ҳосил қилиш қандай амалга оширилади?
3. Гидролиз учун қандай эритмалардан фойдаланилади?
4. Калибрлаш эгри чизиғини қандай тузилади?

§14. ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИБ ОЛИШНИНГ ДИАЛИЗ УСУЛИ

Диализ молекулаларни ярим ўтказувчан мембрана, масалан, диализ найчаси орқали тарқалиш (диффузия) тезлигидаги фарқга асосланган ажратиш жараёнидир. Диализ - бу тиббий диализ каби ишлайдиган жуда кенг тарқалган лаборатория усули ҳисобланади. Илмий тадқиқотлар нуктаи назаридан, диализдан оқсиллар, ДНК ёки полисахаридлар каби катта макромолекулалар таркибидан тузлар, камайтирувчи моддалар ёки бўёқлар сингари кичик молекулаларни олиб ташлашда кенг фойдаланилади. Диализ, шунингдек, буферларни алмаштириш ва дори моддаларини бириктириш таҳлиллари учун кенг қўлланилади. Диффузия бу эритмадаги молекулаларнинг тасодифий, иссиқлик ҳаракати (Броун ҳаракати) бўлиб, унинг натижасида эритмада мувозанат юзага келгунга қадар молекулаларнинг юқори концентрациядан пастроқ концентрацияга кўчиб ўтиши юз беради. Диализда намуна ва буфер эритмаси (диализат деб аталади) бир-биридан ярим ўтказувчан мембрана билан ажралиб туради, бу еса дифференциал диффузия моделини юзага чиқаради ва шу тариқа намунадан диализатга молекулаларнинг ажралишига имкон беради.



19-расм. Диализ жараёнининг умумий кўриниши.

Мембрананинг тешиклари ўлчами туфайли намунадаги йирик молекулалар мембранадан ўтолмайди ва шу билан намуна учун мўлжалланган камерадан тарқалишини чекланади. Бунга жавобан, кичик молекулалар мембранадан эркин тарқалиб, эритманинг бутун ҳажми орқали мувозанатга эришади ва натижада намуна ва диализатда ушбу молекулаларнинг жами концентрациясини ўзгаради (ўнгдаги диализ жараёнини акс эттирувчи расмга қаранг).

Мувозанатга эришилгандан сўнг, молекулаларнинг якуний концентрацияси эритмалар ҳажмига боғлиқ бўлиб, агар мувозанатланган диализат янги диализат билан алмаштирилса (ёки ўзгартирилса) (қуйида келтирилган тажрибага қаранг), диффузия намунадаги кичик молекулаларнинг концентрациясини янада пасайтишига олиб келади, яъни намуна янада кўпроқ тозалаш имкони туғилади.

Намунага кичик молекулаларни киритиш ёки олиб ташлаш учун диализдан фойдаланиш мумкин, чунки кичик молекулалар мембрана бўйлаб ҳар икки йўналишда эркин ҳаракатланади. Бу диализдан турли хил мақсадда фойдаланиш учун уни манфаатли усулга айлантиради. Диализ учун ишлатиладиган яримўтказувчан мембрананинг ишлаб чиқариш санаси, ва тайёрланиш хусусиятлари тўғрисида кўпроқ маълумот олиш учун диализ найчасининг ёрлиғи билан танишиб чиқинг.

Хулоса. Диализ - бу намунадаги молекулалар матрицасини ўлчамига кўра молекулаларни фарқлаш орқали ўзгартириш учун ишлатиладиган жараён. Агар намуна целлюлоза халтачасида бўлса ва диализат эритмасига жойлаштирилса, намуна ва диализат ўртасида мувозанат юзага келганда, диализ ҳужайра мембранасида фақат майда зарралар ўтиб, йирик молекулалар қолиб кетгандагина юзага келади. Тузларни олиб ташлаш учун диализдан фойдаланиш мумкин.

Диализ жараёни Ускуналар

Эритмадаги молекулаларни диализ ёрдамида ажратиш оддий жараён хисобланади. Намуна ва диализат буферидан ташқари, одатда зарур бўлган нарсалар қуйидагилар:

- Тегишли форматдаги (масалан, найчалар, кассеталар ва бошқалар) мембранали диализ ва ўтказувчининг молекуляр оғирлиги (MWCO)
- Диализат буфери учун сақлаш идиши
- Эритмаларни аралаштириш ва ҳароратни бошқариш назорати

Асосий протокол

Оқсил намуналари учун одатда диализ усули қуйидагича боради:

1. Мембранани кўрсатмаларга мувофиқ тайёрланади
2. Намунани диализ найчасига, кассетага ёки қурилмага жойлаштирилади
3. Намунани (буферни секин аралаштириш билан) диализ буферининг ташқи камерасига жойлаштирилади
4. 2 соат давомида диализ қилинади (хона ҳароратида ёки 4 ° C).
5. Диализ буферини ва бошқа буферга ўзгартирилади 2 соат диализ қилинади
6. Диализ буферини ва бошқа буферга ўзгартирилади ва 2 соат ёки тун давомида диализ қилинади.

Намуна ва диализатнинг умумий ҳажми мембрананинг ҳар икки томонидаги кичик молекулаларнинг охирги мувозанат концентрациясини аниқлашдан иборат.

Тегишли ҳажмдаги диализат ва бир нечта буфер алмашинуvidан фойдаланиб, намунадаги кичик ифлослантирувчи моддаларнинг концентрацияси мақбул ёки аҳамиясиз даражаларгача туширилиши мумкин. Масалан, 200 мл диализатга нисбатан 1 мл наmunани диализ қилганда, мувозанат юзага келганиб, диализланадиган моддаларнинг концентрацияси 200 марта камаяди. 200 мл буфернинг иккита марта ҳар бир ўзгариши

натижасида намунадаги ифлослантирувчи моддалар миқдори 8×10^6 (200 x 200 x 200) гача камаяди.

Диализ усули эритма таркибий қисмларининг танлаб ўтказувчанликка ега бўлган юпқа плёнкалар - мембраналар орқали нотекис тарқалиши қобилятига асосланади. Мембрана ғовакли плёнка бўлиб, унинг тешиклари орқали кичик молекулалар кириб бориши мумкин. Диализ усули юқори молекуляр бирикмаларни паст молекуляр оғирликдаги бирикмалардан тозалашда, шунингдек полимер эритмаларини концентрациялашда қўлланилади.

Реактивлар:

оқсилнинг сувдаги эритмаси;

Натрий хлориднинг тўйинган эритмаси;

0,5% кумуш нитрат эритмаси;

10% нитрат кислота эритмаси;

10% натрий гидроксиди эритмаси;

1% мис сульфат эритмаси.

Усуналар: пробиркалар, целофан пакет; стакан.

Ишнинг бориши

1 -вазифа Диализ

1. Пробиркада тенг миқдордаги оқсил эритмаси ва натрий хлорид нинг тўйинган эритмасини аралаштиринг.

2. Тайёрланган оқсил эритмасини ярим тўла қилиб, целофан пакетига қуйинг.

3. Пакетни шиша таёкчага осиб, бир стакан дистилланган сувга солинг. Натрий ионлари ва хлор ионлари халтанинг деворларидан эркин сизиб ўтади ва сувнинг умумий ҳажми бўйича тенг тақсимланади. Оқсил молекулаларининг целофан тешиклари ўлчамидан каттароқлари халтада қолади. Диализ хона ҳароратида 20 дақиқа давомида амалга оширилади.

2.- вазифа Стакандаги сувни таҳлил қилиш

1. Стакандаги 1 см^3 суюқликка 2 томчи нитрат кислота эритмаси ва 2-3 томчи кумуш нитрат эритмаси солинади. Кумуш хлориднинг оқ чўкмаси пайдо бўлади.

2. Стакандаги 1 см^3 суюқликка 5 томчи ишқор эритмаси ва 1-2 томчи мис сульфат эритмасидан қуйинлади. Оқсилларга хос бинафша ранг йўқ.

3- вазифа. Халтачанинг таркибидаги моддани таҳлил қилиш.

1. Халтадан 5 томчи эритмага 5 томчи ишқор эритмаси ва 1-2 томчи мис сульфат эритмаси қуйилади. Полипептид ва мис тузи билан комплекс ҳосил бўлиши туфайли характерли ранг пайдо бўлади.

Натижаларни қайд этиш

1. Ишнинг боришини қисқача тавсифлаб беринг.
2. Диализнинг схематик расмини тузинг.
3. Диализгача ва ундан кейин паст ва юқори молекуляр оғирликдаги моддаларнинг тарқалиши тўғрисида хулоса қилинг.



20-расм. Диализ жараёни.

Оптималлаштириш параметрлари ва протоколи

Намуна диализи нисбатан содда бўлишига қарамай, қуйидаги параметрларга кўра барча дастурлар учун универсал диализ процедурасига эришиб бўлмайди:

- Намуна ҳажми
- Молекулаларнинг ўлчамлари тафовути

- Ишлатиладиган мембрана тури
 - Диффузия масофасига таъсир қиладиган мембрананинг геометрик шакли
- Бундан ташқари, диализнинг сўнгги нуқтаси жуда субъектив ва амалий хусусиятларга эга. Шундай қилиб, умумий процедура оптималлаштиришни талаб қилиши мумкин.

Диализ мембраналари ва MWCO

Диализ мембраналари молекуляр оғирликни чеклаш (MWCO) чегараларига мувофиқ ишлаб чиқарилади ва тавсифланади. 1-1,000,000 кДа гача бўлган MWCO билан мембраналар сотувда мавжуд бўлса-да, асосан, 10 кДа атрофида бўлган MWCO мембраналари энг кўп ишлатилади. MWCO мембранаси диализ мембранасини ишлаб чиқариш жараёнида яратилган поралар сони ва ўртача ўлчамда олинган ҳажмининг натижасидир. MWCO одатда стандарт молекуланинг энг паст ўртача молекуляр оғирлигига мос келади, у узок муддатли диализ пайтида мембранада самарали тарқалмайди вап ушланиб қолдаи. Шундай қилиб, 10К MWCO бўлган диализ мембраналари одатда камида 10 кДа молекуляр оғирлигига эга бўлган оксилнинг 90% дан ортиғини сақлай оллади.

Шуни таъкидлаш керакки, MWCO мембранаси аниқ белгиланган қиймат эмас. Мембрананинг MWCO чегарасига яқин бўлган массаси йирик молекулалар мембранада MWCO га қараганда анча кичикроқ бўлган молекулаларга қараганда секинроқ тарқалади. Бир молекула мембранада тез тарқалиши учун одатда MWCO даражасидан камида оксилдан 20 дан 50 баравар кам бўлиши керак. Шундай қилиб, 30 кДа оксилни 10 кДа оксилдан 20 к номинал диализ мембранаси орқали диализ қилиб ажратиш амалий жиҳатдан мумкин эмас.

Лабораторияда қўллаш учун диализ мембраналари одатда регенерация қилинган целлюлоза ёки мураккаб эфирли плёнкаларидан тайёрланади. Целлюлозали мембраналарнинг хусусиятини билиш учун ва ишлаб чиқарувчининг ҳаволасини кўриш керак.

Диализ одатда диализ найчасининг кесилган халтачаларида ёки турли форматдаги диализаторларда амалга оширилади. Амалдаги диализ мембранасини танлаш намуна ўлчамига ва фойдаланувчи хоҳишига боғлиқ.

Диализ трубки лабораторияда диализ учун ишлатиладиган энг қадимги ва одатда энг арзон шаклдир. Ишлатишдан олдин найчалар кесилиб, бир учини қисқич билан маҳкамланади, сўнгра бошқа учини намуна билан тўлдирилиб, қисқич ёрдамида маҳкамланади. *Диализ трубки* одатда ҳўл ёки қуруқ ҳолда ўралади ёки намунани найчанинг телескопик катламида берилади.

Бир нечта ишлаб чиқарувчилар турли хил диализ мосламалари (ёки диализаторлар) ни таклиф қилади. Диализаторлар намуна ҳажмининг маълум бир диапозони учун ишлаб чиқилган бўлиб, намунанинг ҳавфсизлигини ва *диализ трубки*дан ажрибаларни ўтказишда фойдаланиш қулайлигини ва самарадорлигини оширади. Уларнинг энг кенг тарқалгани: преформатланган GeBAflex диализаторларининг маҳсулотларининг A-Lyzer, Float-A-Lyzer, и Pur-A-lyzer / Д-труба / тизмалари ҳисобланади.

Адабиётлар:

1. Биссвангер Х. Б65 Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).
2. <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7>
3. <http://www.drau.ru/article/115.html>
4. В.И. Резяпкин, В.С. Слышенков, И.Б.Заводник, В.Н. Бурдь, Л.И.Сушко, Е.И.Романчук, Л.М.Караедова Лабораторный практикум по биохимии и биофизике http://ebooks.grsu.by/lab_pr_bio/laboratomaya-rabota-2-reaktsii-osazhdeniya-belkov.htm

Саволлар

1. Оқсилларни ажратиб олишнинг диализ усулининг моҳияти нимада?
2. Оқсиллар диализи қандай амалга оширилади?
3. Диализ қилиш учун қандай воситалардан фойдаланилади?
4. Калибрлаш эгри чизигини қандай тузилади?
5. Қайси омилларсиз диализга эришиб бўлмайди?

§15. ОҚСИЛЛАРНИНГ КОНЦЕНТРАЦИЯСИНИ 2-НАФТОЛ-1-КАРБОКСИАЛЬДЕГИД ДАН ФОЙДАЛАНИШ ОРҚАЛИ АНИҚЛАШ

Ушбу усул ёрдамида оқсил концентрациясини аниқлаш кўп вақт талаб этади, ammo бу усул иммобилизация қилинган оқсиллар учун қўлланилиши мумкин. Алдегид оқсилнинг аминогрухлари билан Шифф асосларни ҳосил қилади. Оқсилнинг аминокислоталари бензиламин билан алмашинади ва Шифф асосларининг концентрацияси эритмада 420 нм тўлқин узунлигида аниқланади.

Керакли эритмалар

*1,2 М 2-нафтол-1-карбоксиальдегид (2-гидрокси-1-нафталъдегид, Mr 172,18,, 10 мл да 2,07 г)
Диметилформамид 0,4 М бензамин (гидрохлорид, 143,6; м. 143,6; 0 , 10 мл этанолда 57 г) БЗА, калибрлаш эгри чизигини қуриш учун (сувдаги 1 мг / мл ли) эритма.
Этанол ч.д.а*

Ишнинг бориши

Иммобилизация қилинган фермент намунаси диметилформамид билан яхшилаб ювилади, 0,5 мл 1,2 М 2-нафтол-1-карбоксиальдегидга солинади ва хона ҳароратида тун давомида (14 соат)чайқатилади.

Ташувчини ажратиб олиб диметилформамид билан 5-10 марта ва эритма 280 нм да нур ўтказмайдиган бўлгунга қадар ва этанол билан 5 марта яхшилаб ювилади.

1 мл 0,4 М бензамин қўшилади ва хона ҳароратида 15 соат давомида чайқатилади, центрифугалашдан сўнг, 420 нмда супернатантнинг ютилиш даражаси қуйидаги формулада аниқланади.

$$(\epsilon_{420} = 1,09 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}).$$

Оқсил миқдорини БЗА ёрдамида тузилган калибрлаш эгри бўйича ҳисоблаб чиқилади.

Саволлар

1. Оқсилларни концентрациясини аниқлашнинг нафтол-1-карбоксиалдегидли аниқлаш усулининг моҳияти нимада?
2. Нафтол-1-карбоксиалдегидли аниқлаш усулини қандай амалга оширилади?
3. нафтол-1-карбоксиалдегидли аниқлаш усули учун қандай эритмалардан фойдалаилади?
4. Калибрлаш эгри чизиғини қакдай тузилади?

Адабиётлар

1. Kresse, G.B. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.), pp. 86- 99 Verlag Chemie, Weinheim Scopes, R. (1987).
2. *Protein Purification*, Springer, New York Stoscheck, C.A. (1990) *Meth. Enzymol.* 182, 50-68 Thorne, C.J.R. (1978)
3. *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*. Kornberg, H.L. (ed.) B104, Elsevier, Amsterdam, pp.
4. Bisswanger, H., Figura, R., Mischel, K., and Nouaimi, M. (2001) *Enzymkinetik, Ligandenbindung und Enzymtechnologie*, 2 edn. Shaker Verlag, Aachen, p. 71

§16. ОҚСИЛЛАРНИ БРОМЦИАН БИЛАН ФАОЛЛАШТИРИЛГАН АГАРОЗА БИЛАН БОҒЛАШ

Мазкур усул оқсиллар ва ферментларни (пероксидаза, антитаналар ва бошқалар) Сефароза ёки Сефадексга иммобилизация қилишнинг жуда қулай усули ҳисобланади.

Ушбу усулнинг жиддий камчиликларидан бири бромцианнинг юқори токсиклиги боис, шунинг учун ҳам тайёр маркали ташувчилардан

фойдаланиш тавсия этилади (масалан, CNBractivated SepharoseR). Фаоллаштириш юқори ишқорий муҳитда амалга оширилади, унда гелнинг тузилиши ўзгариши мумкин, шунинг учун барча жараёнларн тезда бажариш талаб этилади.

Керакли реагентлар ва эритмалар

4В Сефарозанинг 20 мл сувдаги 6,6 г ва 3 М NaOH (M_r 40,0; 12 г в 100 мл) суспензияси
Бромоциан (CNBr, M_r 105,9) 0,1 М NaHCO₃ (M_r 84,0; 0,84 г в 100 мл), pH 8,2 ни ўз ичига олади.
0,5 М NaCl (M_r 58,4; 2,92 г в 100 мл) 1 М глицин (M_r 75,1; 1,5 г в 20 мл сув)
0,1 М натрий ацетат /сирка кислота, pH 4,0 0,1 М калий фосфат, pH 7,6

Фаоллаштирилган 4В Сефарозани тайёрлаш

Қуйида тавсифланган амални эҳтиёткорлик билан мўрили шкаф остида тортиш пайтида бажариш керак. pH-метр ва pH-электрод ёрдамида Сефароза суспензиясининг pH қиймати 3 М NaOH қўшиб 11,2 га етказилади. Бўш колба тарозига ўрнатилади ва тортилади; кейин у унга 0,67 г қуруқ CNBr солинади, бромцинни оз миқдордаги сув қўшиб эритилади ва колбани тикин билан маҳкам ёпиб чайқатиб турилади.

Механик (KPG) билан аралаштиришда ёки парракли аралаштиргичда билан, (лекин магнитли билан эмас) бромциан эритмаси аста-секин гел суспензиясига қўшиб, pH қийматини доимий кузатиб борилади, у (3 М NaOH билан келтирилган) 11.2 даражасида қолиши керак. Агар pH ўзгаришни тўхтаса ва тахминан 6 дақиқа давомида доимий даражада турса, гелни масалан, Бюхнер воронкасида мўл миқдордаги сув билан ювилади (1 л),.

Оқсилларни боғлаш

Сефароз (20 мл) билан фаоллаштирилган суспензияси ювилади ва ўшанча ҳажмдаги таркибида 0,5 М NaCl сақлайдиган 0,1 М NaHCO₃ (pH 8,2) бўлган эритма билан боғланади, сўнгра 0,2 г оқсил қўшилади.

Суспензияни хона ҳароратида ёки тун бўйи 4 ° С да, тахминан 3 соат давомида секинлик билан аралаштирилади. Супернатандаги эркин оқил

миқдорини боғланган оксил миқдорини ҳисоблаш учун аниқланади. Қолган реакцияга киришмаган эркин гуруҳларни 5 мл 1 М глицин қўшиб блокланади (нофаоллаштирилади).

Гел аввал 0,1 М натрий ацетат / сирка кислотаси (рН 4,0), сўнгра 0,1 М калий фосфат (рН 7,6) билан ювилади. Гелни сақлаш учун охириги концентрацияси 0,1 М натрий азиди (NaN_3) солинади.

Адабиёт

1. **Биссвангер Х.** Б65 Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).

Саволлар

1. Оксилларни бромциан билан боғлашнинг моҳияти нимада?
2. Оксилларни бромциан билан боғлаш қандай амалга оширилади?
3. Оксилларни бромциан билан боғлашда қандай эритмалардан фойдаланилади?
4. Реакцияга киришмаган гуруҳларни қандай ююкланади?
5. Реакция охирида гелни нима билан ювилади.

§17. ФЕРМЕНТЛАР МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

Ферментлар - бу тирик ҳужайраларда ҳосил бўладиган ва турли хил кимёвий бирикмаларни фаоллаштириш қобилиятига эга бўлган оксил табиатли биологик катализатор ҳисобланади.

Фермент фаоллигининг ўзига хос хусусияти шундаки, улар маълум бир реакцияни катализлайди. Ферментларнинг фаоллигини субстратнинг ўзлаштирилиш тезлиги ёки реакция маҳсулотларининг тўпланиш тезлиги билан ўлчанади. Бунда эътиборни маълум бир вақт ичида ўзлаштирилган субстрат миқдориға эмас, балки дастлабки ўзлаштирилиш тезлигини ўлчашга қаратиш керак.

Ферментлар бўйича Халқаро биокимёвий иттифоқ комиссияси томонидан ферментнинг стандарт фаоллиги бирлиги тушунчаси қабул қилинган. **Фермент фаоллиги бирлиги (Е)** стандарт шароитларда минутига битта микромолнинг конверсиясини катализлайдиган ферментнинг миқдори (рН оптимуми, ортиқча субстрат, 37 ёки 20 ° С ҳароратда) миқдорига тенгдир.

Ферментатив фаолликни аниқлаш учун қуйидаги усуллардан фойдаланилади:

1. Кимёвий усул - кимёвий реагентлардан фойдаланган ҳолда субстратни ёки маҳсулотларни миқдорий аниқлаш (О-глизозилгидролазалари - қайтарилган шакарни ҳосил қилиш орқали).
2. Спектрофотометрик усул - характерли тўлқин узунлигида субстратнинг ютилишини ўзгариши орқали ферментатив реакция тезлигини ўлчаш (лиазалар – қўш боғ ҳосил бўлиши бўйича).
3. Манометрик усул - реакция пайтида чиқадиган газ миқдорини аниқлаш (оксидаза - O₂, декарбоксилаза – CO₂ нинг чиқиши билан).
4. Поляриметрик усул - оптик теранишнинг ўзгариши (β-фруктофураноксидаза) билан қайд этилади.
5. Хроматографик усул - хроматографиянинг ҳар хил турларидан фойдаланган ҳолда субстратни ёки маҳсулотларни миқдорий аниқлаш: қоғоз (қанд миқдорини таҳлил қилиш), юпқа қатламли (мураккаб агликонли гликозидлар), Сув экстракти суяқ хроматография (аминокислоталар ва бошқаларни таҳлил қилиш).

Нисбий фаоллик 1 мг оксигенга тўғри келадиган фермент фаоллиги бирлиги сони (Е).

Биологик объектлардаги ферментларнинг миқдорий таркибини аниқлаш маълум қийинчиликларни келтириб чиқаради, чунки камдан-кам ҳолатларда, тўқималарда ферментлар аҳамиятсиз концентрацияларда бўлади. Шунинг учун ферментлар миқдори муаян қабул қилинган аниқлаш шароитларида катализланган реакциянинг тезлигига қараб баҳоланади.

Оптимал ҳарорат шароитида, рН муҳитида ва ферментнинг субстрат билан тўйинтирилганда катализацияланган реакция тезлиги фермент концентрациясига пропорционал - мутаносиб бўлади. Энзиматик реакция тезлиги субстратнинг сарфланиш тезлиги ёки реакция маҳсулоти ҳосил бўлиш тезлигига қараб баҳоланади. Ферментнинг концентрациясини аниқлаш этиш ва унинг миқдорини билан баҳолаш учун Ферментлар бўйича Халқаро биокимёвий иттифоқ комиссияси стандарт халқаро бирлик (Е ёки U) ни тавсия этган: ҳар қандай ферментнинг фаоллиги бирлиги деб, ферментнинг мақбул шароитда 1 микромол субстратнинг конверсиясини ёки ҳосил бўлишини катализлайдиган миқдори ёки бир дақиқада 1 микромол маҳсулот (мкмоль / мин) тушунилади.

Халқаро бирликлар тизимининг (ХБ) жорий қилиниши муносабати билан, фермент фаоллигининг янги ифодаси каталлар (кат, kat) таклиф қилинди: 1 кат - бу 1 с (1 мол / с) вақт мобайнида 1 молга тенг тезликда реакция ўтказишга қодир каталитик фаолликдир. Халқаро бирликни (U) каталга нисбатан қуйидагича ифодалаш мумкин: $1 \text{ кат} = 1 \text{ мол} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ мол} \cdot \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$, ёки: $1 \text{ U} = 1 \text{ мкмол} \cdot \text{мин}^{-1} = (1/60) \text{ мкмол} \cdot \text{с}^{-1} = (1/60) \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$. Шундай қилиб, 1 U ферменти миқдори 16,67 нкатга тўғри келади.

Бундан ташқари, фермент фаоллигини 25 ° С ҳароратда, оптимал рН ва субстрат концентрациясининг тўйинтириш концентрациясига нисбатан каттароқ бўлган шароитдашлчаш тавсия этилади. Ушбу ҳолатларда тезлик субстратга нисбатан реакциянинг нол тартибига тўғри келади ва фақат ферментнинг концентрациясига боғлиқ бўлади.

Амалиётда фермент фаоллигини ифодалаш учун кўпинча нисбий ва моляр фаоллик тушунчалари эркин равишда қўлланилади. Ферментнинг нисбий фаоллигини одатда 1 мг оқсил (ёки 1 кг фаол оқсил учун каталлар сони) га нисбатан фермент фаоллиги бирликлари миқдори сифатида ифодаланади.

Фермент тўлиқ субстрат билан тўйиниш вақт бирлигидаги реакция жараёнида битта фермент молекуласи томонидан маҳсулотга айлантирилган субстрат молекулаларининг миқдори одатда фермент айланмалари миқдори ёки моляр фаоллиги деб аталади (моляр каталитик фаоллиги 1 г-мол ферментга нисюбатан каталларда ифодаланади). Масалан, эритроцитларнинг каталазасини битта молекуласи 44000 молекула водород пероксидини парчалашга қодир.

Фермент фаоллигини миқдорий аниқлаш принциплари

Фермент фаоллиги фермент сақловчи материалнинг миқдорига нисбатан субстратнинг сарфланиши ва маҳсулот тўпланиши тезлигида ифодаланади.

$$\text{Фермент фаоллиги} = \frac{\text{Маҳсулот ёки субстрат миқдори}}{\text{Вақт бирлиги} \times \text{Намунанинг массаси ёки ҳажми}}$$

Амалда, улар одатда қуйидагиларни ишлатилади:

молданнинг бирлиги - мол (ва унинг ҳосилалари ммол, мкмол), грамм (кг, мг),

вақт бирликлари - дақиқа, соат, сония,

масса ёки ҳажм бирлиги - грамм (кг, мг), литр (мл).

Бошқа ҳосилалардан ҳам фаол фойдаланилади - катал (мол / с), халқаро фаоллик бирлиги (ХБ, Unit) - мкмол / мин га тўғри келади.

Шундай қилиб, ферментнинг фаоллиги, масалан, ммол / с $\times$ л, г / соат $\times$ л, ХБ / л, катал/ мл ва бошқалар билан ифодаланиши мумкин. Масалан, 1 г пепсин бир соат ичида 50 кг тухум оксилени парчалаши маълум - шунинг учун унинг фаоллиги 1 г фермент учун 50 кг / соат бўлади. Агар 1,6 г миқдоридаги сўлак соатига 175 кг крахмални парчаласа, сўлакдаги 1 г сўлакдаги амилазанинг фаоллиги соатига 109,4 кг крахмални ташкил қилади.

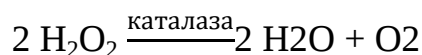
Олинган натижаларни таққослаш учун стандарт шароитларни яратилади

турли лабораторияларда - оптимал рН ва муайян ҳарорат, масалан, 25 ° С ёки 37 ° С, субстратнинг фермент билан инкубация қилиш вақтига амалал қилиш кабилар инбатга олинади.

Эритмадаги фермент молекулаларининг барчаси ишлаши учун субстратни ортиғи билан берилади.

Каталаза ферменти фаоллигини аниқлаш усуллари

Катализа ферменти хом сутда, айниқса оғиз сути (палла) да ва мастит билан касалланган ҳайвонлардан олинган сутда кўп миқдорда учрайди. Каталаза шунингдек одам ва ҳайвонлар қонида ва ҳар қандай ўсимлик ҳамда ҳайвонларнинг тўқималарида ҳам мавжуд бўлиб, организмнинг антиоксидант тизимининг таркибий қисмларидан бири ҳисобланади. Каталаза реакцияда водород пероксидни сув ва молекуляр кислородга ажралишини таъминлайди.



Каталаза фаоллиги миқдори муайян тажриба шароитларида водород пероксидни 30 минут ичида парчалашга сарфланадиган миллиграмм миқдори билан ифодаланади.

Водород пероксидининг мавжудлигини аниқлаш уни учун кислотали муҳитда калий перманганат эритмаси билан титрланади



Сут таркибидаги каталаза фаоллигини аниқлаш усули

(А.Н. Бах ва С.Р. Зубкова)

Тадқиқот материаллари ва реактивлар.

*Хом сут, 2 карра суюлтирилади (5 мл сут 5 мл сув билан аралаштирилади),
1% водород пероксид эритмаси,
10% сульфат кислота эритмаси,
0,1Н калий перманганат эритмаси.*

Ускуналар. 100 мл коник колбалар, 5 ва 10 мл, 1 мл ли градуирланган пипеткалар,

Аниқлаш жараёни.

Иккита коник колбаларга 7 мл дан дистилланган сув солинади.

Кейин улардан бирига 1 мл 2 марта суюлтирилган хом сут қўшилади.

Бошқасига 1мл суюлтирилган, лекин олдиндан қайнатиб олинган сут қўшилади.

Иккала колбага 1 мл дан 1% водород пероксиди эритмаси қўшилади ва 30 дақиқага қолдирилади.

Каталаз таъсирини тўхтатиш учун ҳар бир колбага 3 мл 10% сульфат кислота қўшилади ва қолган водород пероксидини 0,1 н ли калий перманганат эритмаси билан оч-пушти ранг ҳосил бўлгунга қадар титрланади.

Назорат ва тажриба вариантини титрлаш ўртасидаги фарққа қараб калий перманганатнинг миқдорини топиб, фермент таъсирида парчаланган водород пероксидга эквивалент миқдорини ҳисобланади.

Мисол. Айтайлик, назорат намунасини титрлаш учун 8 мл **0,1н KMnO_4** эритмаси сарфланди, тажриба вариантыда эса - 2 мл 0,1 Н KMnO_4 эритмаси ишлатилди. .

1 мл 2 марта суюлтириладиган сутдаги каталаза таъсирида парчаланган водород пероксиди миқдори $8-2 = 6$ мл ёки $6-1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1 н KMnO_4 эритмаси 1,7 мг водород пероксидига тенг) бўлади

Бундан келиб чиқадики, 1 мл хом (суюлтирилмаган) сут таркибида каталаза миқдори 30 минут ичида $10,2 \times 2 = 20,4$ мг водород пероксидини парчалашга қодир бўлади,

Картошканинг каталаза фаоллигини аниқлаш

Тадқиқот материаллари ва реактивлар:

*Картошка,
1% водород пероксиди эритмаси
10% сульфат кислота эритмаси,
0,1 Н калий перманганат эритмаси.
Ускуналар. 100 мл ли ўлчов колбалари ва 200 мл ли коник колбалар, 5 ва 20 мл градуирланган пипеткалар, воронкалар, бюреткалар.*

Аниқлаш жараёнинг бориши.

1 г хом картошкага аста-секин 2-3 мл сув қўшиб кварц қуми билан майдаланади, кварц қуми.

Муҳитнинг кислоталигини камайтириш учун токи карбонат ангидрид пуфакчалари чиқиши тўхтагунча шпател учида калций карбонат қўшилади,. Майдаланган массани ўлчов колбасига олинади ва 100 мл ҳажмга еткунга қадар сув қўшилади.

Аралашмани 30-60 дақиқага қолдирилади.

Кейин қатламли филтр орқали филтрланади.

Иккита 200 мл ли коник колбаларга ўлчов пипеткаси билан 20 мл дан экстракт солинади. Биттасини қайнаш даражасига олиб борилади (назоратдаги намуна). Иккала колбага 2 мл 1% ли водород пероксиди солиб, хона ҳароратида 30 минутга қолдирилади.

Кейин ҳар бир колбага каталаз таъсирини тўхтатиш учун 3 мл 10% сульфат кислотаси қўшилади ва водород пероксидининг қолдиқ миқдорини 0,1 Н калий перманганат эритмаси билан оч пушти ранг пайдо бўлгунча титрланади.

Назорат ва тажриба титрлашлар ўртасидаги фарқ орқали калий перманганатнинг водород пероксидни фермент иштирокида парчаланишига тенг бўлган эквивалент миқдори топилади

Мисол. Назорат намунасини титрлаш учун 8 мл, тажрибага - 2 мл 0,1 Н KMnO_4 эритмаси сарфланди. Каталаз томонидан парчаланган водород пероксиди миқдори $8 - 2 = 6$ мл ёки $6 \times 1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1 н KMnO_4 эритмаси 1,7 мг водород пероксидига эквивалент) бўлади

Демак, 1 г хом картошкада

30 минут ичида $10,2 \times 5 = 51$ мг водород пероксид парчалаш хусусиятига эга бўлган каталаз миқдори мавжуд бўлади.

Шундай қилиб, реакция тенгламаси қуйидаги кўринишга эга бўлади:

$$m(\text{H}_2\text{O}_2) = (V_{\text{назорат}} - V_{\text{тажриба}}) \times 1,7 \times 5$$

бу ерда:

$m(\text{H}_2\text{O}_2)$ - водород пероксид парчалаш хусусиятига эга бўлган каталаз миқдори

$V_{\text{назорат}}$ - назоратдаги эритмани титрлашга сарф бўлган 0,1 н KMnO_4 эритмасининг ҳажми

V тажриба - тажрибадаги эритмани титрлашга сарф бўлган 0,1 н KMnO_4 эритмасининг ҳажми 1,7 мг бу 1 мл 0,1 н KMnO_4 эритмасининг водород пероксидига эквивалент миқдори

Адабиётлар:

1. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов Н.Н. Прикладная энзимология. – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.
2. http://www.piboc.dvo.ru/structure/ext_labs/met/activity.php
3. Р. Алимова Қишлоқ хўжалик ўсимликлари биокимёси фанидан лаборатория машғулоти.

Саволлар

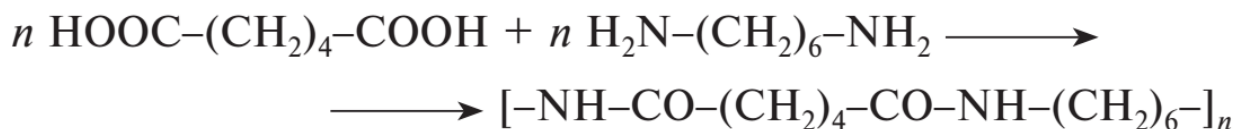
1. Фермент фаоллиги бирлиги беганда нимани тушунаси?
2. Нисбий фаоллик қандай ўлчанади?
3. Фермент фаоллигини миқдорий аниқлаш принциплари нималардан иборат?
4. Картошканинг каталаза фаоллигини аниқлаш қандай амалга оширилади?
5. Сут таркибидаги каталаза фаоллигини аниқлаш усулини тушунтириб беринг.

§18. ФЕРМЕНТЛАРНИ НЕЙЛОН ШАРИКЛАРГА МИКРОКАПСУЛАЛАШ

НЕЙЛОН КОПТОКЧАЛАР МИКРОКАСАПСУЛАЦИЯЛАШ

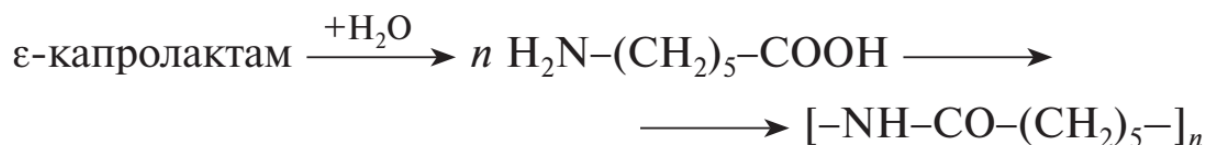
Синтетик полимерлар ферментларни иммобилизация қилиш учун матрицалар сифатида кенг қўлланилади. Энг кўп ишлатиладиган полиамидлар, полиэстерлар, полиэтиленлар ва поливинил спиртлар ҳисобланади. Полиамидлар диаминлар билан алифатик дикарбоксиллик кислоталарни поликонденсатлаш йўли билан олинади. Кўпчилик ҳолларда

кенг қўлланиладиган техник полиамид - нейлон ҳисобланади. Нейлон- бу ҳосил бўлган узун занжирли полимер бўлиб, экволяр микдордаги адипик кислота ва диаминогексан (полигексаметилен адипамид, 6.6 - полиамид; 6 рақами кислотанинг ҳам, аминнинг ҳам 6 углерод атомидан иборатлигини билдиради) нинг конденсацияси натижасида ҳосил бўлади.



Нейлон иплар тўғридан-тўғри эритиш йўли билан тайёрланади; улар юқори эластиклик ва қувватга эга. Нейлон ташувчида иммобилизациянинг афзаллиги унинг микроблар билан ифлосланишига нисбатан барқарорлиги ва нисбатан юқори даражада гидрофоблигидир.

Полиамид-6 (перлон, дедерон) олиш учун, фақат битта компонент – капролактама керак бўлади. У α-аминокапроик кислота ҳосил қилиш учун сувни бириктириб, аминакапроон кислота ҳосил қилади ва бошқа капролактама молекулалари билан полимер ҳосил қилиб, конденсатланади. ади



Ушбу полимер ишқорларга чидамли, аммо кислоталарда эрийди. Нейлон ташувчиларда ферментларни иммобилизациялаш асосан полимер юзасига капсулалаш ёки адсорбциялаш орқали амалга оширилади. Ковалент боғлаш учун мос бўлган функционал гуруҳлар фақат полимер занжирларининг учларида жойлашганлиги сабабли боғланиш қийинлашади. Юқори зичликдаги иммобилизацияга эришиш учун иккита муқобил стратегия қўлланилади. Бунинг учун кислород ёки азотнинг бўлинмаган электрон жуфтлари реактив гуруҳларни қўшишда иштирок этиши мумкин.

Шу билан бир қаторда, полимер молекуласидаги баъзи амид боғланишларининг қисман парчаланиш муолажасини ўтказилса, натижада

унда иммобилизация учун ишлатилиши мумкин бўлган эркин аминокислот ва карбоксил гуруҳлари ҳосил бўлади.

Полимернинг парчаланишини олдини олиш учун қисман гидролиз қилиш қатъий назорат қилинадиган шароитларда ўтказилади.

Керакли реагентлар ва эритмалар
0,4 г 1,6-диаминогексан,
0,16 г натрий бикарбонат, 0,66 г натрий карбонат,
Ферментнинг 10 мл сувдаги эритмаси (2 мг / мл).
18 мМ себацилдихлорид (Mr 239,1;
0,4 мл в 20 мл хлороформ ва 80 мл циклогексан),
0,9% натрий хлориднинг 0,05 М калий фосфатдаги янги тайёрланган эритмаси, рН 7,0.

Ишнинг бориши

Таркибида фермент ва 1,6-диаминогексан бўлган эритмалари тенг миқдорда аралаштирилади

Сўнгра ҳосил бўлган нейлон коптокчаларни бир-бирига тегмаслиги учун шприц ёрдамида аста-секин себацилдихлорид (10 мкл) эритмаси томчилаб томизилади.

5 минутдан сўнг, органик фаза бузилади ва органик эритувчини тўлиқ буғланишидан сўнг, капсулалар 0,05 М калий фосфат, рН 7.0 да 0,9% NaCl эритмаси билан ювилади.

Адабиётлар

1. Chang, T.M.S. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 201-218.
2. Биссвангер Х. Б Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).

Саволар

1. Нейлон ўзи нима?
2. Нима учун ферментларни иммобилашда нейлондан фойдаланилади?
3. Ферментни нейлон коптокчаларга жойлаш қандай шароитларда ўтказилади?

§19. ФЕРМЕНТЛАРНИ ПОЛИАКРИЛАМИД ГЕЛГА КИРИТИШ

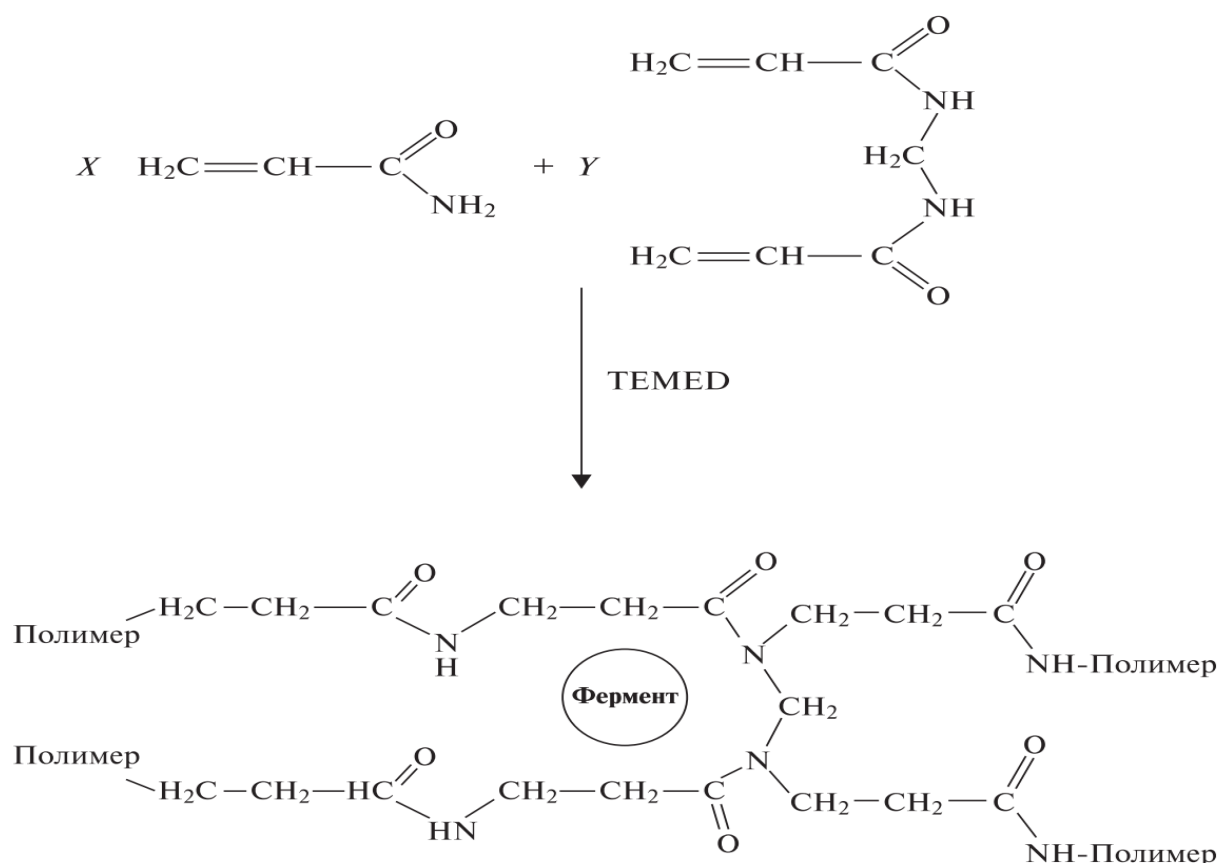
Полиакриламид геллари нафақат оксилларни электрофоретик ажратиш учун, балки иммобилизация учун ҳам қўлланилади. Полиакриламиднинг узун полимер занжирлари N,N-метиленбисакриламидни ўзаро боғлаш орқали боғланган (21-расм). Полимеризация реакцияси N,N,N',N'-тетераметилэтилендиамин (TEMED) ва аммоний персульфат иштирокида бошланади. Ўзаро боғлаш агенти миқдорини ўзгартириш орқали ферментнинг гел томонидан маҳкам тутиб турилиши ва субстратлар ҳамда маҳсулотлар фаол марказга, ундан ташқарига диффундирланиши таъминлаш учун гел пораларининг ўлчамини бошқариш мумкин

Керакли реагентлар ва эритмалар

*Акриламид (Mr 71,1)
N,N'-метиленбисакриламид (Mr 154,2)
N,N,N',N'-тетераметилэтилендиамин (TEMED, Mr 116,2)
Аммоний персульфат (Mr 228,2; 10% сувдаги эритмаси);
0,1 М Трис-HCl, pH 7,2
0,1 М калий- фосфат, pH 7,5 нинг янги тайёрланган эритмалари
Фермент эритмаси (8 мл да 8 мг 0,1 М Трис-HCl, pH 7,2)*

Ишнинг бориши

8 мл фермент эритмасига 1,5 г акриламид, 80 мг метиленбисакриламид, 10 мкл TEMED ва 30 мкл 10% аммоний персульфат қўшилади. Бунда реакция аралашма 37 °C ҳароратда бўлиши ва қизиб кетишдан сақланиш керак. Полимеризация тахминан 20 дақиқа давом этади. Кейин гел скалпел билан бўлакларга бўлинади, унга 10 мл pH 7,5 бўлган 0,1 М калий фосфат эритмаси, қўшилади ва кейин блендер ёрдамида майдаланади. Гель зарралари варонкада уч марта ювилади ва таҳлил қилиш учун ишлатилади.



21-расм. Акриламид ва метиленбисакриламиданинг биргаликда полимерланиши натижасида ҳосил қилинган гелга ферментнинг киритилиши; X ва Y — стехиометрик коэффициентлар.

Адабиёт

1.Биссвангер Х. Б Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).

Саволлар

- 1.Полиакриламид гел деганда нимани тушундингиз?
- 2.Нима учун ферментларни иммобиллашда полиакриламид гелидан фойдаланилади?
- 3.Полиакриламид гелга ферменни иммобиллаш жараёни тафсилотларини ёритиб беринг.

§20. ПОРАСИЗ ШИША ЮЗАСИГА ФЕРМЕНТЛАРНИНГ КОВАЛЕНТ ИММОБИЛИЗАЦИЯСИ

Пораларининг ўлчами назорат қилинадиган шиша ойна (Bioran®) - бу махсус эритилган шиша бўлиб, бу микропоралари мавжудлиги туфайли катта сирт майдонига эга. Ушбу шиша ойна фаоллаштирилган ҳолда иммобилизация ўтказиш учун тайёрланган шаклда сотилади. Қуйидаги тажрибада 46 нм ҳажмдаги порали ойналар ва силоксан кўприкчалари орқали унинг юзасига боғланган глицерин молекулалари қўлланилади.

Метапериодат таъсирида глицериннинг алкохол гуруҳлари алдегид гуруҳларига қадар оксидланади (22-расм). Сўнгра, *n*-фенилен-диамин қўшилиши билан Шифф асослари ҳосил бўлади ва натрий борогидрид билан қайтарилиши натижасида боғланишнинг барқарорлашувига эришилади. Азот кислотаси мавжуд бўлганда, аминогуруҳлар в диазоний катионларига айланади, улар орқали тирозин қолдиқлари асосида оксил боғланади.

Керакли реагентлар ва эритмалар

Говак поралари ўлчами билан бошқариладиган ойналар ((Bioran®) - Bioran®-CPG, Pierce Chemical Comp. Rockford, IL, Schott Glas, Mainz, Germany).

NaIO₄ NaBH

4 n-Фенилендиамин

0,1 М калий фосфат, pH 7,5

Фермент эритмаси (1 мг/мл в калий фосфатдаги 0,1 М, pH 7,5)

Шиша коптокчаларни фаоллаштириш

Шиша коптокчалар (1 г) 100 мл ли туби думалоқ колбагага жойлаштирилади ва уларга 70 мл сувда 91 мг NaIO₄ сақловчи эритмаси қўшилди. Колбаларни роторли буғлаткичда 1 соат давомида 0,3-0,4 бар босим остида айлантирилади.

Олинган алдегид гуруҳлари бўлган шиша коптокчалар бир неча марта сув билан ювилади (умумий ҳажми 350 мл). Кейин флакондаги коптокчаларга

77 мг *n* – фенилендиамин сақловчи 70 мл сув қўшилади ва флакон 0,3-0,4 бар босим остида айланадиган роторли буғлаткичда айлантирилади. 20

дақиқадан сўнг, 7 мг 7 мг NaBH_4 қўшилади, яна 60 дақиқадан сўнг реакция тўхтатилади ва коптокчалар сув билан (ҳар сафар 20 мл дан) бир неча марта ювилади.

Кейин коптокчаларга 88 мл 2 М хлорид кислотасини солинади. Колбани муз ҳаммомида айлантририлади, бу ишни колба таркибидаги 0°C га кадар совугунча давом эттририлади. 20 дақиқа давомида 1,12 г NaNO_2 кичик қисмлар билан аста-секин қўшилади.

Силикон кўприкчалари орқали ойнага боғланган глицерин колдиқларининг даврий оксидланиши пайтида алдегид гуруҳларининг шаклланиши.

Бунинг учун қуйидагилар бажарилади.

- Фенилендиамин таъсирида Шифф асосини шакллантириш.
- Шифф асосларини тиклаш.
- Азот кислотаси таъсирида diazonий катионларининг шаклланиши.
- Вакуумни қўшмасдан колбани айлантририб қўшимчалар қўшишлар орасидаги даврда тирозин колдиқлари асосида оксилни иммобилизация қилиш.

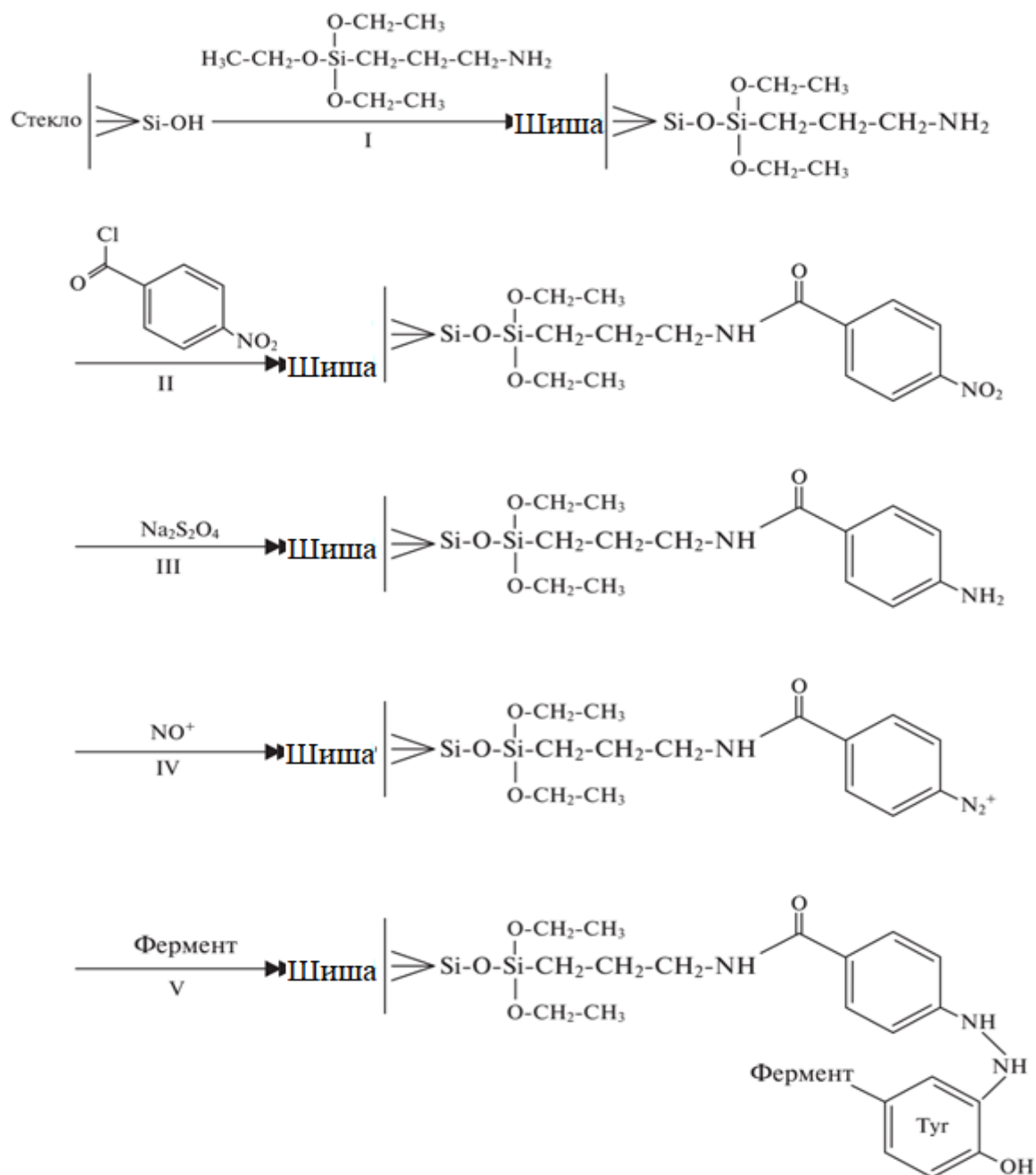
Сўнгги қисмини қўшгандан сўнг, идиш 10 дақиқа давомида айлантририлади, Ундан азот буғларинини олиб ташлаш учун сув секин оқадиган насосга (тахминан 20 мбар) улаб қўйилади.

Сиртида diazonий катионлари ҳосил бўлган шарчалар уч марта (ҳар бири 20 мл) музли сув билан ювилади ва дарҳол иммобилизация учун ишлатилади. Иммобилизация қилишдан олдин, коптокчалар 4°C ҳароратда сақланиши керак бўлади.

Ферментлар иммобилизацияси

25 мл ҳажмли колбадаги коптокчаларга фермент эритмаси (10 мл 0,1 М калий фосфат, pH 7,5) қўшилади ва колбани 4°C да тун давомида (12-16 соат) секин айлантририлади. Кейин шарчалар уч марта 0,1 М калий фосфат, pH 7,5 бўлган (ҳар бири 5 мл) эритмаси билан ювилади. Иммобилизация

самарадорлигини баҳолаш учун супернатантдаги эркин оксилнинг концентрацияси ва ферментнинг фаоллигини аниқланади.



22-расм. Шиша сиртини силанизация (юзанинг кремний диоксиди юпқа қавати билан қопланиши) қилиш ва ферментни иммобилизация қилиш. I. Si-OH гуруҳларининг 3-аминопропилтриэтоксисилан билан шиша сиртидаги ўзаро таъсири. II. Амино гуруҳларнинг учларининг п-нитробензойл хлорид билан ўзаро таъсири. III. Нитро гуруҳларининг натрий дитионит билан қайтарилиши. IV. Азот кислотаси таъсирида диазониум катионининг ҳосил бўлиши. V. Ферментнинг тирозин қолдиғи орқали бириктирилиши

Адабиётлар

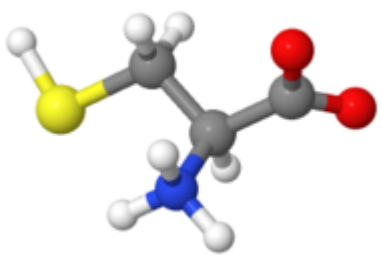
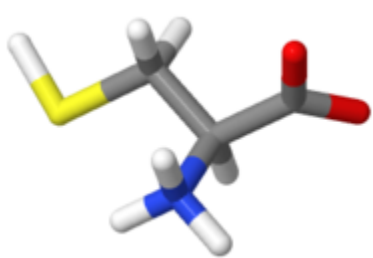
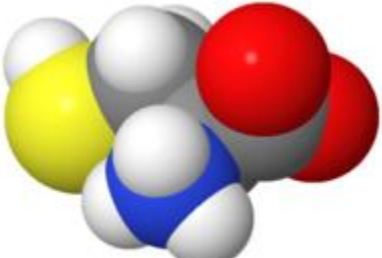
1. **Биссвангер Х.** Б65 Практическая энзимология [Электронный ресурс] / Х. Биссвангер ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. Текстовые дан. (1 файл pdf : 331 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Методы в биологии).
2. **Gabel, D. and Axen, R. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 383-393/**
3. **Weetall, H.H. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 134-148**

Саволлар:

1. Порасиз шиша деганда нимани тушундингиз?
2. Нима учун ферментларни иммобиллашда порасиз шишадан фойдаланилади?
3. Порасиз шиша юзасига ферментни иммобиллаш жараёни тафсилотларини ёритиб беринг.

§1.АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ. ЯНГИ ОҚСИЛЛАРНИ ЛОЙИҲАЛАШ. КОМПЬЮТЕРДА ВИЗИУАЛИЗАЦИЯ ҚИЛИШ УСУЛИ

Молекуляр визуализация бу молекуляр моделларни ўрганиш ва уларни тушуниш маъносини англатади. Молекуляр визуализация мутлақо янги молекуляр моделлаштиришни ўз ичига олмайди, яъни мавжуд молекуляр моделларни яратиш ёки мавжуд моделларнинг таркибини ёки конфигурациясини ўзгартиришдан иборат. Унда ерда биринчи навбатда макромолекулалар (оқсил, ДНК, РНК ёки уларнинг комплекслари) нинг моделлари билан шуғулланилади.

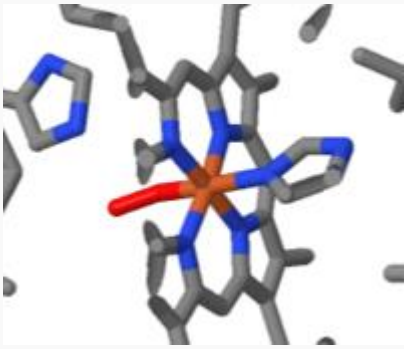
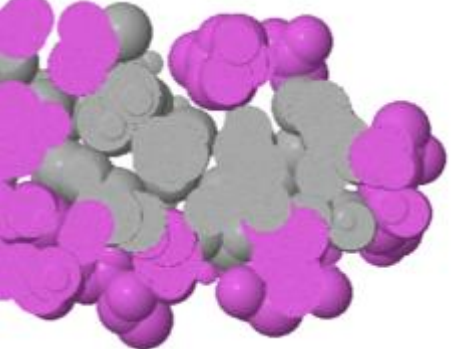
		
Коптоксимон ва таёқчасимон шакл http://biomodel.uan.es/en/model13/aa.htm)	Таёқчасимон ва симли шакл http://biomodel.uan.es/en/model13/aa.htm)	Фазовий шакл http://biomodel.uan.es/en/model13/aa.htm)
CHONS		

23-расм. Молекуляр моделларнинг кўринишлари

Атом тасвирлари (дисплейлар, расмлар) копток ва таёқ, таёқ (таёқчасимон сим) ва бўш жойни тўлдиришни ўз ичига олади. Юқорида 20 та аминокислоталар ушбу учта усулнинг ҳар бири тасвирланган ва глицин аминокислота мисолида тасвирланган. Ушбу тузилмалар атомларнинг ва ковалент алоқаларнинг жойлашувини кўрсатади. Ўнгдаги расмларда кўрсатилган водород кўпинча кристаллографик моделларда кўринмайди.

Бундай тузилмалар атомларнинг тузилишини моделда кўриб чиқиш учун фойдалидир, аммо жуда катталиги учун пептидлар ёки оксил занжирларини визуал равишда кўриш учун жуда ноаниқ бўлиб қолади.

Коптокча ва таёқ – оксилларни визуализация қилиш вариантлардан бири. Бошқа таёқчани *каркас* деб номланади. Яна бири [Jmol yilda FirstGlance](#), катта структурадан кичик бир қисмни ажратиб, сўнгра уни таёқча сифатида ифодаланади сифатида кўрсатилади (Vines/Sticks in the Views lab). ёки, бошқа ҳамма нарсани ичига киргизиб, марказлаштириб, кейин ён томондан силлиқлаш қолаш мумкин.

	
Гемни кўрсатувчи plitalar (1 soat) C O N Fe	Gidrofobik yadro va qutblarni ko'rsatuvchi plitalar (1pgb)

24-расм. Slabbing

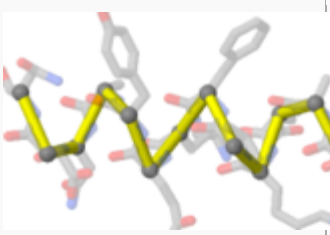
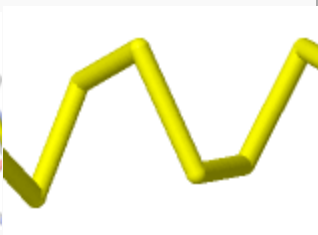
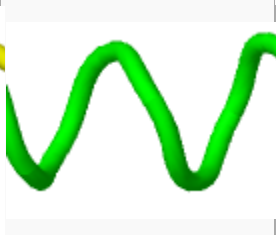
Силлиқлаш

Катта макромолекуляр моделнинг кичик бир қисмининг атомар кўришни ифодалашнинг диққатга сазовор жойи унинг марказидир. Уни ифодалаб бўлгач, молекуланинг олд ва орқа қисмларини кесиб олиб ташланади.

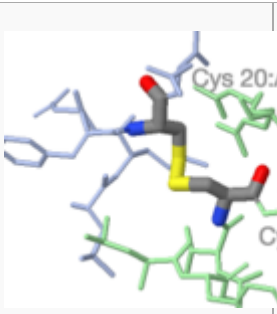
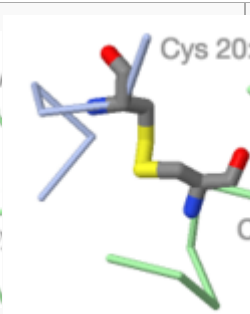
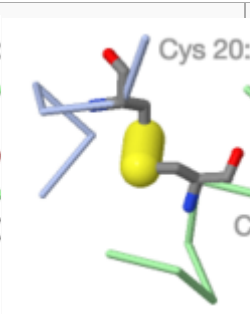
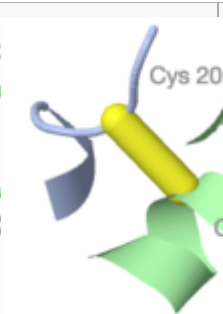
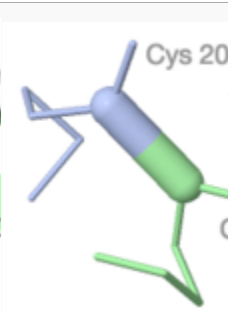
Бунга слаббинг дейилади, чунки аслида каттароқ моделдан кичикроқ бўлакни кесиб олиш билан белгиланади. Слаббинг шунингдек, оксил доменининг гидрофобик ядроси каби беркитилган тузилмаларини ва уларнинг атрофини кўриш учун қуй. Слаббинг [FirstGlance в Jmol](#) :- дан фойдаланиб амалга оширилиши мумкин : *Views tab* га кирилади, қизиқтирган доирани марказлаштириш *Center Atom* ни босиб, учун ва *Slab button* босилади. Кейинги кўринишлар автоматик равишда пайдо бўлади.

Соддалаштирилган схематик кўринишлар

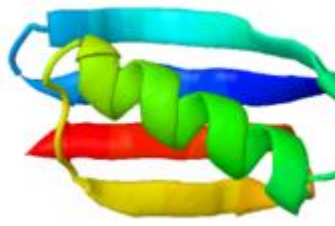
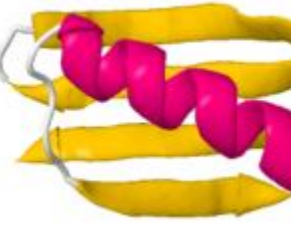
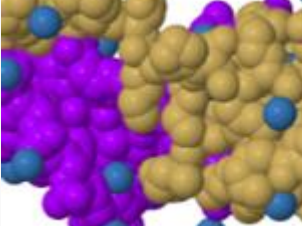
Оқсиллар, ДНК, РНК ва уларнинг комплекслари каби йирик молекулалар ҳақида гап кетганда , тасма ёки асосий занжирнинг соддалаштирилган тасвирлари, масалан, тасма излари ёки занжирлар / расмлар структурани тушунишда жуда фойдалидир. Ушбу тушунчалар *Proteopedia* нинг [Scene Authoring Tools](#) ёки *Views*, вкладкаларида мавжуд.

			
Alfa углерод занжири изининг соддалашган кўриниши	Асосий занжирнинг Alfa углероди изи	Орқа занжирнинг изи	Асосий занжир тасмаси

Дисульфид занжирлар

				
9in ичидаги дисульфид занжирининг атомар кўриниши C O N S	ОқсЛ занжири излари A B ск елет изларига қадар соддалаштири лган	FirstGlance Олтингугурт- олтингугурт алоқасини кенгайтиради .	Тасмасимон магистралла рни боғлайдиган дисульфид кўприкчалар нинг схемаси	Дисульфид кўпрк занжир билан боғланган, FirstGlance даги опция.

25-расм. Jmol-dagi FirstGlance дастурида сичқонча тугмасини бир марта босиш (Tools tab ёрлиғида) дисульфид боғларни кўрсатиш ва ранг беришнинг бир нечта вариантларини ишга солади..

			
N-> C kamalak (1pgb) 	Ikkilamchi struktura Алфа спираллар , Beta strands , loops .	Aminokislota zaryadi Anionik (-) kationik (+)	Tarkibi (1d66) Protein , DNK , ‘эр итувчи

26-расм. Макромолекулалар учун рангли схемалар

Макромолекулалар учун DRuMS деб номланган стандарт ранг схемалари тўплами 2000 йилда ишлаб чиқилган. Ушбу ранг схемалари Proteopedia-нинг кўриниш яратиш воситаларида жойлашган тугмачаларда таклиф этилади. Улар қисман коптокча ва таёкча (pre-dated computer visualization да Corey-Pauling-Kolton or CPK models деб номланади) физикавий моделлари компьютер визуализациясидан олдинги моделларда қўлланилган. Дастлаб кимёвий элементларга ранг бериш (юқоридаги мисолларга қаранг) Kinemages , RasMol и Chime. и молекуляр визуализация дастурларига киритилган. CPK colors кимёвий элементлар учун ранглар, ва барабанлар ранг схемалари, Proteopedia.да ишлатиладиган визуализация воситаси Jmol га ўрнатилган ранг схемалари қилинган

Қаранг : Proteopedia.да [Help: Color Keys](#)- ранг тугмачалари.

Структуравий элементларнинг визуализацияси

Тасаввурлар ва ранг
схемаларининг

комбинацияси

қуйидагиларни ажратиш

учун фойдалидир

1. Иккиламчи,

учламчи ва тўртламчи

структура

2. Оқсил занжирларининг Н- ва С-учлари; нуклеин кислота занжирларининг 5' ва 3' учлари.

3. Қутбли (зарядланган ёки зарядланмаган: гидрофил) ва гидрофоб аминокислоталарнинг сиртда ва ядрога тарқалиши (слабинг ёрдамида)

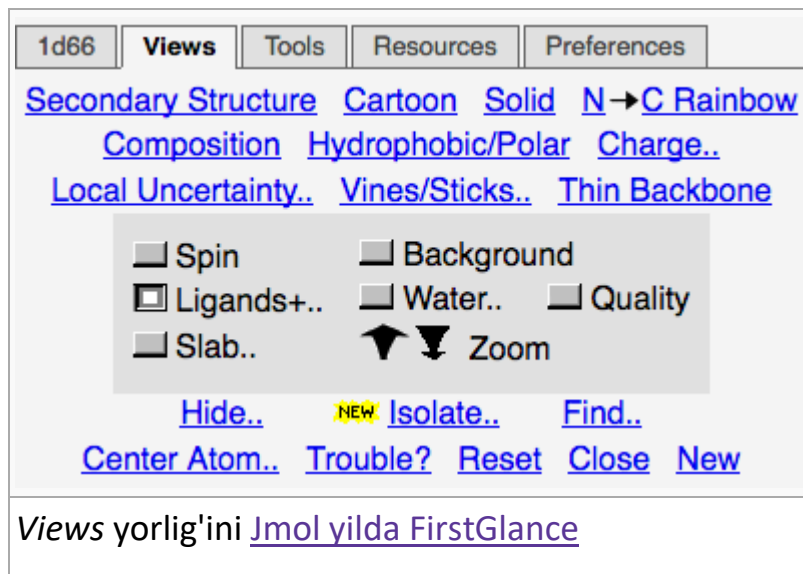
4. Оқсил сиртида мусбат ва манфий зарядларнинг тарқалиши

5. Оқсилнинг функциона ҳудудларини аниқлаш учун эволюцион консервация.

6. интеграл мембрана оқсиллари учун липид биоқатлами чегаралари

[FirstGlance в Jmol](#) . даги the Views tab дисплейида 1-4 хусусиятларни осонгина кўрсатиш мумкин . Эволюцион консервацияни баъзан [one click in Proteopedia](#), бир марта босиш билан кўриш мумкин , ёки бошқа ҳолларда ишни [submitting a job to the ConSurf server](#). серверига топшириш талаб этилади . Интеграл мембрана оқсиллари учун қўш қаватли липид чегараларини визуализация қилиш усуллари [Jmol/Visualizing membrane position](#). ҳолатида келтирилган .

Муайян оқсил учун бундай хусусиятлар *Proteopedia* нинг [Scene Authoring Tools](#) воситаларидан фойдаланиб кўрсатилиши мумкин ва кейин саҳифага ўтиш яшил ҳаволаларга бириктирилган.



Ковалент ва ковалент бўлмаган ўзаро таъсирлар

[FirstGlance in Jmol](#) унинг
ичида, "бир-клик"
дастур ости
программалари *Tools* tab
ажратиш вкладкида
берилган

- ☐ Дисулфид боғлари
- ☐ Туз кўприклари
- ☐ Катион-пи ўзаро таъсирлари
- ☐ ҳар қандай ноковалент таъсирларни танланса *Tools* tab даги *Contacts* ва *Non-Covalent Interactions* ни , босилади.
- ☐ Ҳар қандай икки, 3 ёки 4 атомлар атомлар орасидаги масофани ва бурчаклари ёки икки бурчакли жойларини *Distances/Angles* in the *Tools* tab. фойдаланиб топилади.
- ☐ Кристалл боғлар .



Молекуляр моделларни олиш

Оқсилларнинг молекуляр моделларини [Atlas of Macromolecules](#), the [Molecule of the Month](#), ёки [Protein Spotlight](#) билан олиш мумкин

Эмпирик 3Д моделлар учун [Protein Data Bank](#) кидириш усулларида фойдаланилади. Эмпирик моделлар - бу тажриба, хусусан, рентген нурланишининг тарқалиши, ядровий магнит резонанс ёки электрон кримикроскопия ёрдамида аниқланган моделлардир. Эмпирик моделлар назарий моделларга қараганда анча ишончли, аммо эмпирик моделнинг сифатига эътибор бериш керак, чунки бу моделлар бошқаларга нисбатан анча ишончли ҳисобланади.

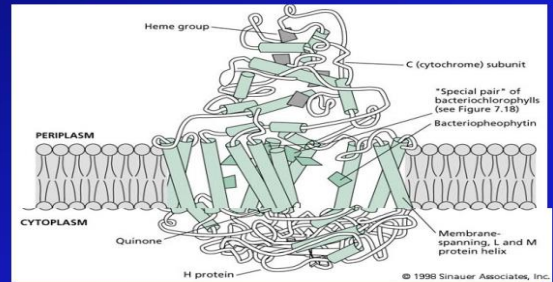
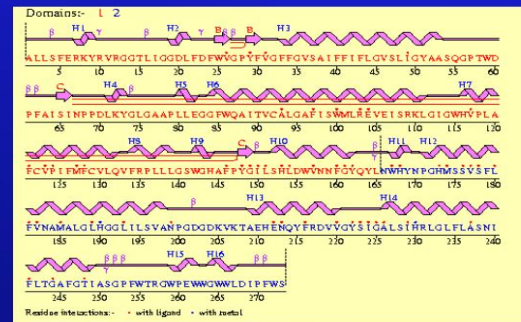
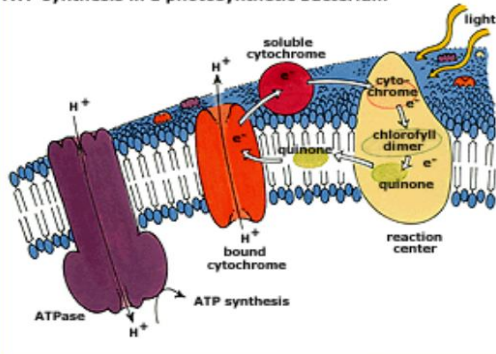
Оқсилларнинг баъзилари, эҳтимол <10% и учун эмпирик моделлар мавжуд, Агар эмпирик модел мавжуд бўлмаса, кейинги энг яхши модел бу

гомологик моделлар ҳисобланади. Барча оксилларнинг учдан бир қисми ишончли равишда гомологик моделлаштирилиши мумкин, аммо гомологик моделлар эмпирик моделларга караганда кўпроқ ноаниқликларга эга ҳисобланади.

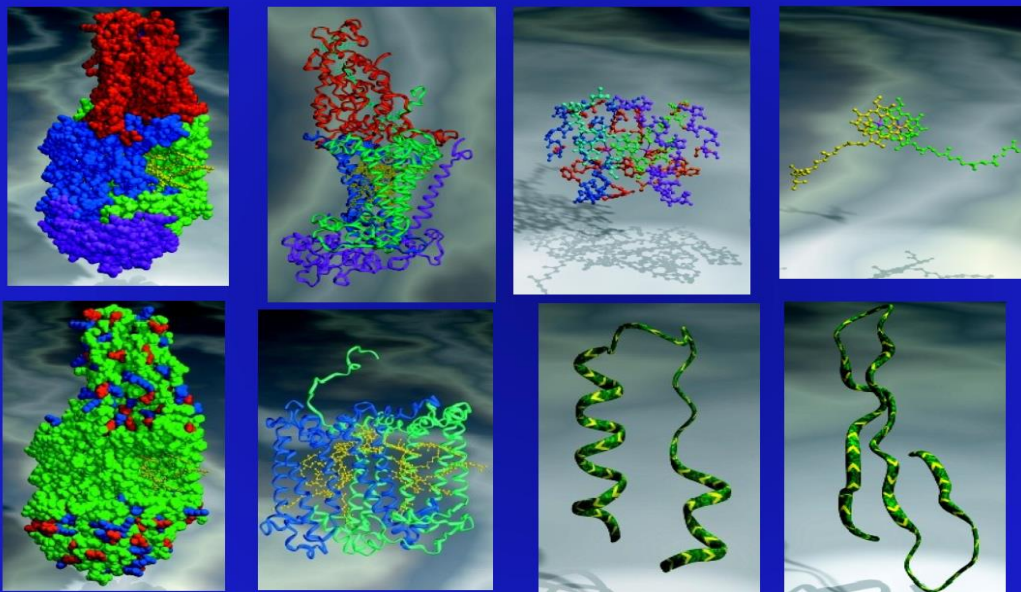
Для чего визуализация?

ALLSFERKYRVGGTLIGGDLDFWVGPYFVGFFGVSAIF
FIFLGVSILGYAASQGPTWDPFAISINPPDLKYGLAAPLE
GGFWQAITVCALGAFISWMLREVEISRKLIGWHVPLAF
CVPIFMFCVLOVFRPLLGSWGHAFFPYGILSHLDWVNNF
GYQYLNWHYNPGHMSSVSFLFVNAMALGLHGGLLSVA
NPGDGDVKVTAENENQYFRDVGYSIGALSIRLGLFLA
SNIFLTGAFGTIASGPFWTRGWPEWWGWLDIPFWS

Light-induced electron transport and ATP synthesis in a photosynthetic bacterium



An Introduction to Protein Architecture By A. M. Lesk



Инструменты визуализации

RasMol / RasTop

Chime

Protein Explorer

Cn3D

YASARA

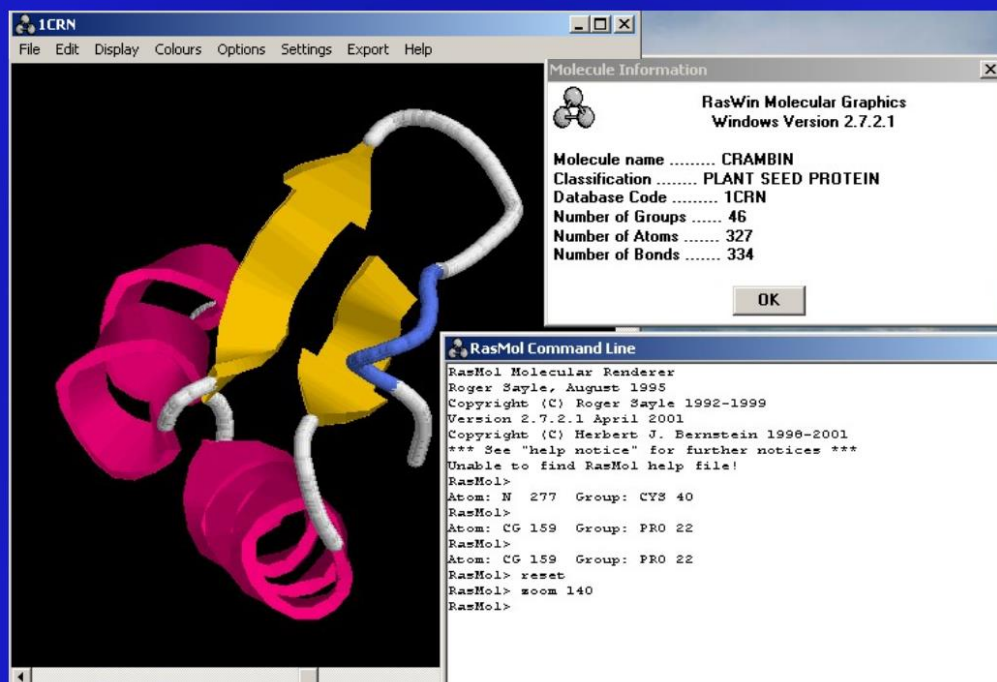
WebLab Viewer

SwissPDB Viewer

VMD

DINO

RasMol



RasTop



Chime



- Plugin для Netscape Communicator и других браузеров
- Основное предназначение – позволяет визуализировать биомолекулы на компьютерах, лишённых каких-либо других инструментов для структурной биологии, работает как надстройка в браузере.
- Подобен RasMol, но не поддерживает командной строки
- Дополнительная информация доступна по
<http://www.umass.edu/microbio/chime/chimehow/chimehow.htm>
- Не включает дополнений и усовершенствований RasMol

Protein Explorer

- Улучшенная версия RasMol
- Графический интерфейс похож на Chime, но с более развитой системой помощи и автоматизации
- Доступен для работы новичкам, нет нужды изучать команды
- Обеспечивает углублённое изучение молекул и их свойств для профессионалов

Protein Explorer




proteinexplorer.org
FrontDoor to Protein Explorer 1.901 Beta
 from the University of Massachusetts -- [Cable/DSL](#) users: the [San Diego mirror](#) will be faster!
 Copyright © 2001 by [Eric Martz](#)
 Bookmark this page. Bookmarking subsequent pages in this site may not work!




Beginners click here:

[Quick-Start Protein Explorer](#) to explore DNA complexed with a protein
 (yeast Gal4 transcriptional regulator, PDB identification code 1d66).
Do the [1 Hour QuickTour](#) for an introduction to Protein Explorer.

Job opportunities!
 Enter my [CV](#)
 Identification Code here:

 (or [Comparator URL](#))

Find your Molecule's PDB ID code

Create hyperlinks that prespecify molecules

Download PDB Files

"Bare" Protein Explorer or Comparator (no molecules prespecified -- specify molecules inside PE)

SH3 Domain:Peptide Complex (proto-oncogene CRK, 1b07)

Lac Repressor:DNA Complex with hydrogens, NMR (3 models, 1lc4)

Larger, slow for modem:

Antibody Fab:Lysozyme Complex (1fdl)

Protein Comparator: side by side comparison of a soluble protein (**deoxyhemoglobin**, 2hhd) vs. an insoluble one (**potassium channel**, 1b18). In QuickViews, be sure to try **COLORS**, **Polarity3**.

QuickTour, FAQ, Help/Index/Glossary, & comprehensive Tutorial.

Lesson Plans and Assessment.

What's New in version 1.901 Beta?

What is the Purpose of Protein Explorer?

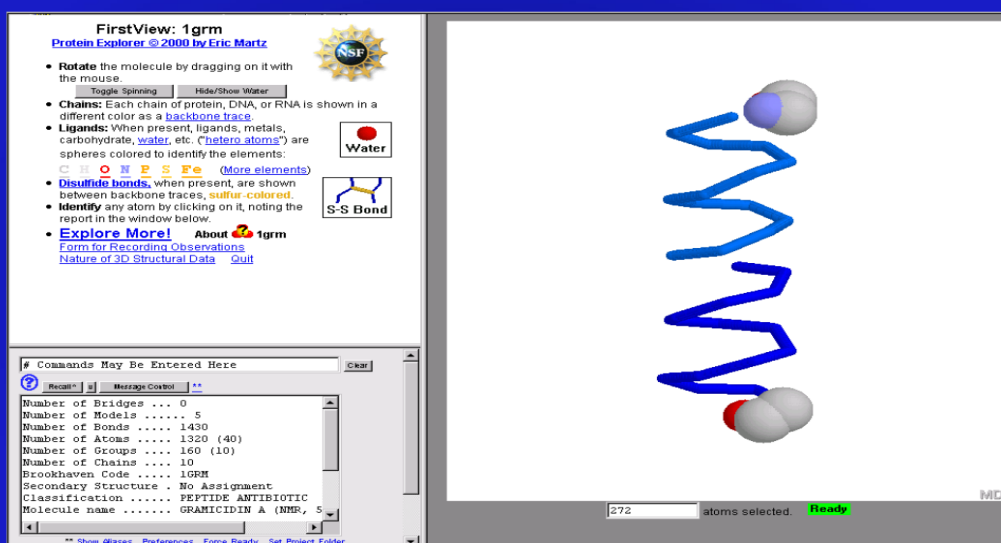
Protein Explorer vs. RasMol

Copyright © 2001 by Eric Martz

Publications about PE.

Presentations in PE.

Protein Explorer



ExPASy



ExPASy Molecular Biology Server

This is the ExPASy (**Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem) proteomics server of the [Swiss Institute of Bioinformatics](#) (SIB). This server is dedicated to the analysis of protein sequences and structures as well as 2-D PAGE ([Disclaimer](#)).

[Announcements](#) [Job opening](#) [Mirror Sites](#)

Databases	Tools and Software Packages
• SWISS-PROT and TrEMBL - Protein sequences • PROSITE - Protein families and domains • SWISS-2DPAGE - Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis • SWISS-3DIMAGE - 3D images of proteins and other biological macromolecules • SWISS-MODEL Repository - Automatically generated protein models • CD40L base - CD40 ligand defects • ENZYME - Enzyme nomenclature • SeqAnalRef - Sequence analysis bibliographic references • Links to many other molecular biology databases	• Proteomics tools ◦ Identification and characterization ◦ DNA -> Protein ◦ Similarity searches ◦ Pattern and profile searches ◦ Post-translational modification prediction ◦ Primary structure analysis ◦ Secondary structure prediction ◦ Tertiary structure ◦ Transmembrane regions detection ◦ Alignment • Melanie 3 - Software for 2-D PAGE analysis • SWISS-MODEL - Automated knowledge-based protein modelling server • Swiss-PdbViewer - Macintosh/PC tool for structure display and analysis • Boehringer Mannheim's Biochemical Pathways
Education and services	Documentation
• The ExPASy FTP server • Swiss-Shop - automatically obtain (by email) new sequence entries relevant to your field(s) of interest • 2-D PAGE training - attend a one-week course in Geneva • SWISS-2DSERVICE - get your 2-D Gels performed according to Swiss standards	• What's New on ExPASy • SWISS-FLASH electronic bulletins • SWISS-PROT documents • How to create HTML links to ExPASy • Complete table of available documents

SwissPdbViewer - Deep view



- Инструмент, обладающий огромными возможностями
- Позволяет анализировать множественные структуры
- Позволяет изменять углы химических связей и производить перенос атомов или групп атомов
- Моделирование мутаций
- Моделирование с использованием гомологов (при подключении к удалённому серверу)
- Базовые минимизации энергии
- Карты электронных полей



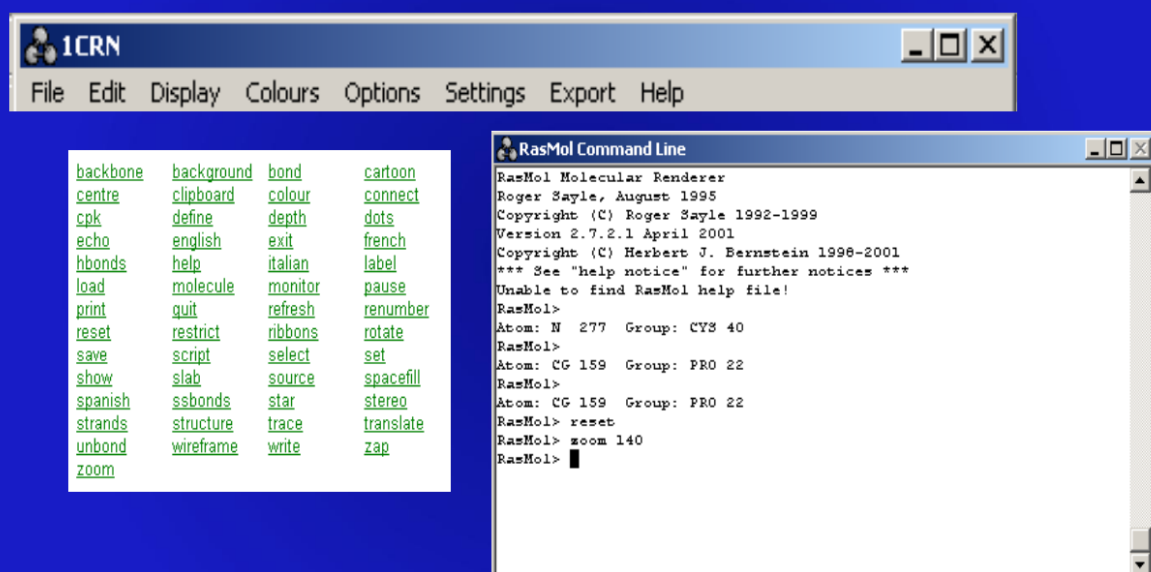
YASARA



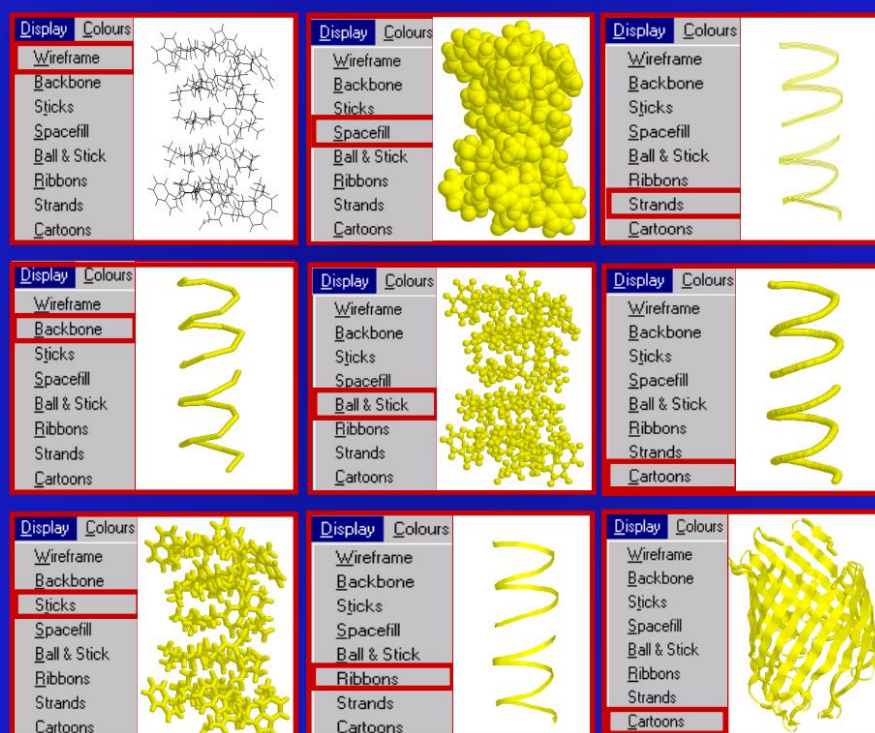
- Yet Another Scientific Artificial Application
- Молекулярная графика на очень хорошем уровне
- Моделирование и симуляции (not free!)



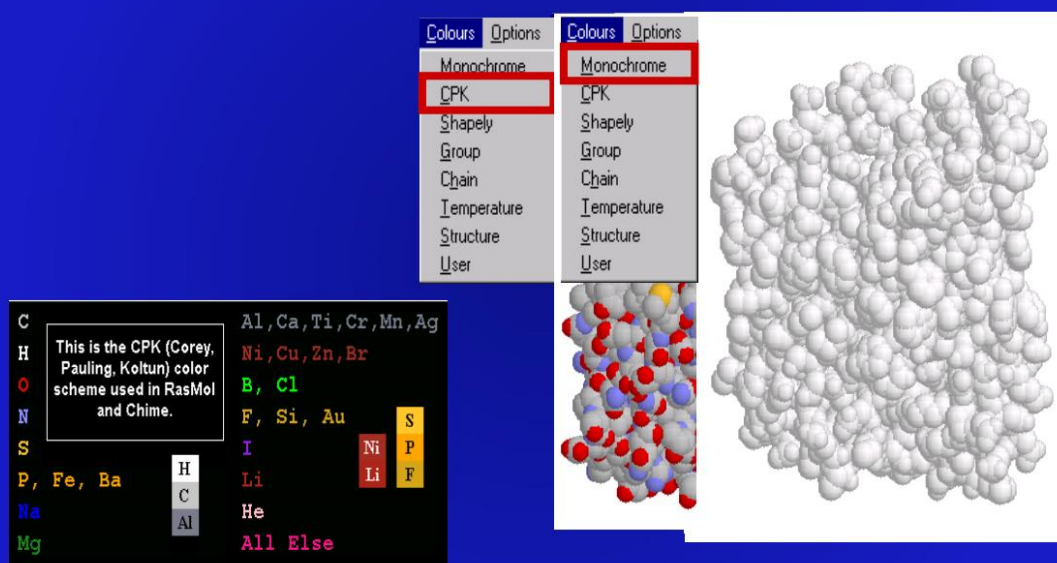
RasMol – Главное меню



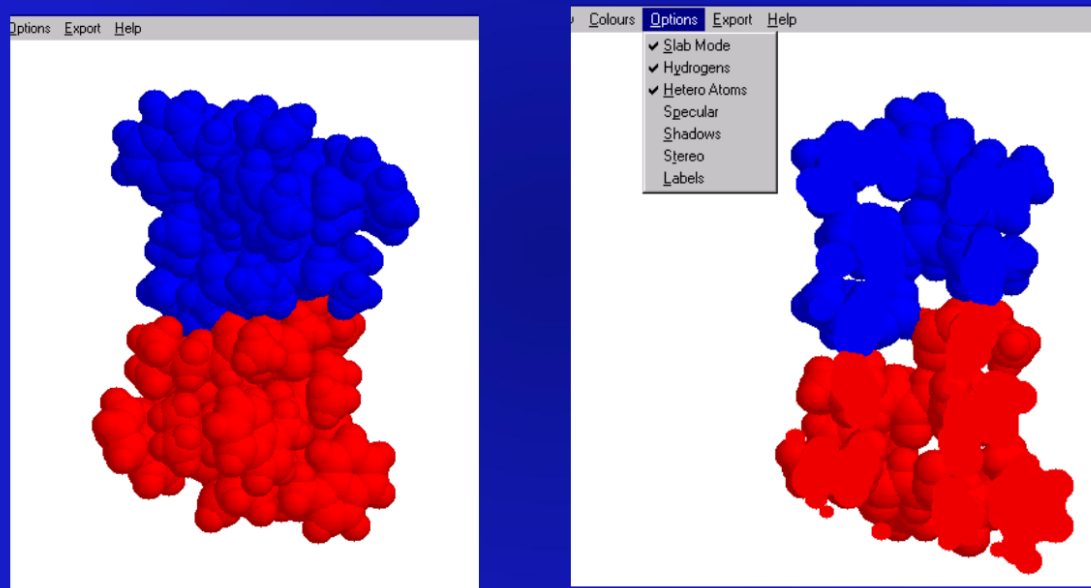
RasMol - Дисплей



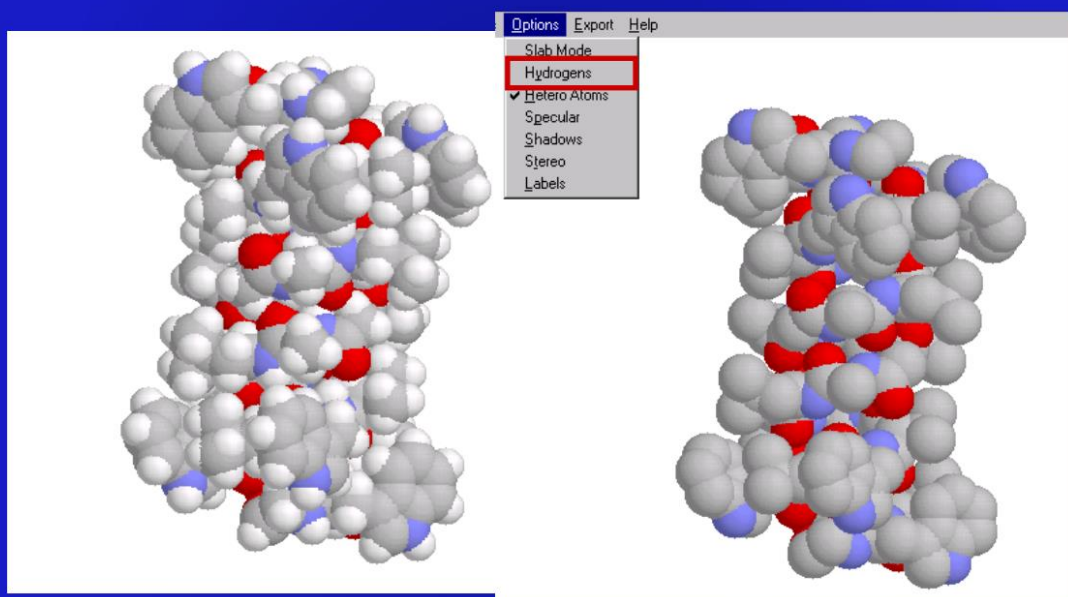
RasMol - Цвет



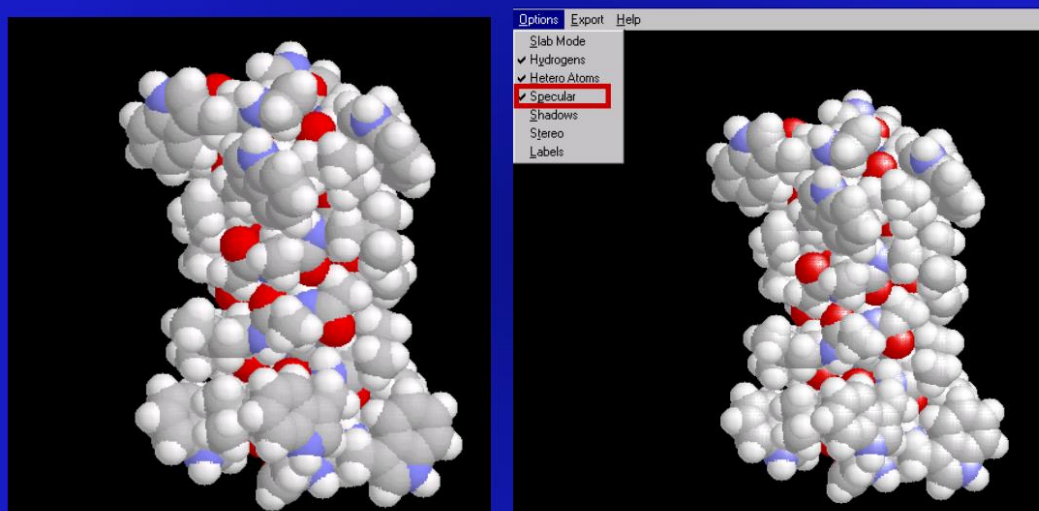
RasMol – Опции → Сечение



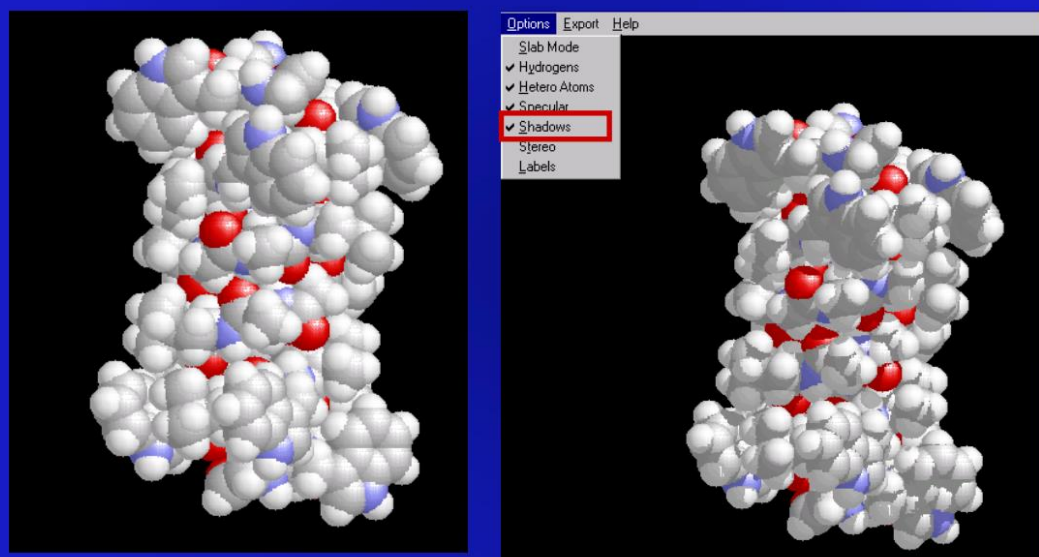
RasMol – Опции → Атомы Н



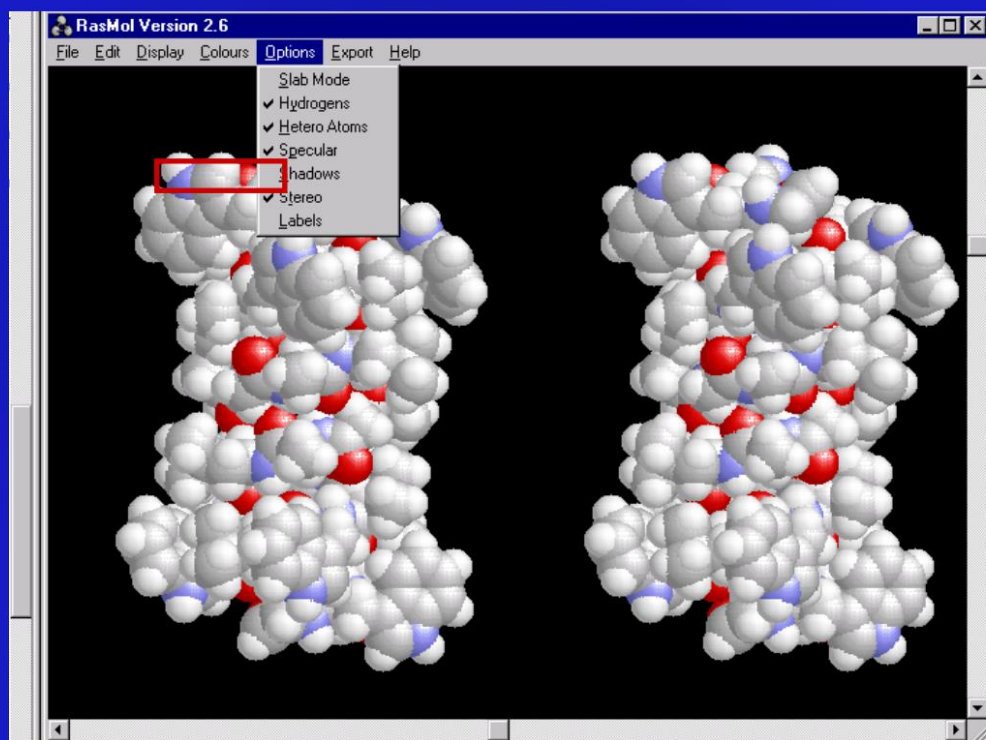
RasMol – Опции → Зеркальная поверхность



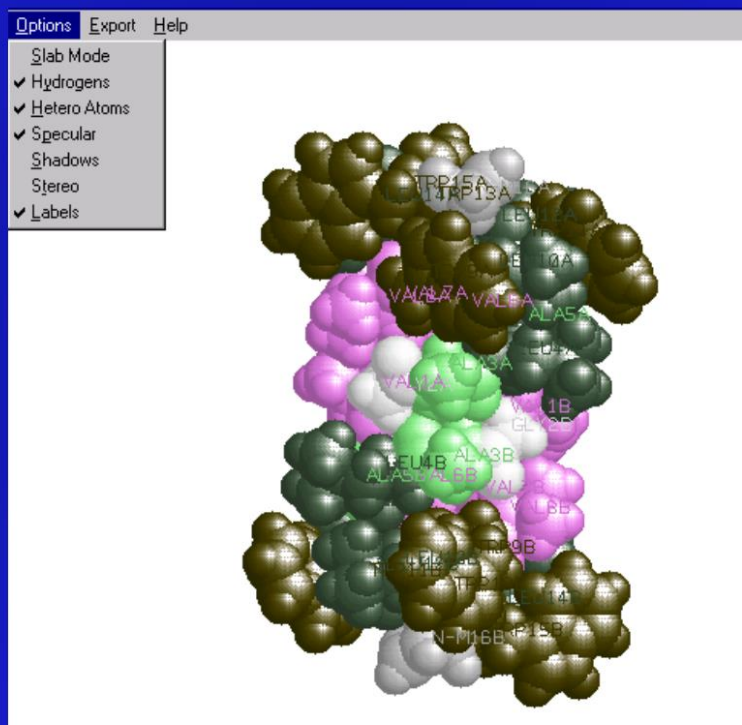
RasMol – Опции → Тени



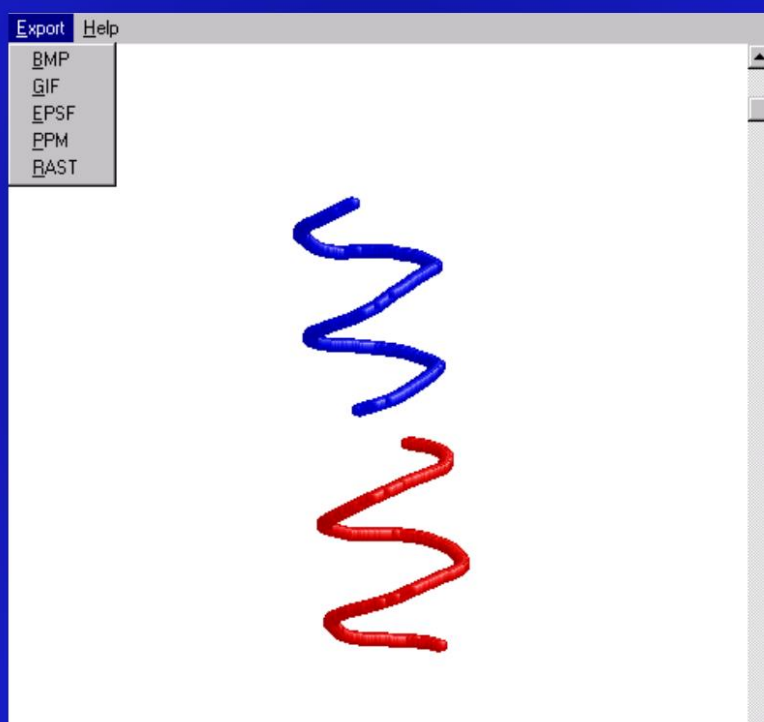
RasMol – Опции → Стерео



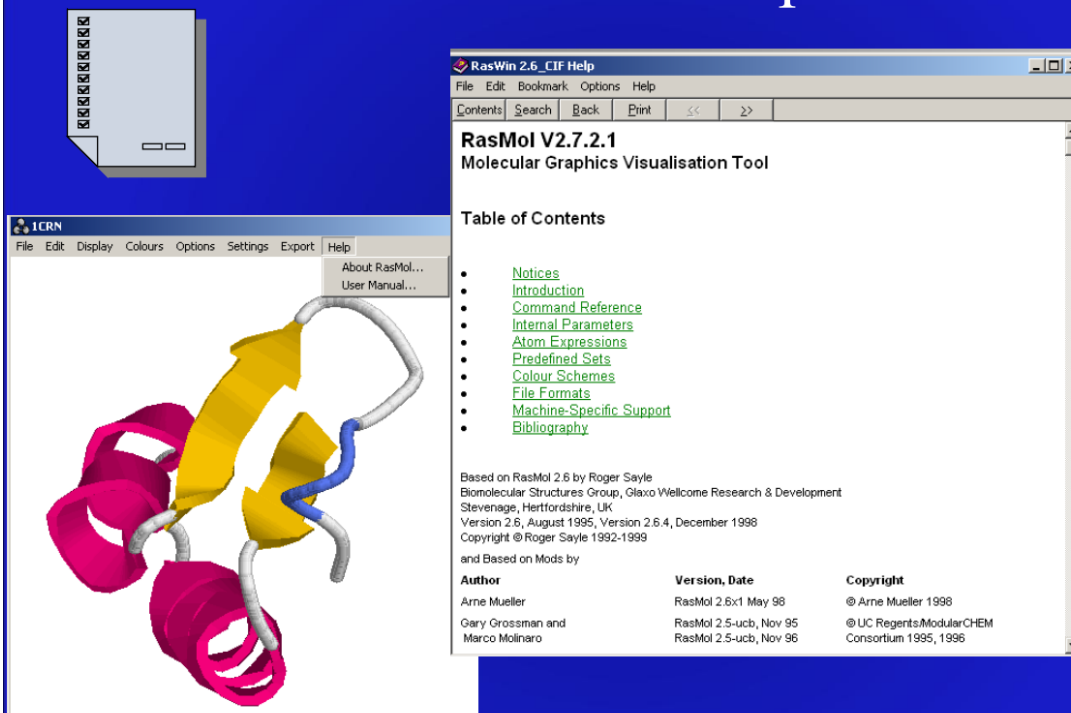
RasMol – Опции → Метки



RasMol - Экспорт



RasMol - Help



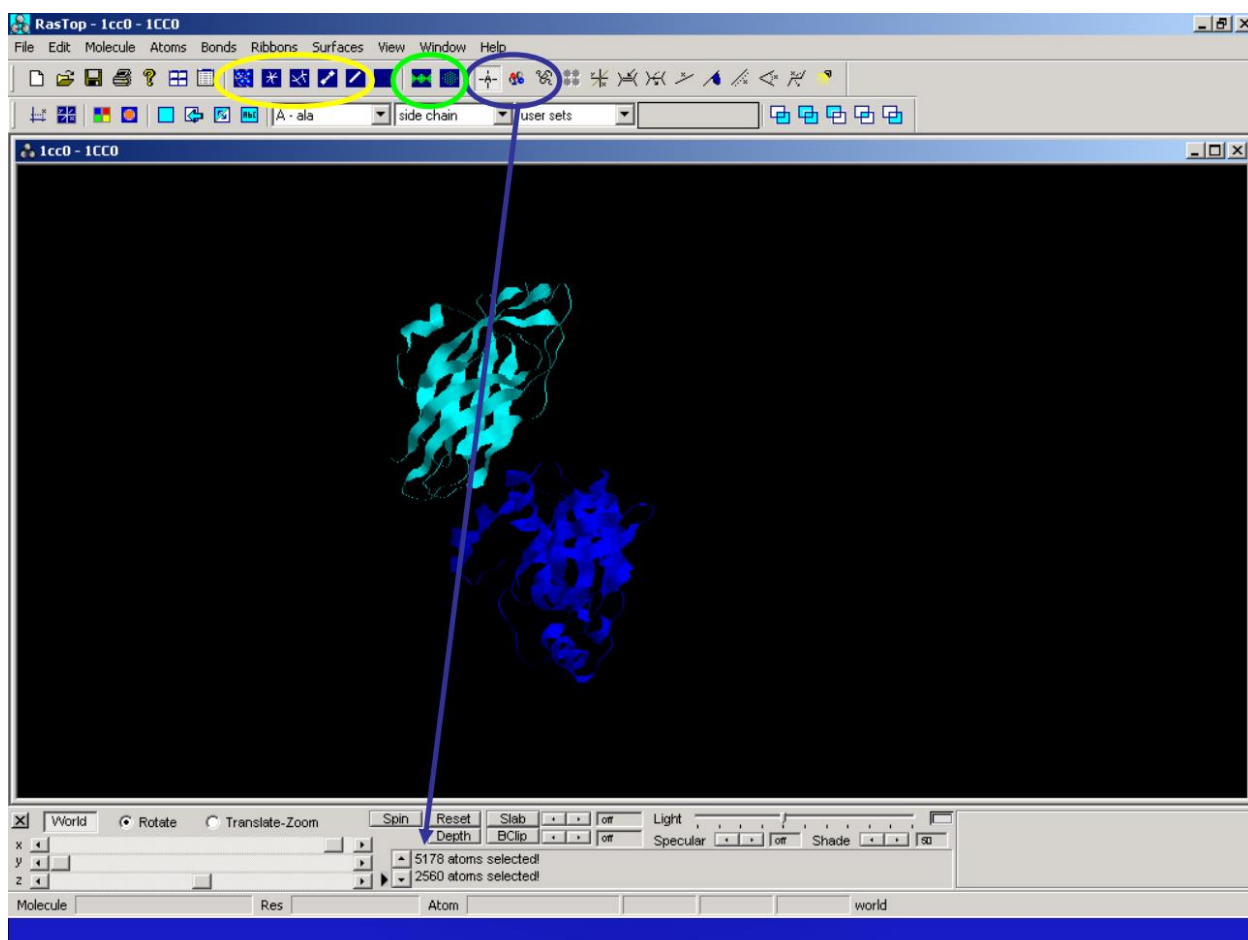
RasMol Manual



RasMol 2.6 Manual

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm#rasmanual>

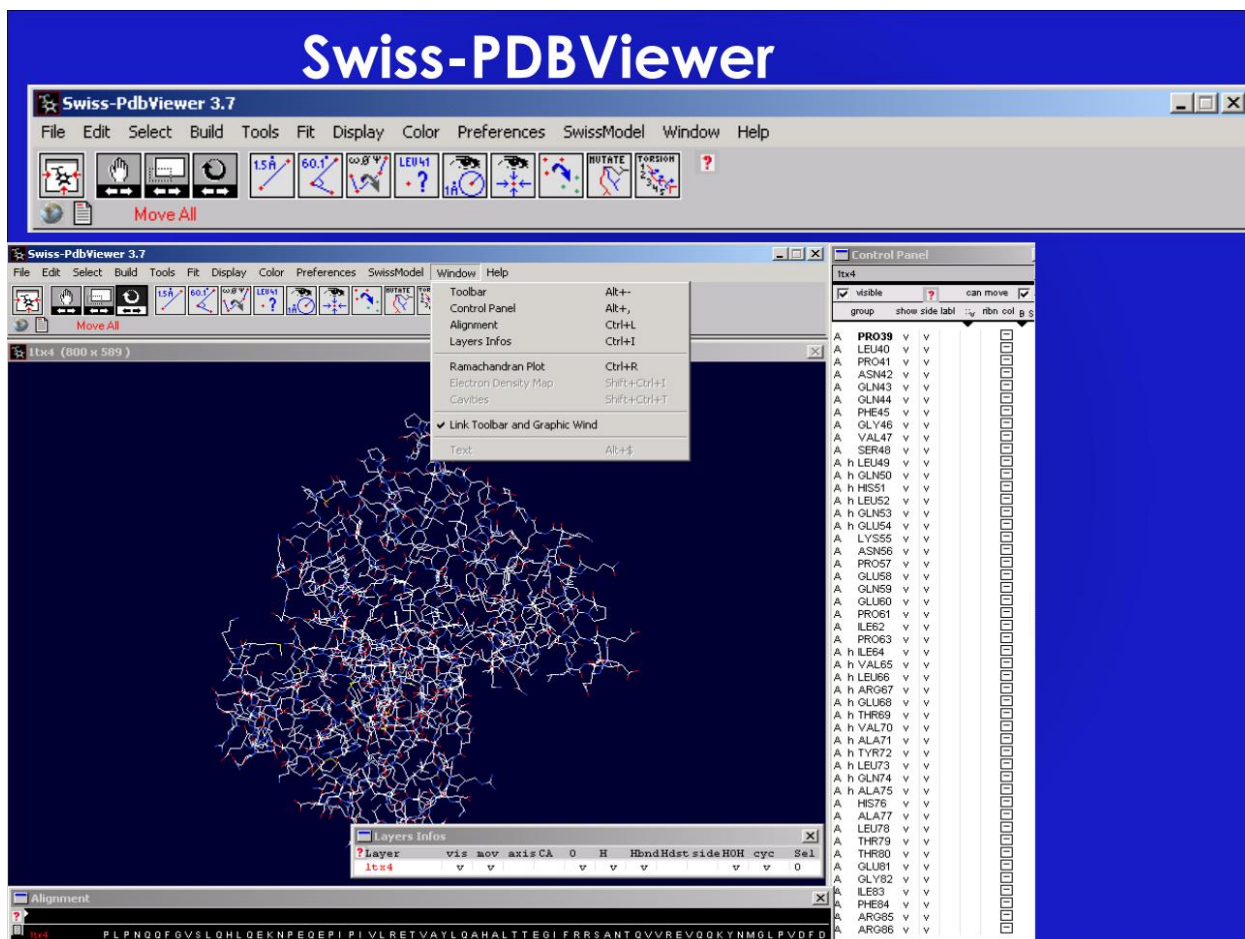
RasMol 2.7 Manual <http://www.rasmol.org/>



Swiss-PDBViewer

Домашняя страница: <http://ca.expasy.org/spdbv/>

Руководство пользователя
<http://ca.expasy.org/spdbv/text/tutorial.htm>.



Адабиёт

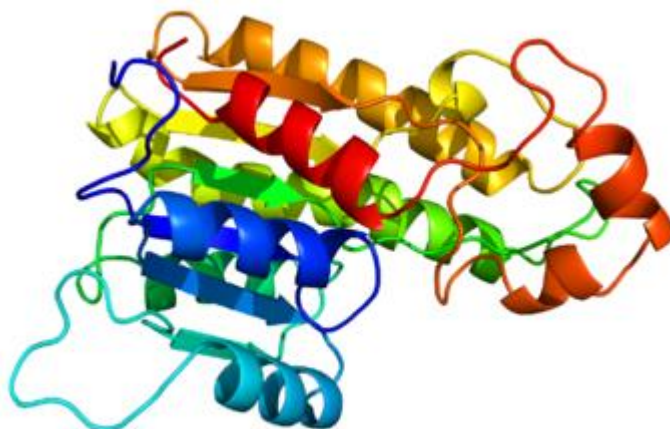
1. https://proteopedia.org/wiki/index.php/Introduction_to_molecular_visualization

Саволлар

1. Молекуляр визуализация деганда нимани тушундингиз?
2. Атом тасвирларини ифода этиш турлари нималар?
3. Силликлаш нима?
4. Соддалаштирилган схематик кўринишларининг ифодаланиш йуллари.
5. Дисулфид занжирлар нима?
6. Структурвий элементларнинг визуализацияси деганда нимани тушундингиз?

§2. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ. ОҚСИЛ МУҲАНДИСЛИГИДА ГОМОЛОГЛАРНИ МОДЕЛЛАШТИРИШ ВА БИОИНФОРМАЦИОН ЁНДАШУВЛАР

Гомологик моделлаштириш, шунингдек, бошқа ном билан оқсилларни *қийёсий моделлаштириш* деганда мақсадли оқсилни унинг аминокислоталари кетма-кетлиги ва экспериментал уч ўлчамли тузилиши ("матрица») асосида атомлари кенгайтмаси сифатида моделини қуриш назарда тутилади. Гомологик моделлаштиришда қидириладиган кетма-кетлик структурасини эслатиб, оқсил моделини текислаш жараёнида матрица кетма-кетлигидаги қолдиқлар билан солиштирилади. Протеин тузилмалари гомологлар орасидаги оқсиллар кетма-кетлигига қараганда кўпроқ сақланиб қолиши исботланган, аммо 20% кам идентик кетма-кетликка тушадиган кетма-кетликлар жуда турли-туман тузилишга эга бўлиши мумкин.



**58-расм. Jscbk оқсил гомологияси модели DHR57Швейцария
ивизиуаллаштириш PyMOL асосида тузилган.**

Эволюцион қариндош бўлган оқсиллар ўхшаш кетма-кетликка эга бўлиб, табиатда гомологик оқсиллар ўхшаш (аналогик) протеин тузилишига эга бўлади. Уч ўлчовли оқсил тузилиши эволюцион консерватив бўлиб, фақат кетма-кетликлари сақланиб қолган тузилишга нисбатан барқарор сақланиб қолишга асослангандан кўра, қутилгандан кўра кўпроқ сақланиб қолишга эга эканлиги исботланган.

Кейин кетма-кетликларни ва шаблон тузилиши тўғирлаш нишондаги оксил моделининг структуравий моделини ишлаб чиқиш учун қўлланилади. Чунки протеин тузилмалари ДНК кетма-кетлигидан кўра кўпроқ сақланиб қола олиши (консервативлиги) сабабли, кетма-кетликларнинг ўхшашлик даражалари одатда муҳим таркибий ўхшашликларни назарда тутди.

Гомологик моделнинг сифати кетма-кетликлар ва матрица тузилишининг тўғирланишига боғлиқ. Ушбу ёндошиш нишонда мавжуд бўлган, аммо шаблонда бўлмаган таркибий минтақани кўрсатувчи зазор-бўшлиқлари (одатда инделка деб аталади) мавжудлиги ва шаблон таркибидаги бўшлиқлар экспериментал (одатда Х-нурли кристаллография) жараёнининг яхши ечилмаганлиги билан мураккаблашиши мумкин. Моделнинг сифати кетма-кетликлар идентиклиги ўхшашлиги камайиши пасаяди.

Одатда, бир модел $\sim 1-2 \text{ \AA}$ ўртача стандарт чекланишга C^α билан мослашган бўлиб 70% идентик кетма-кетликларга эга бўлади, лекин фақат 2-4 $\text{\AA}$ да ва 25% идентик кетма-кетликларга мос келади. Шу билан бирга, хатолар минтақа минтақаларида сезиларли даражада юқори, бу ерда нишон ва шаблон оксилларининг аминокислоталар кетма-кетлиги мутлақо бошқача бўлиши мумкин.

Гомологларни моделлаштириш усули аминокислоталар кетма-кетлигидан кўра оксилнинг учламчи тузилиши яхшироқ сақланишига асосланади.

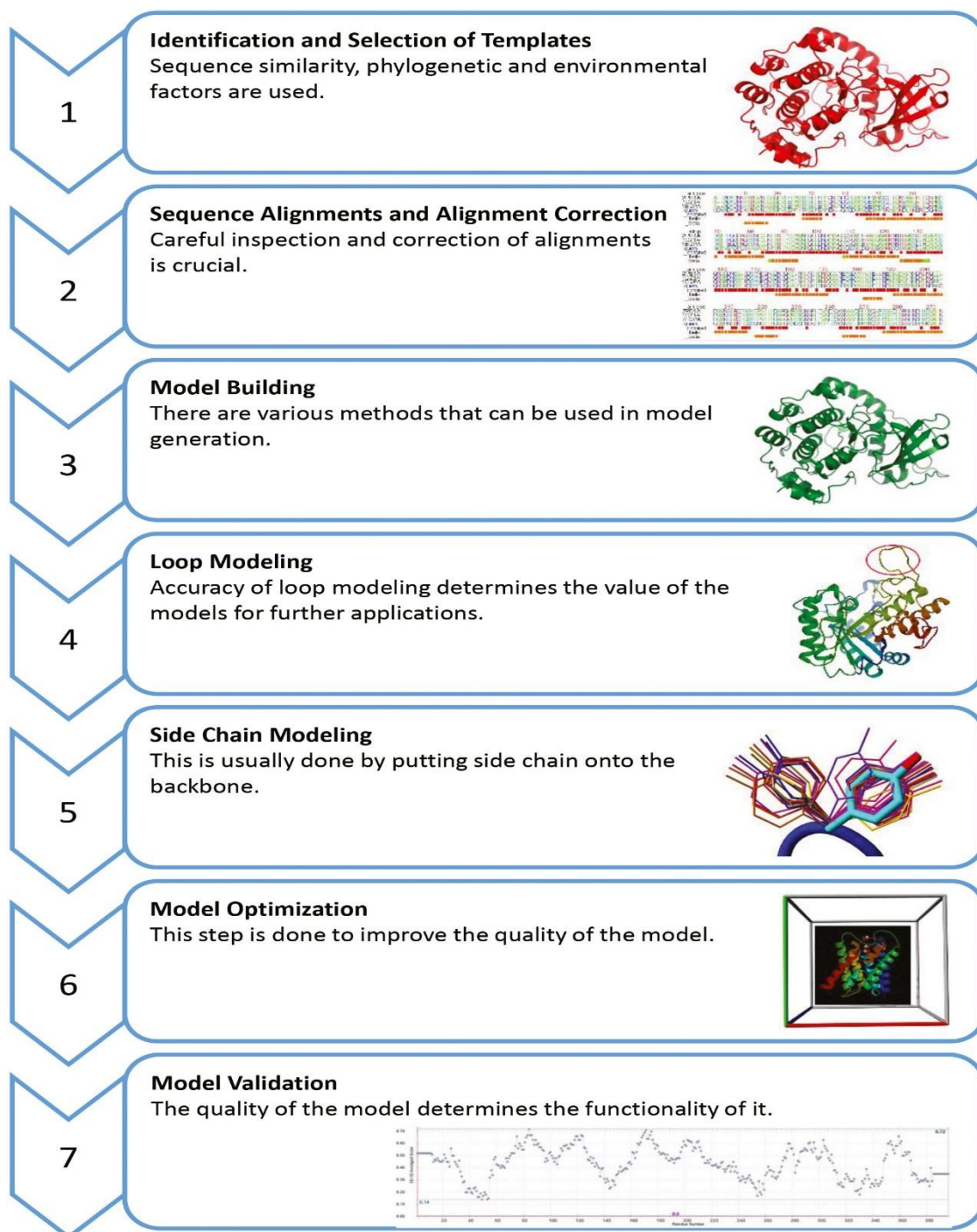
Шундай қилиб, бир-биридан кетма-кетларни бўйича сезиларли даражада ажралиб чиққан, аммо аниқланадиган ўхшашликка эга бўлган оксиллар ҳам умумий таркибий хусусиятларга, хусусан, умумий йиғмага эга бўлади. Ҳар бир қизиқилган оксил учун рентген кристаллографияси ва оксил ЯМР и каби усуллардан экспериментал тузилмаларни олиш қийин ва кўп вақт талаб этдиганлиги сабабли, гомологияни моделлаштириш йўли билан оксилнинг функцияси ҳақида гипотезалар яратиш ва кейинги тажриба

ишларига йўналтириш учун фойдали структуравий моделларни такдим қилиши мумкин.

Умумий қоидада истиснолар мавжудки, уларга кўра, сезиларли даражада идентик кетма-кетликка эга оқсиллар умумий бир йиғмага фарқ эга бўлади. Масалан, оқсилнинг 50% дан камни ташкил этадиган оқилонга танланган мутациялари тўплами оқсилнинг мутлақо бошқа йиғилишига олиб келиши мумкин. Шу билан бирга, бундай катта таркибий қайта ташкиллаштириш содир бўлиши эволюцияда даргумон, чунки оқсил одатда чеклов остида бўлиб, тўғри буралиб олиши ва хужайрадаги ўз функциясини бажариши лозим. Шундай қилиб, оқсилнинг буралгаг тузилиши (унинг "топологияси") аминокислоталар кетма-кетлигидан кўра мустақкамроқ ва унга ва мос келадиган ДНК кетма-кетлигидан анча узунроқ бўлади. Бошқача қилиб айтганда, иккита оқсилнинг эволюцион алоқалари қанчалик узоқ бўлса ўхшаш йиғмага эга бўлиб, ўзаро таққослаши билан ҳам уларни фарқлаб бўлмайди. Таққослаш учун, оқсилнинг функцияси оқсиллар кетма-кетлигидан анча паст консерватив бўлади, чунки ўхшан функцияни бажариш ўз зиммасига олиш учун аминокислоталар кетма-кетлигига нисбатан озги ўзгаришлар киритилиши кифоя бўлади

Модел ишлаб чиқаришдаги қадамлар

Гомологияни моделлаштириш процедурасини тўртта кетма-кет босқичга бўлиш мумкин: шаблонни танлаш, шаблонни мослаштириш, моделни тузиш ва моделни баҳолаш. Дастлабки иккита қадам кўпинча биргаликда бажарилади, чунки шаблонларни аниқлашнинг энг кенг тарқалган усуллари кетма-кетлик тўғирланадиган кетма-кетликларни олишга асосланади; аммо, бу мосланишлар етарли сифатга ега бўлмаслиги мумкин, чунки маълумотлар базасидан қидириш усулларида тезкорлик сифат мосланишига нисбатан устун қўйилади. Ушбу жараёнлар яқуний моделнинг сифатини яхшилаш учун уйғун бажарилиши мумкин, сифатни баҳолаш гарчи ҳақиқий мақсадли тузилмага боғлиқ бўлмаса ҳам сифатни баҳолаш йўллари ишлаб чиқиш ҳали давом этмоқда.



29-расм. Гомологик моделлаштиришни амалга ошириш боскичлари.

Андогани танлаш ва кетма-кетликларни тўғирлаш

Гомологияни моделлаштиришда биринчи муҳим кадам, агар мавжуд бўлса, энг яхши шаблон тузилишини аниқлашдир. Андогани аниқлашнинг энг оддий усули ФАСТА ва БЛАСТ каби маълумотлар базасини қидириш усуллари ёрдамида кетма-кетлик бўйича тўғирлашга асосланади. Мисол сифатида кўп учрайдиган ПСИ-БЛАСТ усуллари кетма-кетликни тўғирлашга асосланган янада сезгир усуллар бўлиб, узоқроқ боғлиқ бўлган

гомологларнинг кетма-кетлигини аниқлаш учун ўзларининг позицияларига мос скирининг матричасини тезкор янгилайди. Ушбу усуллар туркуми кўплаб потенциал шаблонларни яратиш ва ҳар қандай ечимдаги структура билан фақат узоқ алоқага эга бўлган кетма-кетликлар учун яхшироқ шаблонларни аниқлаши намоиш этилган. Қуйидаги расмларда ушбу кадамларнинг кетма-кетлиги келтирилган.

```
FASTA

>roa1_drome Rea guano receptor type III >> 0.1
MVNSNQNGNSNGHDDDFPQDSITEPEHMRKLFIGGLDYRTTDENLKAHEKWGNIVDV
VVMKDPRTKRSRGFGFITYSHSSMIDEAQKSRPHKIDGRVEPKRAVPRQDIDSPNAGATVK
KLFVGALKDDHDEQSIRDYFQHFGNIVDNVIDKETGKKRGFAFVEFDDYDPVDKVVLOK
QHQLNGKMDVDVKKALPKNDQQGGGGGRGGPGGRAGGNRGNMGGGNYGNQNGGGNW
NNGGNNWGNRRGNDNWGNNSFGGGGGGGGGYGGGNNSWGNNNPWDNGNGGGNFGG
GGNNWNGGNDFGGYQQNYGGGPQRGGGNFNNRMQPYQGGGGFKAGGGNQGNNGN
NQGFNNGGNNRRY

>roa2_drome Rea guano ligand
MVNSNQNGNSNGHDDDFPQDSITEPEHMRKLFIGGLDYRTTDENLKAHEKWGNIVDV
VVMKDPTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTST
KLFVGALKDDHDEQSIRDYFQHLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL
QHQLNGKMDVDVKKALPKNDQQGGGGGRGGPGGRAGGNRGNMGGGNYGNQNGGGNW
NNGGNNWGNRRGNDNWGNNSFGGGGGGGGGYGGGNNSWGNNNPWDNGNGGGNFGG
GGNNWNGGNDFGGYQQNYGGGPQRGGGNFNNRMQPYQGGGGFKAGGGNQGNNGN
NQGFNNGGNNRRY
```

30-рам. FASTA дастурида оқсил кетма-кетлининг кўриниши.

Выборка гомологичных белков

UniProtKB/Swiss-Prot description: dUTPase				
Description				
There are 212 UniProtKB/Swiss-Prot entries with the description dUTPase. The following is a list of the first 100 entries, sorted by entry name (ID).				
Entries in UniProtKB/Swiss-Prot (212)				
Send selected sequences to (Retrieve sequences (FASTA format)) [X] [Ortpasits.ampsc] [Select all]				
Cluster W (multiple alignment) T-COFFEE (multiple alignment) MAFFT (multiple alignment) Reduce redundancy JACOPO (build clusters) PRATT (find conserved patterns) Retrieve entries (Swiss-Prot format) SHOPS (show operon structures for complete prokaryotic genomes) Retrieve accession numbers				
Entry name	AC	Protein description	Organisms	Length
☐ DUT_ACIAD	Q6FDR0	nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase)	Acinetobacter sp. (strain ADP1)	150
☐ DUT_ADEG1	Q89662	nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase)	Avian adenovirus gal1 (strain Phelps) (FAdV-1) (Fowl adenovirus 1)	176
☐ DUT_ADEG8	Q8YYS0	nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase)	Avian adenovirus 8 (strain ATCC A-2A) (FAdV-8) (Fowl adenovirus 8)	168
☐ DUT_AERPE	Q9YG32	Probable deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Aeropyrum pernix	156
☐ DUT_AGR75	Q8UJ11	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Agrobacterium tumefaciens (strain C58 / ATCC 33970)	156
☐ DUT_ANAMM	Q5FAE6	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Anaplasma marginale (strain St. Maries)	147
☐ DUT_ANTLO	Q6E4G0	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Antonospora locustae (Nosema locustae)	143
☐ DUT_AQUAE	Q66592	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Aquifex aeolicus	150
☐ DUT_ARCFU	Q29157	Probable deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Archaeoglobus fulgidus	166
☐ DUT_ASHG0	Q74ZF0	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Ashbya gossypii (Yeast) (Eremothecium gossypii)	153
☐ DUT_AZOSE	Q5P729	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Azoarcus sp. (strain Ebn11) (Aromatoleum aromaticum (strain Ebn11))	146
☐ DUT_BACFN	Q5LIH9	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23) (dUTPase) (dUTP pyrophosphatase)	Bacteroides fragilis (strain ATCC 25285 / NCTC 8343)	142

31-расм. FASTA дастуридан гомологик кетма-кетликни танлаш.

Сохранить в FASTA формате

```
>DUT_ACIAD
MKVQVKILDQRLGOEWPLPSYATTGSAGLDLRACLDEAIQIEPGQTVLIKTGMAYIYHDT
NFAGLILPRSGLGHHKGVNLVGLIDSDYQELMISVWNRQNTFTLEPGERLAQYVL
VPVIAEFQVEEFVATDRGAGGFGHTGQK
>DUT_ADEG1
MDPFGSSSVPPCSTSDLPKFLYFVRLSPHAVPPVRAATHGAAGYDLFSAYDIKVPARGRA
LVPTDLVFPQPPGCGYRIAPRSLAAKFFIDVGAGVIDPDYRGNVSVVLFNFSESSFNIR
RGDRVAQLILERIMVPELSELTQLGETDRGASGFGSTGMGAVDNRQSVLEWLTGSR
>DUT_ADEG5
MSFDSCCPPTPPVKLLFKKHSPFAVTPQATSGAAGYDLCSADVVVPKSRSLIPTDLS
FOFPRGVYRIAPRSLAAKFFIDVGAGVIDSDYRGIYVLLFNFSDHNFVNRGRDRIAQ
LILRHLPDLEERSGLDETARGAAGFGSTGGFTDGVCPSSFS
>DUT_AERPE
MFLSGRDLVLLGVVKGHNGAIQPAVDLSVGEIESLADAGFLGEEDKINPKGDRIQCEY
GVCELEPGAYRLRFNEVVSIPPHVGFCEPFRSSLLRMGCYLGCAVWDPGYTRGQAMLLV
ANPHGLRLENGSRIAQLVVARVEGLTSLYKGDYQEGEL
>DUT_AGRTS
MTVCNDRPLRLRLVLANGADLELPSYETRGAAGMDLRAAVPADEPLNLQGERALVPTG
FIFEVPGQYEAQIRPRSLAIKNGITCLNSPGTVSDSYRGEVKVILANLGQDDFTIERGM
RIAQMVIAPVTQTVSEVTSETARGAGGFGSTGV
>DUT_ANAHM
MLKVILRLASGYGLPLPSYATPKSAGLDLYAAVDSKLVVHPGGRCVAVTGVALELPGY
EAQIRPSRGLAANFGICVLNAPGTIDSYRGEITVVLNFGSEDVVISRGDRVAQMVIAP
VERVEVEVNSITATSRGEGGFGSTGT
>DUT_ANTLO
MSEIITVKRLFSDAKIPVRHSEGAAYDLYAYEDTVVAPNERKVIATGVRIITVPLSCQGT
IYSRGLALKYCIEIFGVNIGPGETKDIVVDIYNHGMPPFNVAKGRDRIQIVFIKLFGGD
LHEVSELSDTKRGSCGWSTGIS
>DUT_AQUAE
MSKVILKIKRLPHAQDLPLPSYATPHSSGLDLRAAIEKPLKIPFERVLIPTGLILEIPE
GYEQVPRPSGLAWKGLTVLNAPGTIDSYRGEVKVILVNLGNEEVVIERGERIAQLVI
APVQRVEVEVEVVSQTRGEGGFGSTGT
>DUT_ARCFU
MAVLSGDEIRKLIQKEGLIRDYVDLETOIQPNFGDCTLSVYPLRGCGRVDFNRSREL
ELEVEFRDWWVLPGKVYAKLNEVVLNGLIMAIAPRSTLIRCGANVLTAVWDAGYEG
RSEVSIIVVNDYGIULSRNARIQLVFIRLSSPTKGYEGVYKGENIDS
>DUT_ASHGO
MTDQPAKKVHSAPTLLKVLRSNAIAPTKGSAAGYDIYASQDCVPIPRGQGLVATDVS
FTVPVGTYGRIPRSLAVKHGIQTGAGVDRDYTGVEVKIVLFNHSRDRYAVKRGDRVAQ
```

32-расм. FASTA дастурида маълумотни сақлаш.

Стандартная запись Swiss-Prot

Search for

UniProtKB/Swiss-Prot entry Q9CIT4

[\[Entry info\]](#) [\[Name and origin\]](#) [\[References\]](#) [\[Comments\]](#) [\[Cross-references\]](#) [\[Keywords\]](#) [\[Features\]](#) [\[Sequence\]](#) [\[Tools\]](#)

[Printer-friendly view](#) [Submit update](#) [Quick BlastP search](#) [Entry history](#)

Note: most headings are clickable, even if they don't appear as links. They link to the user manual or other documents.

Entry information

Entry name	ACMA_LACLA
Primary accession number	Q9CIT4
Secondary accession numbers	None
Integrated into Swiss-Prot on	August 14, 2001
Sequence was last modified on	June 1, 2001 (Sequence version 1)
Annotations were last modified on	October 2, 2007 (Entry version 45)

Name and origin of the protein

Protein name	Probable N-acetylmuramidase [Precursor]
Synonyms	EC 3.2.1.17 Peptidoglycan hydrolase Autolysin Lysozyme
Gene name	Name: acmA
Ordered/LocusNames	LL0272
From	Lactococcus lactis subsp. lactis (Streptococcus lactis) [TaxID: 1360] [HAMAP proteome]
Taxonomy	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus
Protein existence	3: Inferred from homology

References

[1] NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE GENOMIC DNA].
STRAIN=IL 1403.
DOI=10.1101/gr-1697R; PubMed=11337471 [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Bolotin A., Wincker P., Mauder S., Jallion O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A.;
"The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL 1403.";
Genome Res. 11:731-753(2001).

Comments

- FUNCTION:** Required for cell separation during growth (By similarity).
- CATALYTIC ACTIVITY:** Hydrolysis of 1,4-beta-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in a peptidoglycan and between

33-расм. Swiss-Prot дастуридаги стандарт ёзувлар.

Стандартные поля: entry, name, origin

UniProtKB/Swiss-Prot entry P00533

[Entry info] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features] [Sequence] [Tools]

Note: most headings are clickable, even if they don't appear as links. They link to the user manual or other documents.

Entry information

Entry name	EGFR_HUMAN
Primary accession number	P00533
Secondary accession numbers	O00688 O00732 P06268 Q14225 Q92795 Q9BZS2 Q9GZX1 Q9H2C9 Q9H3C9 Q9UMD7 Q9UMD8 Q9UMG5
Integrated into Swiss-Prot on	July 21, 1986
Sequence was last modified on	November 1, 1997 (Sequence version 2)
Annotations were last modified on	October 2, 2007 (Entry version 121)

Name and origin of the protein

Protein name	Epidermal growth factor receptor [Precursor]
Synonyms	EC 2.7.10.1 Receptor tyrosine-protein kinase ErbB-1
Gene name	Name: EGFR Synonyms: ERBB1
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Homnidae; Homo.
Protein existence	1: Evidence at protein level

References

(1) NUCLEOTIDE SEQUENCE (MENA) (FORM 1)

Название записи, уникальный идентификатор (ID), предыдущие идентификаторы соответствующей записи, даты первой и последней модификаций, распространенное название белка и его синонимы (ЕС номер для ферментов), название гена, организм и его таксономия, уровень подтверждения

34-расм. Swiss-Prot дастуридаги стандарт чегаралар: entry, name, origin

NiceZyme (ферменты)

NiceZyme View of ENZYME: EC 2.7.10.1

Official Name

Receptor protein-tyrosine kinase.

Alternative Name(s)

Receptor protein tyrosine kinase.

Reaction catalysed

ATP + a [protein]-L-tyrosine <=> ADP + a [protein]-L-tyrosine phosphate

Comment(s)

- The receptor protein-tyrosine kinases, which can be defined as having a transmembrane domain, are a large and diverse multigene family found only in metazoans.
- In the human genome, 58 receptor-type protein-tyrosine kinases have been identified and these are distributed into 20 subfamilies.
- Formerly EC 2.7.1.112.

Cross-references

PROSITE	PD000100
BRENDA	2.7.10.1
PUMA2	2.7.10.1
PRIAM enzyme-specific profiles	2.7.10.1
KEGG Ligand Database for Enzyme Nomenclature	2.7.10.1
IUBMB Enzyme Nomenclature	2.7.10.1
IntEnz	2.7.10.1
MEDLINE	Find literature relating to 2.7.10.1
MetaCyc	2.7.10.1

P13369, TLE55_HUMAN;	P20806, TLE55_DROVI;	Q9UN73, AAK_HUMAN;
P97793, AAK_MOUSE;	Q9V085, CAD96_MOUSE;	P79750, CSF11_HUMAN;
Q81V98, CSF12_FUGRO;	Q91886, CSF1P_DANRE;	P13369, CSF1P_FELCA;
P07333, CSF1P_HUMAN;	P09581, CSF1P_MOUSE;	Q00495, CSF1P_RAT;
Q08345, DOK1_HUMAN;	Q03146, DOK1_MOUSE;	Q77843, DOK1_PANTH;
Q63474, DOK1_RAT;	Q16832, DOK2_HUMAN;	Q62371, DOK2_MOUSE;
P11397, EGFR_CHICK;	P04412, EGFR_GORGE;	P00533, EGFR_HUMAN;
P55245, EGFR_MACMU;	Q01279, EGFR_MOUSE;	Q10656, EG115_CAMEL;
Q11140, EPHA4_DANRE;	Q91845, EPHA4_XENLA;	Q91694, EPHA6_XENLA;
Q91571, EPHA4_XENLA;	Q91796, EPHA5_XENLA;	P21709, EPHA1_HUMAN;
Q60750, EPHA1_MOUSE;	P29317, EPHA2_HUMAN;	Q1K166, EPHA2_MACFA;
Q03145, EPHA2_MOUSE;	P29316, EPHA3_CHICK;	Q13146, EPHA3_DANRE;
P29320, EPHA3_HUMAN;	P29319, EPHA3_MOUSE;	Q08680, EPHA3_RAT;
Q07496, EPHA4_CHICK;	P54764, EPHA4_HUMAN;	Q01137, EPHA4_MOUSE;
P54755, EPHA5_CHICK;	P54756, EPHA5_HUMAN;	Q06029, EPHA5_MOUSE;
P54757, EPHA5_RAT;	Q9U733, EPHA6_HUMAN;	Q62413, EPHA6_MOUSE;

35-расм. Ферментлар тўғрисидаги маълумотлар.

Taxonomy Browser

The screenshot shows the UniProt Taxonomy Browser interface. At the top, there's a search bar and navigation tabs for Home, Archaea, Bacteria, Eukaryota, Viroids, and Viruses. A notice states: "Notice: This page will be replaced with beta.uniprot.org. Please send us your feedback!". The main section is titled "Homo sapiens (Human)". It contains a table with taxonomic information:

Lineage	Taxonomy Identifier	9606	External information
Eukaryota	Organism identification code	HUMAN	
Metazoa	Scientific name	Homo sapiens	
Chordata	Common name	Human	
Craniata	Synonym	-	
Vertebrata	Other NCBI synonyms	man	
Euteleostomi	Rank	species	
Mammalia	Number of UniProtKB/Swiss-Prot entries	17483	http://www.mnh.si.edu/anthro/humanorigins/ha/sap.htm
Eutheria	Number of UniProtKB/TREMBL entries	53589	http://www.ebi.ac.uk/integr8/QuickSearch.do?action=doOrgSearch&organismName=homo
Euarchontoglires			
Primates			
Haplorhini			
Catarrhini			
Hominidae			
Homo			

Below the table, there's a "Taxonomy navigation" section with links for "Up taxonomy tree" and "Down taxonomy tree". The "Down taxonomy tree" link is highlighted, showing "Homo sapiens neanderthalensis". At the bottom, there's a "Complete proteome information" section with "Source of data: Swiss-Prot" and "NCBI taxonomy for this taxon".

36-расм. Браузердан оксилни идентификация қилиш.

Анализ белковой последовательности

The screenshot shows the ExPASy Proteomics Server homepage. The header includes the Swiss Institute of Bioinformatics logo and the text "ExPASy Proteomics Server". Below the header, there's a navigation bar with links for "Databases", "Tools & Software", "Education & services", and "Documentation". The main content area is divided into four columns, each with a heading and a list of links:

- Databases:** UniProtKB, PROSITE, HAMAP, SwissVar, ViralZone, SWISS-MODEL Repository, SWISS-2DPAGE, Worm-2DPAGE Repository, MAPE-GelDB, ENZYME, GlycoSuiteDB, UniPathway (details) [full list]
- Tools & Software:** Proteomics tools: Blast, ScanProsite, Melanie, MSight, Make2D-DB, SWISS-MODEL, Swiss-PdbViewer, SwissDock, SwissParam [full list]
- Education & services:** Downloads; Protein Spotlight; Protéines à la «Une»; e-proteins; Bioinformatics core facility for Proteomics; Click2Drug - in silico Drug Design tools [full list]
- Documentation:** What's New?; E-mail alerts; UniProtKB documentation; How to link to ExPASy; Advanced search [full list]

On the right side, there's a "Latest News" section with two items: "New tools for in silico drug design and molecular modeling" (September 29, 2010) and "New proteomics data uploaded into the World-2DPAGE Repository" (July 26, 2010).

The ExPASy server – протеомика <http://www.expasy.ch/tools/#primary>

- ✓ The Swiss EMBnet – coiled-coil участки, выравнивания и др. <http://www.ch.embnet.org>
- ✓ The CBS Prediction Servers – локализация, пост-трансляционные модификации... <http://www.cbs.dtu.dk/services>

37-расм. Дастур окали оксил кетма-кетлигини таҳлил қилиш.

ProtParam - предсказание физико-химических параметров белка

The screenshot shows the ProtParam tool interface. At the top, there is a navigation bar with links: ExPASy Home page, Site Map, Search ExPASy, Contact us, Proteomics tools, and Swiss-Prot. Below the navigation bar, there is a search bar with a dropdown menu set to 'Swiss-Prot/TrEMBL' and buttons for 'Go' and 'Clear'. The main heading is 'ProtParam tool' with the ExPASy logo. A paragraph describes the tool: 'ProtParam (References / Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in Swiss-Prot or TrEMBL for a user entered sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY) (Disclaimer)'. Below this, a note states: 'Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.' Two input fields are provided: 'Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example P05130) or a sequence identifier (ID) (for example KPC1_DROME):' and 'Or you can paste your own sequence in the box below:'. At the bottom, there are 'RESET' and 'Compute parameters' buttons.

39-расм. ProtParam дастурида оксилнинг физик-кимёвий параметларини башорат қилиш

Compute pI/Mw

The screenshot shows the Compute pI/Mw tool interface. At the top, there is a navigation bar with links: ExPASy Home page, Site Map, Search ExPASy, Contact us, Swiss-Prot, and Proteomics tools. Below the navigation bar, there is a search bar with a dropdown menu set to 'Swiss-Prot/TrEMBL' and buttons for 'Go' and 'Clear'. The main heading is 'Compute pI/Mw tool' with the ExPASy logo. A paragraph describes the tool: 'Compute pI/Mw is a tool which allows the computation of the theoretical pI (isoelectric point) and Mw (molecular weight) for a list of UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot or TrEMBL) entries or for user entered sequences [reference]'. Below this, a link states: 'Documentation is available.' A section titled 'Compute pI/Mw for Swiss-Prot/TrEMBL entries or a user-entered sequence' follows. A paragraph explains: 'Please enter one or more UniProtKB/Swiss-Prot protein identifiers (ID) (e.g. ALBU_HUMAN) or UniProt Knowledgebase accession numbers (AC) (e.g. P04406), separated by spaces, tabs or newlines. Alternatively, enter a protein sequence in single letter code. The theoretical pI and Mw (molecular weight) will then be computed.' Below this is a large text input box. At the bottom, there is a field for 'Or upload a file from your computer, containing one Swiss-Prot/TrEMBL ID/AC or one sequence per line:' with an 'Upload' button. Below that, there is a 'Resolution' section with radio buttons for 'Average' (selected) and 'Monoisotopic'. At the very bottom, there are 'Click here to compute pI/Mw' and 'Reset' buttons.

40-расм. Пептид массасини ҳисоблаш.

PeptideMass

PeptideMass

PeptideMass [reference] cleaves a protein sequence from the UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) or a user-entered protein sequence with a chosen enzyme, and computes the masses of the generated peptides. The tool also returns theoretical pI and mass values for the protein of interest. If desired, PeptideMass can return the mass of peptides known to carry post-translational modifications, and can highlight peptides whose masses may be affected by database conflicts, polymorphisms or splice variants.

Instructions are available.

Enter a UniProtKB protein identifier (e.g. ALBU_HUMAN), or accession number, AC (e.g. P04406), or an amino acid sequence (e.g. "SELVEGVV"; you may specify post-translational modifications, but PLEASE read the document first):

the fields; the cleavage of the protein.

The peptide masses are:

with cysteines treated with:

☐ with acrylamide adducts
☐ with methionines oxidized
☒ [M+H]⁺ or ☐ [M] or ☐ [M-H]⁻
☐ average or ☒ monoisotopic

Select an enzyme:

Allow for missed cleavages.
Display the peptides with a mass bigger than and smaller than Dalton.
sorted by ☒ peptide masses or in ☐ chronological order in the protein.

For UniProtKB (Swiss-Prot/TrEMBL) entries only:
For each peptide display:
☒ all known post-translational modifications,
☐ all database conflicts,
☐ all variants (polymorphisms),
☐ all mRNA variants (due to alternative splicing, initiation or promoter usage).

41-расм. Пептид оғирлигининг ифода этилиши.

PeptideMass - output

You are here: ExPASy CH > Tools > Other characterization tools > PeptideMass

PeptideMass

The entered protein is: ALBU_HUMAN

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H]⁺.

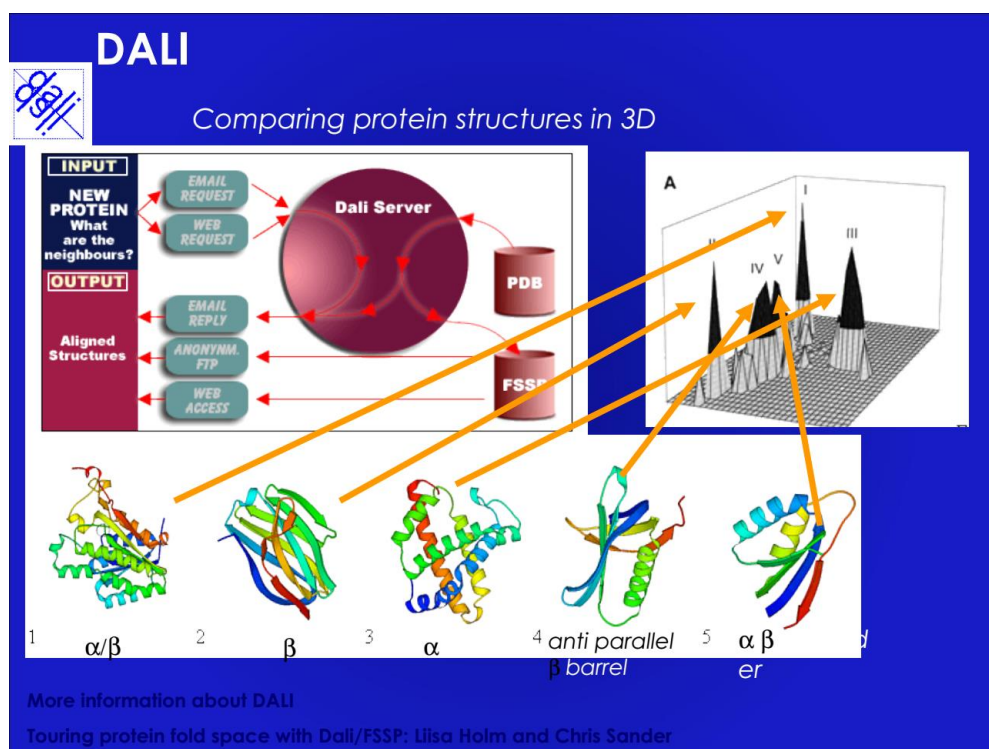
You have selected ALBU_HUMAN (ALBU_HUMAN) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Serum albumin precursor
Signal and propep in positions 1-22 have been removed.

• Chain Serum albumin at positions 25 - 609 [Theoretical pI: 5.67 / Mw (average mass): 66472.21 / Mw (monoisotopic mass): 66428.93]

mass	position	#MC	post-translational modifications	peptide sequence
2917.3229	311-337	0		SHCIAEVENDEMPADLP SLA ADFVESK
2593.2425	139-160	0		LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
2433.2635	45-65	0		ALVLIAFAQYLQCCPFEDHV K
2404.1709	470-490	0		MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
2203.0012	525-543	0		EFNAETFTFHADICTLSEK
2045.0953	397-413	0		VFDEFKPLVEEPQNLIK
1915.7731	265-281	0		VHTECCCHGDLLECADDR
1853.9102	509-524	0		RPCFSALEVDETYVPK
1742.8940	170-183	0		HPYFYAPELLFFAK
1623.7875	348-360	0		DVFLGMFLYEYAR
1600.7312	414-426	0		QNCELFEQLGEYK
1511.8427	439-452	0	PHOS: 443, 444, 446	1751.7417 VPQVSTPTLVEVSR
1386.6206	287-298	0	PHOS: 294, 297	1546.5532 YICENQDSISSK
1384.5355	76-88	0	PHOS: 82	1464.5018 TCVADESAENC DK
1381.5333	384-396	0		CCAADPHECYAK

42-расм. Пептид массаси тўғрисидаги натижаларнинг чиқиши.



43-расм. Оксилнинг структурасини 3 D форматда йиғиш.

Юқоридаги дастурлар асосида бажарилган қадамлар орқали протеинли ипларни шунингдек катланишларни таниб олиш ёки 3Д-1Д визуализация сифатида ҳам маълум бўлган ва анъанавий гомологияни моделлаштириш усулларида ишлатиладиган шаблонларни аниқлаш учун қидирув усули сифатида ишлатилиши мумкин.

Маълумотлар базасини қидириш техникаси томонидан ҳосил қилинган кетма-кетликни ҳаттоки кейинги моделни ишлаб чиқариш учун асос сифатида ишлатиш мумкин; аммо янада мураккаб ёндашувлар ҳам ўрганилган.

Адабиётлар

1. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cbdd.13388>

Саволлар

1. Гомологик моделлаштириш деганда нимани тушундингиз?
2. Қиёсий моделлаштириш нима?
3. Гомологларни моделлаштириш усули нимага ососланади?
4. Модел ишлаб чиқаришдаги қадамлар нималардан иборат?

§3. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ. ИЧКИ МОЛЕКУЛЯР ВА МОЛЕКУЛАРАРО ЎЗАРО МУНОСАБАТЛАРНИ ТАҲЛИЛ ҚИЛИШ ВА ҲИСОБЛАШ УСУЛИ

Оқсил-оқсилнинг ўзаро муносабатлари турлари

Оқсиллар бир-бири билан "вақтинча" боғланиши ёки "барқарор" кўп оқсилли комплексларни ҳосил қилиши мумкин. Бундай ҳолда, оқсил комплекслари гетероолигомер ва гомолигомер бўлиши мумкин. Оқсил- оқсил ўзаро муносабатларининг классик намуналарига фермент-ингибитори ва антитана-антиген муносабатлари мисол бўлиб, аммо бунга қўшимча равишда оқсил оқсил ўзаро муносабатларида икки домен ўртасида ёки домен билан пептид ўртасида пайдо бўлиши мумкин бўлган муносабатлар киради. Оқсил домени - бу оқсилнинг учламчи структураси элементи бўлиб, у жуда барқарор ва мустақил оқсил структураси ҳисобланиб, букланиши (фолдинги) бошқа қисмлардан мустақил равишда амалга оширилади.

Гомо- и гетероолигомерлар

Гомоолигомерлар фақат битта турдаги оқсил суббирликларидан иборат макромолекуляр комплекслардан иборат. Агар бир хил бўлмаган протеин занжирлари ўртасида боғланиш ҳосил бўлса, у ҳолда гетеро-олигомер ҳосил бўлади. Гетеро-олигомерлар барқарорлиги билан фарқ қилади ва аксарият гомо-олигомерик комплекслар носимметрик ва барқарордир.

Гомолигомерларни ажратиб олиш кўпинча денатурацияни талаб қилади [4]. Баъзи ферментлар, транспорт оқсиллари ва транскрипция омиллари вазифасини гомоолигомер бўла туриб бажаради. Турли оқсиллар ўртасидаги муносабатлар хужайрадаги сигналларини узатилишида муҳим ўрин тутади.

Мажбурий ва ихтиёрий ўзаро муносабатлар

Оқсил- оқсил муносабатларини мажбурий ва ихтиёрийга ажратиш учун эркин ҳолатда ва оқсил комплекси таркибида ўзаро таъсирлашишда иштирок этадиган оқсиллар (мономерлар) нинг барқарорлиги тўғрисида маълумот зарур. Агар мономерлар фақат *in vivo* шароитида (организм ичида)

комплекснинг бир қисми сифатида барқарор бўлса, у ҳолда уларнинг ўзаро таъсири мажбурийдир. Мажбурий ўзаро муносабатлар натижасида мажбурий ёки облигат (муайян жараёнда албатта мавжуд бўладиган) комплекслар ҳосил бўлади. Агар оқсиллар мустақил равишда мавжуд бўлиши мумкин бўлса, у ҳолда улар ихтиёрий бўлган Оқсил- оқсил муносабатларида катнашадилар. Хужайрадаги макромолекуляр механизмларнинг аксарияти мажбурий ўзаро таъсирга мисоллар [2]. Мажбурий комплексларга P22 Arg repressor ининг димери киради ва ихтиёрий ўзаро таъсирларга эса RhoA билан RhoGAP ва тромбин билан унинг ингибитори роднинин билан ўзаро таъсири киради.

Доимий ва вақтинчалик ўзаро муносабатлар

Оқсил- оқсил муносабатларини комплексни ишлаш муддатига қараб ажратиш мумкин. Доимий муносабатлар одатда жуда барқарор: оқсиллар ўзаро таъсир қилиб доимий комплекс ҳосил қилади. Улар кўпинча гомоолигомерларда (масалан, Цитохром с) ва баъзи гетероолигомерларда (масалан, АТФаза суббирликларида) учрайди. Вақтинчалик муносабатлар доимо шаклланиб, парчаланиб туради. Улар гормон- рецептор муносабатида, хужайра сигналлирининг узатилишида пайдо бўлиши мумкин. Ушбу турдаги муносабатлар сигнал ва регуляция йўлларида кенг тарқалган.

Ковалент ва но ковалент бўлмаган муносабатлар

Ковалент алоқалар энг кучли ва электронлар алмашилишида ҳосил бўлади (масалан, дисулфид боғлари). Ушбу боғланишлар оқсил ва оқсилларнинг ўзаро таъсирида камдан-кам учрайди, аммо трансляциядан кейинги баъзи модификацияларда улар ҳал қилувчи аҳамиятга эга (масалан, SUMO оқсилларини фазовий шаклини ҳосил бўлиши ҳамда убиквитинлашда –ҳамма жойда тарқалишида) муҳим ўрин тутди.

Убиквитин (инглизча *ubiquitous* - "ҳамма жойда") - бошқа оқсилларнинг хужайра ичидаги парчаланиш жараёнларини тартибга солиш, шунингдек уларнинг функцияларини ўзгартириш билан шуғулланадиган кичик (8,5 кДа) эукариотларнинг консерватив оқсили.

Ноковалент боғланишлар, одатда, заиф боғланишлар бирикмаси туфайли вақтинчалик муносабатларда ҳосил бўлади: водород, ион, ван дер Ваалс ёки гидрофоб боғлари комбинацияси натижасида шаклланади.[6].

Структурасиз ҳолатдан структуравий ҳолатга ўтиш

Оқсил- оқсил муносабатларида структуралашмаган оқсиллар билан қисман ҳосил бўлган муносабатларни алоҳида ажратиш мумкин. Ушбу оқсиллар таркибида аминокислота кетма-кетлиги барқарор учламчи структуранинг шаклланишига имкон бермайдиган минтақалар мавжуд. Ушбу оқсиллар шерик билан боғланиш учун мос конформацияни танлаб, бошқалар билан таъсир ўтказиши мумкин.

Оқсил комплексларининг уч ўлчамли тузилиши

Кўпгина оқсил комплексларининг молекуляр тузилмалари рентген структуравий таҳлили ёрдамида аниқланган. Биринчи шундай аниқланган структура кашалот миоглобини бўлган. Кейинчалик, оқсил комплексларининг уч ўлчовли тузилишини аниқлаш учун ЯМР (Ядро магнит резонанс усули) ҳам қўлланила бошланган. Масалан, биринчи бўлиб, калмодулин билан ўзаро муносабатга киришадигаг калмодулин билан боғланган доменларнинг структураси олинган. Ушбу усул кучсиз оқсил-оқсил муносабатларини аниқлаш учун жуда мос келади.

Доменлар

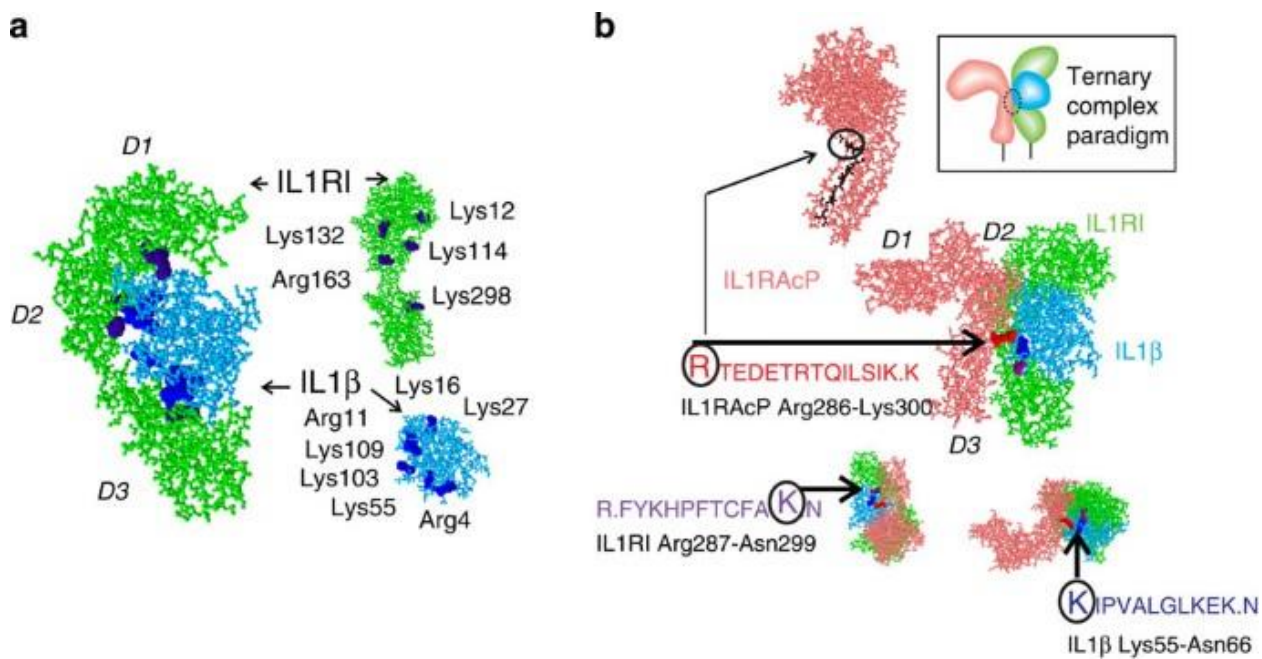
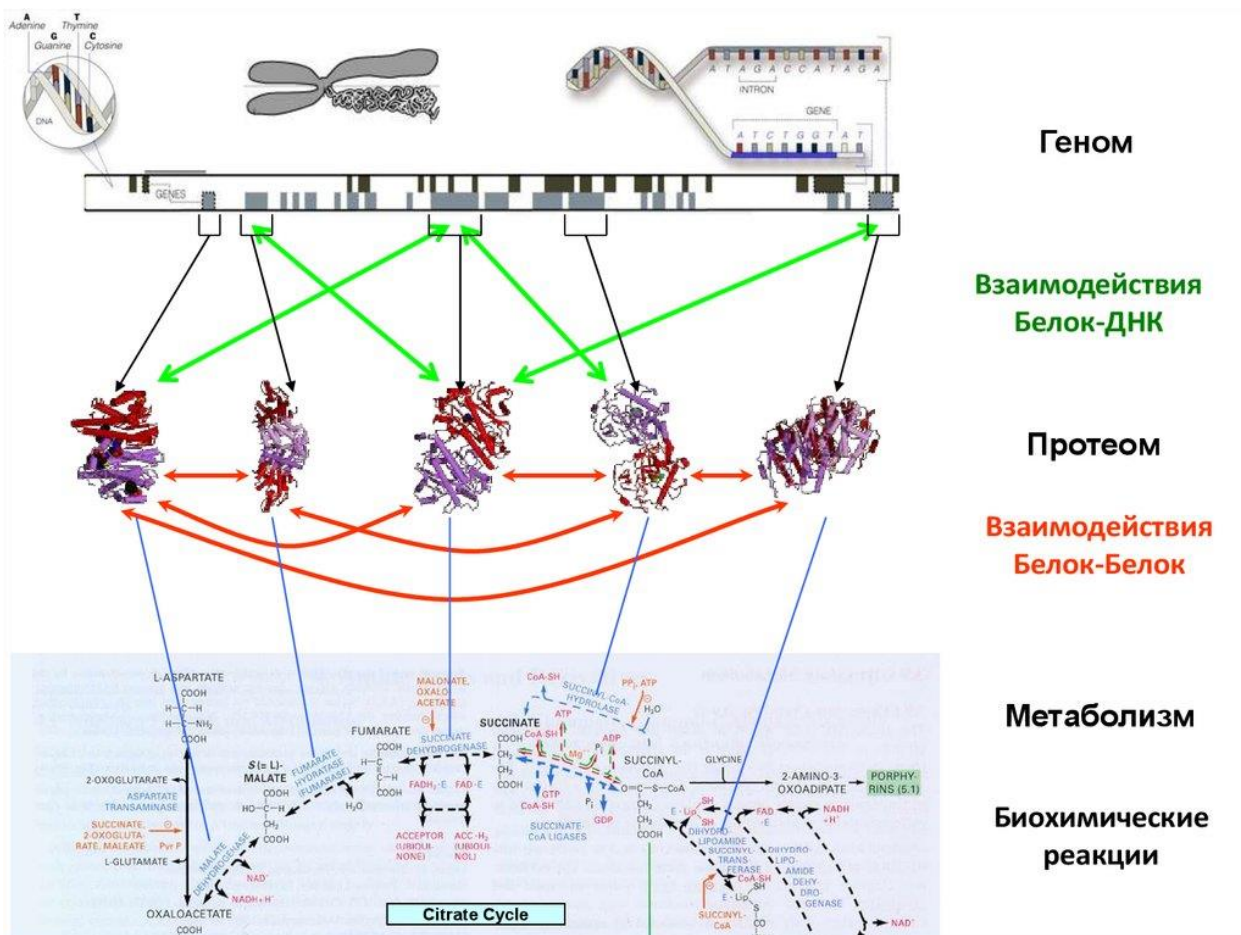
Оқсилларнинг уч ўлчамли структурасини аниқлаш усуллари ишлаб чиқилганлиги туфайли оқсил-оқсил муносабатлари ҳосил бўлишида иштирок этадиган структура доменларини ажратиш мумкин бўлди. Масалан, улар:

- фосфорилланган оқсилларни боғлайдиган SH₂-домени;
- пролинларга бой кетма-кетликларга хос бўлган SH₃-домени;
- РТВ -домени фосфотирозин гуруҳини ўз ичига олган кетма-кетликлар билан таъсир ўтказиш;
- Цистеинга бой рух бармоқлари мотивини ўз ичига олган ва PDZ -доменига сингари доменларга ўхшаш LIM -домени;

- таркибида ўзига ўхшаш--домени бўлмаган оксилларни бириктирадиган SAM--домени;
- оксилнинг C-учидаги S/TXV мотивини танийдиган PDZ -домени, шунингдек LIM -доменлари ёки шунга ўхшаш кабилар;
- PI(4,5)P₂ (фосфоинозитол-4,5-бифосфат) ни боғлашга қодир бўлган FERM -домени.

Оксил-оксил ўзаро муносабатларининг биологик таъсири

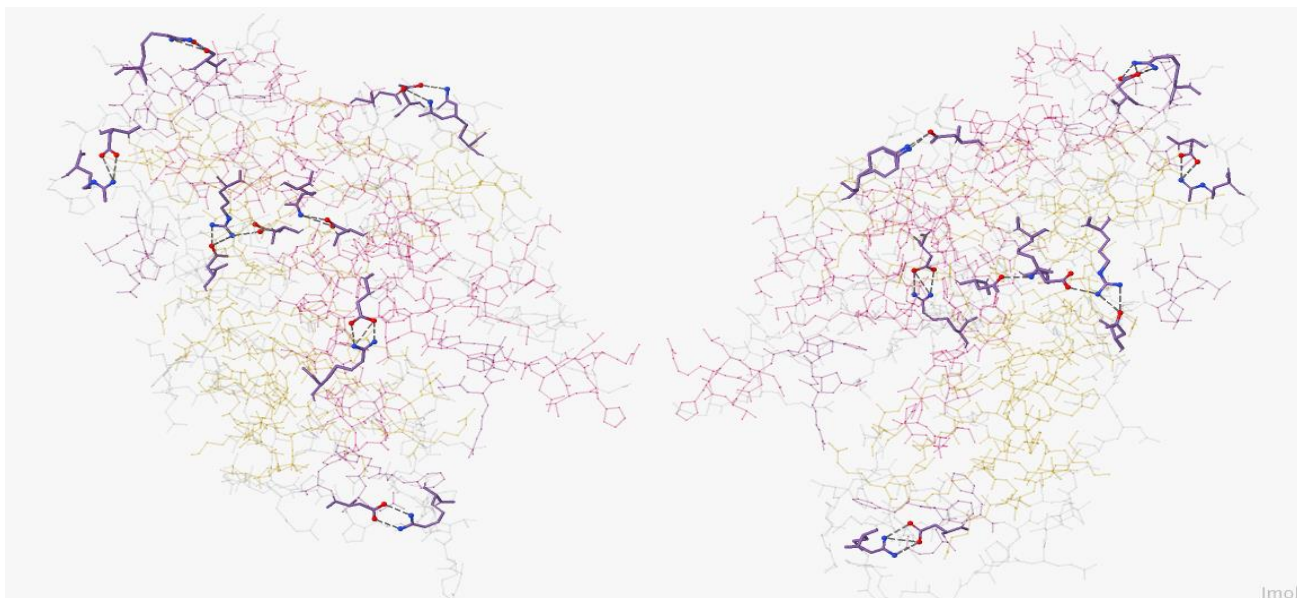
Оксил-оксилнинг ўзаро муносабатлари кўплаб биологик жараёнларда муҳим рол ўйнайди. Протеиннинг функцияси ва фаолияти аксарият ҳолларда шерик оксиллари билан боғланганда ўзгаради. Улар аллостерик таъсир (унга субстрат бўлмаган бошқа молекуланинг бирикиши натижасида оксил молекуласининг фазовий конфигурациясининг ўзгариши) туфайли ферментнинг кинетик параметрларига сезиларли таъсир кўрсатиши, унинг инактивациясига (нофаллашувига) олиб келиши мумкин (масалан, фермент ингибитор билан боғланганда) ёки ферментнинг субстратига ҳос хусусиятининг ўзгаришига олиб келади. Бундан ташқари, оксилларнинг бир-бири билан ўзаро таъсири икки молекуланинг ўзаро таъсирида субстрат учун янги боғланиш жойини ҳосил бўлишига олиб келиши мумкин. Икки ёки ундан ортиқ ферментларнинг бир-бири билан ўзаро таъсири туфайли туннелашган субстратни ҳосил қилиш мумкин бўлади, бу оралиқ моддаларни барқарорлаштириш ва уларнинг маҳаллий концентрациясини ошириш орқали ферментатив реакциялар самарадорлигини оширади



Ён занжирлардаги ўзаро муносабатлар

Асосий занжирдаги молекулар штртасидаги муносабатлардан ташқари ён занжирл молекулалари ўртасида ҳам муносабатлар мавжуд улар оқсилнинг фазовий структурасини белгилашда муҳим ўрин тутди.

Туз кўприкчалари

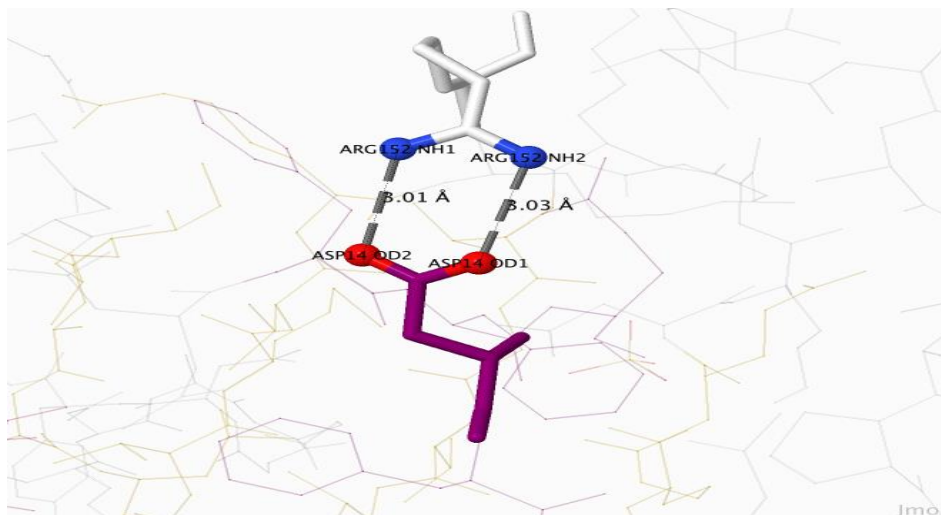


34-расм. туз кўприкчаларининг фазодаги кўриниши. Қизил билан манфий зарядланган кислород атоми, кўкбилан мусбат азот, бинафша ранг билан молекуланинг углерод скелети берилган .

Расмни J-mol дастури ёрдамида олинган. Изображение получено с помощью программы.

Аргинин 152 ва аспарагин кислота 14 орасидаги туз кўприклари.

Аргинин қолдиғи ва аспарагин кислота орасидаги туз кўприкларини кўриб чиқинг. Биринчи ва иккинчи боғланишларда азот атоми водород доноридир, кислород эса уни қабул қилади-акцептор. Боғланиш узунлиги биринчи ҳолатда 3,01 Å, иккинчисида **3,03 Å**.

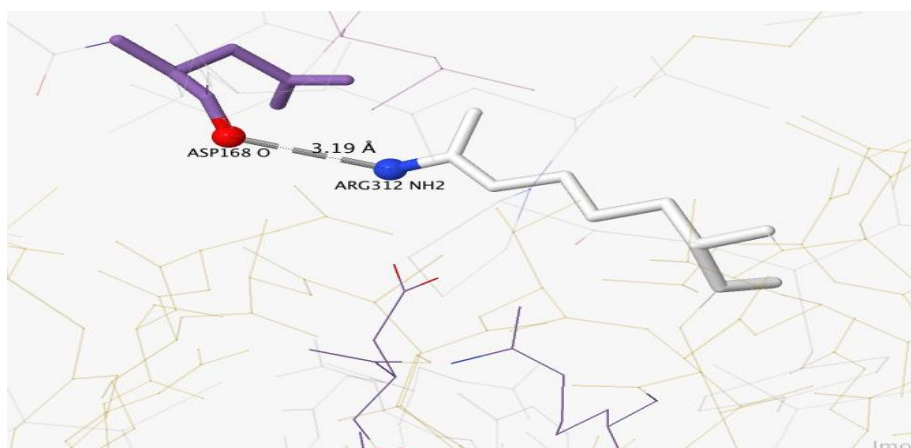


35-расм. Аргинин аминокислотаси қолдиклари 152 ва аспартик кислота 14 орасидаги туз кўприклари.

Кислород атомлари қизил, азот атомлари кўк, туз кўприклари кулранг (нуқтали чизиқлар). Рақам J-mol.дастури ёрдамида олинган.

Туз кўприги бўлмаган водород боғи

35-расмда аспарагин аминокислотаси қолдиғи ва аргинин ўртасидаги водород боғи кўрсатилган. Бу туз кўприги эмас, чунки асосий занжирдаги кислород атоми боғининг ҳосил бўлишида иштирок этади. Боғ узунлиги 3,19 Å.

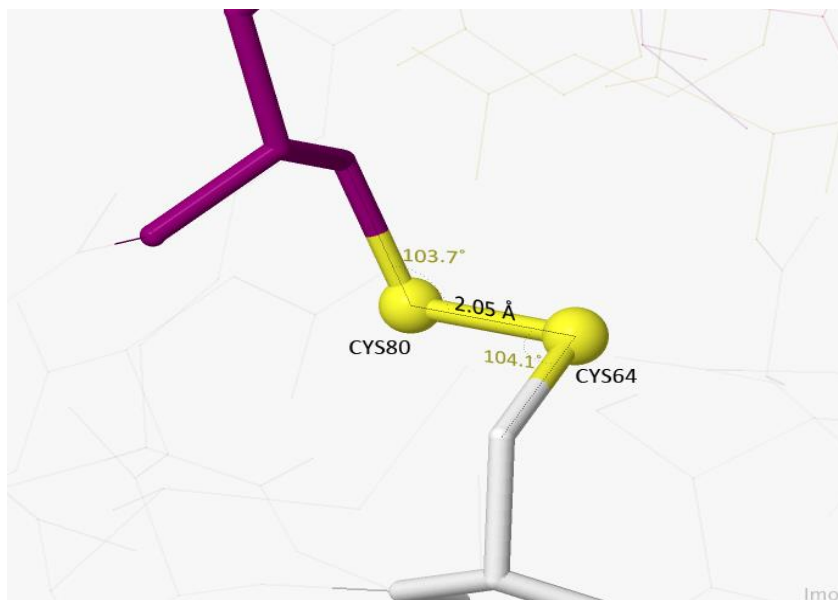


36-расм. Аспарагинк кислотаси 168 ва аргинин 312 қолдиклари орасидаги боғланиш мисолида туз кўприги бўлмаган водород алоқаси. Кислород атоми қизил, азот атоми кўк, водород боғи эса кулранг нуқта чизиқда берилган.

36-расм J-mol.дастури ёрдамида олинган.

Дисульфид кўприги

Дисульфид кўприги икки цистеин қолдиғи ўртасида дисульфид (ковалент) боғланиш ҳосил бўлиши туфайли юзага келади. Дисульфид кўприклари оксилнинг фазовий тузилишини барқарорлаштиришда ҳам иштирок этади.



37-расм. Цистеин 64 ва Цистеин 80 орасидаги дисульфид кўприги.

Дисульфид кўприги ва олтингугурт атомлари сариқ ранг билан белгиланган. Расмда дисульфид боғланишининг узунлиги, боғланишлар орасидаги бурчаклар кўрсатилган. Орқага ўцангиз, ушбу ҳаволанинг дигедрал бурчаги пайдо бўлади.

Чизма ва ўлчовлар J-mol дастури ёрдамида олинган.

Дегидратаза таркибида дисульфид кўприги топилмагани учун яна бир оксил ишлатилган - *Gallus gallu* (товуқ) организмидан С тип лизозим (лизозим С). Ушбу оксил бактериялар хужайралари деворларини пептидогликан билан парчалайдиган антибактериал воситадир. PDB идентификатори 1HC0.

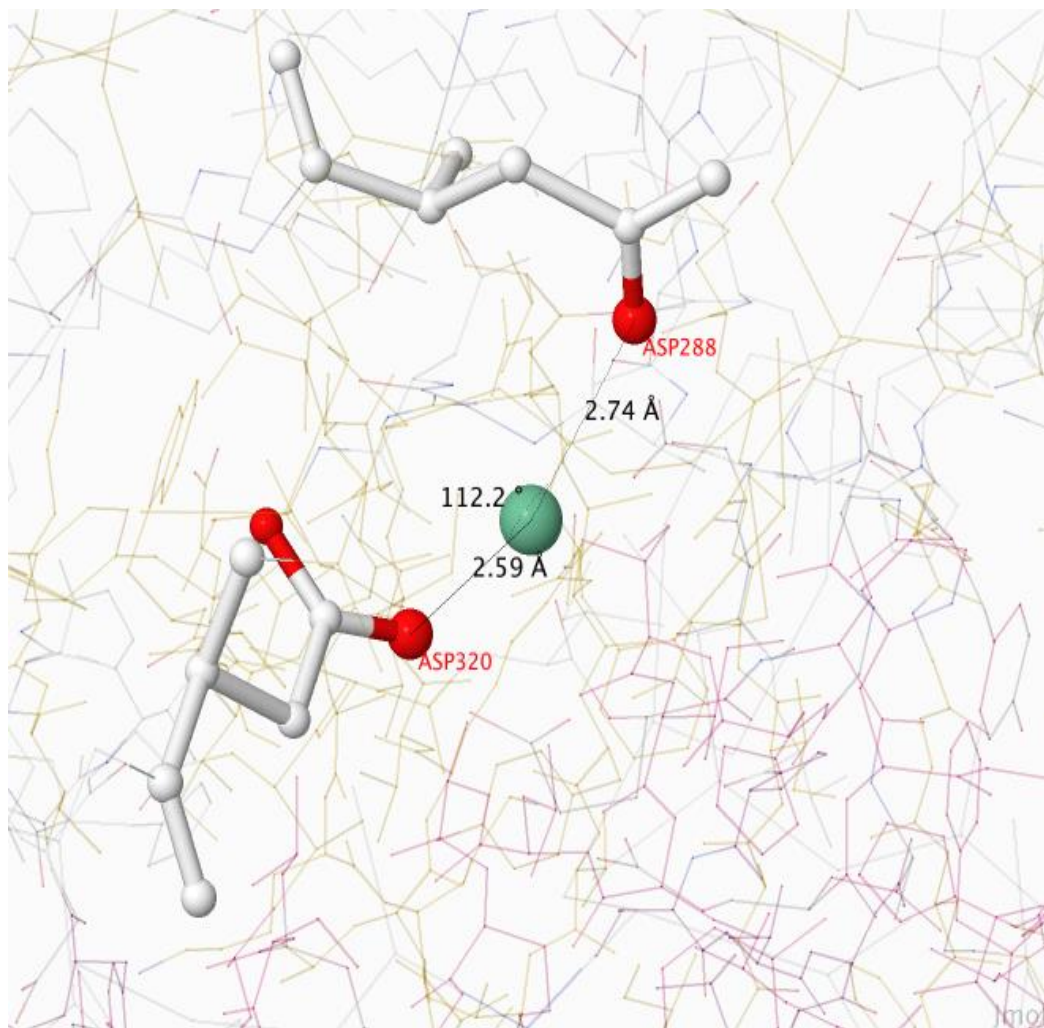
С-С кўпригини топиш учун ssbondc буйруғи ишлатилган. Ушбу оксилдан чиққан дисульфид кўприкларида бирининг тасвири 4-расмда келтирилган. Боғланиш узунлиги 2,05 Å, бу боғланиш геометриясини

тавсифловчи бурчаклар эса 103,7 ° ва 104,1 Å, дигидрал боғланиш бурчаги 96,1 Å.

Сув кўприги

Водород кўприги - бу протеин ва сувнинг аминокислота қолдиқлари орасидаги водород боғидан иборат.

Дегидратаза оқсили сув кўприги -расмда келтирилган. Водород донор бўлиб сув, акцепторлар- эса аспарагин кислотанинг аминокислота қолдиқлари ён занжирининг кислород атомлари.



39-расм. Сув кўприги. Кислород атомлари қизил рангда, сув молекулалари яшил рангда, водород алоқалари еса қора чизикларда кўрсатилган. Расмда икки водород боғланиш орасидаги бурчак ва уларнинг ангстромлардаги узунлиги кўрсатилган.

Рақам J-mol.дастури ёрдамида олинган

Саволлар:

1. Оксил-оксилнинг ўзаро муносабатлари турлари деганда нимани тушунаси?
2. Мажбурий ва ихтиёрий ўзаро муносабатлар нима?
3. Доимий ва вақтинчалик ўзаро муносабатлар нима?
4. Ковалент ва но ковалент бўлмаган муносабатлар нима?
5. Оксил комплексларининг уч ўлчамли тузилиши деганда нимани тушунаси?
6. Оксил-оксил ўзаро муносабатларининг биологик таъсири нима?
7. Рационал ҳисоблаш дизайни нима?
8. *de novo* фаол сайт (нуқта) дизайни
9. Ҳисоблаш воситалари ва *de novo* да ферментларини лойиҳалаш

§4-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ. ОКСИЛ МУҲАНДИСЛИГИ УЧУН ҚИДИРУВ АЛГОРИТМЛАРИНИ ТУЗИШ

Ишнинг мақсади:

1. **EMBOSS** дастурий таъминот тўплами билан танишиш;
2. ДНК кетма-кетлигидан оксиллар кетма-кетлигига декодирлашнинг асосий тамойилларини тушуниб олиш;
3. Кетма-кетликларни таққослаш алгоритмлари принципларини тушуниб олиш;
4. Очiq ўқиш рамкаси тўғрисида тасаввурга эга бўлиш;
5. Баъзи кетма-кетликни таққослаш техникасини ва таққослаш натижаларини талқин (интерпритация) қилиш.

EMBOSS <http://emboss.sourceforge.net/> / бу "The European Molecular Biology Open Software Suite" **EMBOSS** - бу очiq кодли дастурий таъминот тўплами ҳисобланади. У молекуляр биология соҳасидаги мутахассислар эҳтиёжларидан келиб чиқиб махсус ишлаб чиқилган. **EMBOSS** автоматик равишда кўплаб биологик формат маълумотлар танийди ва фойдаланувчи

учун ушбу маълумотларни тармоқ маълумотлар базаларидан шаффоф олишга имкон беради

EMBOSS кетма-кетликни таҳлил қилиш учун катта ҳажмдаги утилитларни ўз ичига олиб, яхлит дастурий таъминот тўпламини шакллантиради. **EMBOSS** кетма-кетликларни ўз ичига олган маълумотлар билан иш бошлаш учун бепул вариант ҳисобланади. Чуқурроқ таҳлилларни қилиш учун тегишли кўмак, техник , хизмат (сервис) ва янгиланишлар эга бундан бошқа тижорат дастурий маҳсулотлар ҳам мавжуд.

а) **EMBOSS** -нинг сўнгги версиясини компютерингизга юклаб олинг ва ўрнатинг (<ftp://emboss.open-bio.org/>). Пакет ҳужжатлари эса бу ерда жойлашган <http://emboss.sourceforge.net/apps/#list> GenBank дан ДНК *E.Coli isocitrate dehydrogenase* J02799 ДНК кетма-кетлиги файлини топинг

с) Файлни очинг ва ундаги нуклеотид ва аминокислоталар кетма-кетликларини топинг.

ДНК нуклеотидлар кетма-кетлигига аслида оқсилнинг аминокислоталар кетма-кетлигини кодлашига ишонч ҳосил қилинг.

Сиз буни ДНК кетма-кетлигидаги аминокислоталар кетма-кетлигига тўлиқ мос келадиган нуклеотидлар (триплетлар) ни аниқлаш (идентификация) қилиш орқали амалга оширишингиз мумкин.

Диққатли бўлинг! Ўқиш рамкаси, (биринчи кодон) мумкин биринчи нуклеотиддан эмас, иккинчисидан ёки учинчисидан бошланиши мумкин!

Генетик кодни қуйидаги ҳаволадан олиш мумкин:
<http://helixweb.nih.gov/gcode.html>.

Аминокислота коди эса қуйида тақдим этилган

<http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/aasymbols.html>

Шарҳлар, пробеллар ёки нуклеотидлар кетма-кетлигидан бошқа белгилар бўлган сатрни олиб ташлаш мумкин.

Ўқиш рамкаси (яъни нуклеотидлар кетма-кетлигидаги жой) нинг бошланиш жойини топишда сатр остининг ҳар қандай қидириш функциясидан фойдаланиш тезкор, лекин қўпол усули ҳисобланади.

Биз биламизки (генетик кодга қаранг) ATG – М (метионин) ни кодирлайди ва бир вақтнинг ўзида ATG бошланғич кодони бўлиши мумкин. Шунингдек нафақат М ни кодлаш кетма-кетлиги эмас, балки ундан аниқроқ (узунроқ) пастки чизикларни топишга ҳаракат қилиш мумкин, ҳеч бўлмаганда биринчи олтитага аминокислоталарни кодирлайдиган нуклеотидлар кетма-кетлигидаги кодонларни қидириб кўришга уриниш мумкин

Шуни ёдда тутиш керакки, учта тўхташ кодони мавжуд - ТАГ, ТАА, ТГА. Ушбу кодонлар аминокислоталар тилига таржима қилинмайди. Сиз доимий (регуляр) иборалардан фойдаланишингиз мумкин (агар эҳтимол шундай бўлса), чунки генетик код битта аминокислота бир нечта кодон томонидан кодланиши мумкин, деган фикрга асосланади.

Масалан, Лизинни излаш учун доимий ифода AA [A, G] (UNIX учун) ҳисобланади.

Машқ: Лейцинни регуляр ифода билан қандай ёзиш керак?

г) иккинчи муаммо кетма-кетликни кодлашда ётади аслида бизни қизиқтирадиган ДНК нинг қўшимча занжири (ва маълумотлар базасида келтирилмаган маълумотлар, leading strand ва lagging strand, strand + bastrand) оқсилда жойлашган бўлиши мумкин ДНКнинг муайян бўлагининг комплементар кетма-кетликни қандай олиш мумкин?

Маълумки, ДНК иккинчи занжири кетма-кетлиги биринчисига нисбатан тескари комплементар хусусиятга эга

5' C-A-T-G-T-C-C-A 3' 3' G-T-A-C-A-G-G-T 5' Молекуляр биологияда комплементарлик хусусияти деганда нуклеотидларнинг фақат аниқ белгиланган жуфтларни ҳосил қилиши тушунилади (қаранг маърузалар)..

EMBOSS пакетидаги **revseq** дастуридан қуйидагилардан фойдаланинг:

- тескари кетма-кетликни яратиш;
- бир-бирига комплементар кетма-кетликни яратиш;
- тескари комплементар кетма-кетликни ҳосил қилиш қуриш

J20799 кетма-кетлиги учун қуйидаги амалларни бажаринг.

е) битта нуклеотид кетма-кетлигидан мумкин бўлган канча трансляциялар (аминокислоталар кетма-кетлигида) олиниши мумкинми?

Бу вариантларни олишга уринишнинг ҳожати йўқ. J02799 ни трансляция қилиш, яъни оқсил тилга таржима қилиш учун EMBOSS дастуридаги transeq дан фойдаланинг. Бу дастурда буни учта тўғри ва ва учта тескари комплементар кетма-кетликлар ёки барча тўғри /тескари комплементар кетма-кетликлар билан бажариши мумкин бўлган *frame* ёрлиғи мавжуд.

Ўқиш рамкаси учта мумкин бўлган ДНК ёки РНКдаги нуклеотидлар кетма-кетлигини ўқиш йўлларида бири бўлиб, нуклеотидларнинг (учлик) бир-бирига мос тушмайдиган триплет серияси сифатида у нуклеотид (биринчи, иккинчи ёки учинчи) нинг қайси бирида ўқиш кетма-кетлиги бошланганлигига боғлиқдир.

Масалан, TGCTGCTGC да қуйидаги учта ўқиш рамкаси TGC TGC TGC, GCT GCT ва CTG CTG мавжуд.

е) юқорида келтирилган масаланинг моҳияти шундаки, трансляция учун ўқиш рамкасини тўғри танлай билиш лозим. J20799 оқсили учун олти имкониятдан бири ва ORF (open reading frame) учун маънога эгадир.

EMBOSS даги *plotorf* дастуридан фойдаланиб, J20799 оқилининг барча мавжуд ORF дан фойдаланиб график тузиш ва уларнинг узунини аниқлаш (идентификация қилиш) мумкин. Кейин бу маълумотни тегишли оқсил тилига таржима қилиниши (транляцияси) учун тегишли бўлган ген кетма-кетликнинг бошланғич ва охирги нуклеотидларни аниқлаш учун ишлатилади.

Шуни унутмаслик керакки, *plotorf* дастури старт- ва стоп-кодонлари билан чегараланган участкаларни қидиради. Бошқача қилиб айтганда,

эукариотмк экзонлар – старт колонлари бўлмаганлиги учун ушбу дастурда тушириб қолдирилади. *Plotorf* дастурини прокариотлар ДНК ва ёки эукариотлар м-РНКси кетма-кетликлари учун қўллаш мақсадга мувофиқдир.

Маълумотлар тўғрисидаги ахборот <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/help/plotorf> да жойлашаган.

ж) Энди J02799 га ўхшайдиган кетма-кетликларни кўриб чиқамиз,

- ✓ Бу бизга нима учун қизиқарли ҳисобланади? юзага келадиган мутациялар натижасида ва генларнинг қайта қурилиши /организмдаги турли ҳодисалар кетма-кетликларнинг эволюциясига олиб келиб, улар ўхшаш кетма-кетликлар бўлиши мумкин;
- ✓ консерватив ўзгармайдиган участкаларни қидириб топиш;
- ✓ Сунъий чакрилган мутациялар билан белгиларни қидириб топиш.

ДНК нинг бизни қизиқтирган участкасини топиш учун BLAST - <http://www.ebi.ac.uk/blastall/> ёки <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> қўлланади.

Дастурлар билан иш болаган талабалар html саҳифаларини сақлаб қўйишлари керак, бу кейинги ишлар учун керак бўлади. Керакли маълумотлар базасини ва дастурнитанлаб олинг.

Бунинг учун қўйидаги маълумотдан фойдаланинг <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/help/index-protein.html>).

EMBL маълумотлар базасидаги **blastn** дастуридан нуклеотид кетма-кетликларини қидириш ва таққослаш учун ва SwissProt даги **blastp** дан аминокислотлар (оқсиллар) кетма-кетлиги учун фойдаланилади. J02799 га мос келадиган ўхшаш кетма-кетликларни топишга ҳаракат қилинг. Масалан:

а) **H5N1 avian** (парранда гриппи) вируси паррандалар учун ўта вирулент ҳисобланади, одамга эса таъсирчан бўлмайди. Унинг асосий хусусияти мутацияга кучли мойиллиги ҳисобланади. **GenBank** дан H5N нингисталган кетма-кетлигини топиб, кейин ўхшаш кетма-кетликларни изланг. Топилган кетма-кетликларнинг характеристикаси ва локализацияси қандай?

келтирилган с > дан бошланадиган саҳифани пастга айлантириш керак бўлади.

Адабиётлар

1. Richard Fox, Ajoy Roy, Sridhar Govindarajan, Jeremy Minshall, Claes Gustafsson, Jennifer T. Jones⁴ and Robin Emig Protein Engineering vol.16 no.8 pp.589±597, 2003 DOI: 10.1093/protein/gzg077.

Саволлар:

1. Юқоридаги кетма-кетлик қайси организмларга мос келади?
2. Мазкур генда кодланган оксилнинг функцияси нималардан иборат?
3. Тадқиқ этилган участкага бирмунча яқин келадиган ДНК кетма-кетликлари қайси?
4. Улар қайси организмларга тегишли ва уларнинг функцияси қандай?
5. Уч хил қидирув сўровномасида олинган натижалар бир хилми?
6. м РНК ва кДНК кетма кетликларидаги 21 нуклеотидни ва оксил таркибидаги тегишли аминокислоталапр кетма-кетлигини секин олиб ташланг. Бу BLAST даги қидирув натижаларига таъсир қилдими?
7. Кетма-кетликларнинг охиридаги баъзи неклеотидларни/аминокислоталарни олиб ташлаб кўрингва BLAST дан қайтадан ўтказиб кўринг.
8. Худди ўшандай натижа олдингизми?
9. Натижалар қанақа?
10. *Scores* ва *identities* кўрсаткичлари қандай?
11. Аввалги натижа каби кўрсаткичларни кўрсатишдан тўхташи учун нечта нуклеотид /аминокислоталар кетма-кетликларини олиб ташлаш керак бўлади?
12. Агар сиз нуклеотид /аминокислоталарни кетма-кетликларининг ўртасидан олиб ташласангиз қандай ҳодиса юз беради?
13. Агар сиз нуклеотид /аминокислоталарни кетма-кетликларининг ўртасидан 1\2\3 нуклеотидларни олиб ташласангиз ДНК нинг

аминокислотларга қадар трансляциясида қандай ўзгариш вужудга келади?

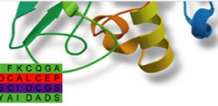
§5. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ: ОҚСИЛЛАРНИНГ ТАБИИЙ ХУСУСИЯТЛАРИНИ ҲИСОБЛАШ УСУЛЛАРИДА МОДЕЛЛАШТИРИШ МОДЕЛЛЕР ҲАҚИДА

MODELLER уч ўлчовли оқсил тузилмаларини гомологияси ёки қиёсий моделлаштириш учун ишлатилади (1,2). Фойдаланувчи симуляция қилинган кетма-кетликни маълум боғлиқ тузилмалар билан мослаштиришни таъминлайди ва MODELLER барча водород бўлмаган атомларни ўз ичига олган моделни автоматик равишда ҳисоблаб чиқади.

MODELLER (3,4) фазовий чекловларни қондириш орқали таққосланадиган оқсил тузилишини моделлаштиришни амалга оширади ва кўплаб қўшимча вазифаларни бажариши мумкин, жумладан оқсил тузилмаларидаги циклларни де ново моделлаштириш, мослашувчан мақсад функциясига нисбатан оқсил тузилишининг турли моделларини оптималлаштириш, бир нечта кетма-кетликни мослаштириш ва / ёки оқсил тузилмалари, кластерлаш, маълумотлар базасини кетма-кет излаш, оқсил тузилмаларини таққослаш ва бошқалар. МОДЕЛЛЕР-ни Unix/Linux, Windows ва Mac. тизимларининг аксарияти учун юклаб олиш мумкин.

MODELLER учун бир нечта график интерфейслар савдо сифатида мавжуд. Моделлердан график ёки веб-интерфейсларда ёки бошқа рамкаларда фойдаланадиган кўплаб бошқа манбалар ва мутахассислар бор.

Program for Comparative Protein
Structure Modelling by Satisfaction
of Spatial Restraints



```

A L V G S M P R R D G M E K D L K A N V K I F K C Q G
E V C P V C C Y E S P N F W H P D C I D C A L C E
S A S R S S R R R D D R R R R R R R R R R R R R R R
C - - A C G A C K P E C P V N I I Q G S - L Y A I Q A D S

```

About MODELLER

MODELLER News

Download & Installation

Release Notes

Data file downloads

Registration

Non-academic use

Subscribe

Browse archives

Search archives

Documentation

FAQ

Tutorial

Online manual

Wiki

Developers' Pages

Contact Us

MODELLER News

- Sep. 9, 2020: **MODELLER 9.25 released.** [\[Download\]](#)
- Apr. 9, 2020: **MODELLER 9.24 released.** [\[Download\]](#)
- Oct. 29, 2019: **MODELLER 9.23 released.** [\[Download\]](#)
- Jun. 21, 2019: **MODELLER 9.22 released.** [\[Download\]](#)
- Dec. 11, 2018: **MODELLER 9.21 released.** [\[Download\]](#)
- Jun. 5, 2018: **MODELLER 9.20 released.** [\[Download\]](#)
- Jul. 25, 2017: **MODELLER 9.19 released.** [\[Download\]](#)
- Feb. 22, 2017: **MODELLER 9.18 released.** [\[Download\]](#)
- Jul. 7, 2016: **MODELLER 9.17 released.** [\[Download\]](#)
- Jan. 12, 2016: **MODELLER 9.16 released.** [\[Download\]](#)
- May 19, 2015: **MODELLER 9.15 released.** [\[Download\]](#)
- Jul. 29, 2014: **MODELLER 9.14 released.** [\[Download\]](#)
- Feb. 12, 2014: **MODELLER 9.13 released.** [\[Download\]](#)

MODELLAR ўрнатиш учун ёки ундан фойдаланиш ҳақида [FAQ](#) дан фойдаланилади. MODELLER га тегишли ҳужжатлар ва охиригикиритилган шарҳлар ИНТЕРЕТда мавжуд. Шунингдек унга фойдаланувчи томонидан таҳрир қилинадиган [Wiki](#) га киритилган.

MODELLER-дан фойдаланиш бўйича амалий ёрдам олиш учун кўплаб масала ва тавсияларни ўз ичига олган `modeller_usage` электрон pochta дан фойдаланилади. Рўйхат ҳақида кўпроқ маълумот олиш учун обуна бўлиш ёки обуна бўлгандан кейин ундаги маълумотларни таҳрирлаш учун `modeller_usage` `ma'lumot` `sahifasiga` кирилади. Рўйхатдан ўтган маълумотларнинг архивлари мавжуд ва уларни қидириб топиш ҳам мумкин. Маълумотларни рўйхатга жойлаш учун электрон почта орқали modeller_usage@salilab.or манзилига хабар юборилади, бунинг учун олдиндан обуна бўлиш талаб этилади.

Молекуляр динамикани моделлаштириш (МД) – бу ҳисоблаш техникаси усули бўлиб, молекуладаги атомнинг сиклик тебранишлари, шунингдек молекулаларнинг вақтга боғлиқ равишда нисбий жойлашувини аниқлашга имкон беради.

Биомолекуляр моделлаштириш лигандни боғланиши, ферментатив фаолликни аниқлаш сигналларнинг узатилиш механизмларини ва оксилларнинг фолдингини таҳлил қилиш учун ишлатилади.

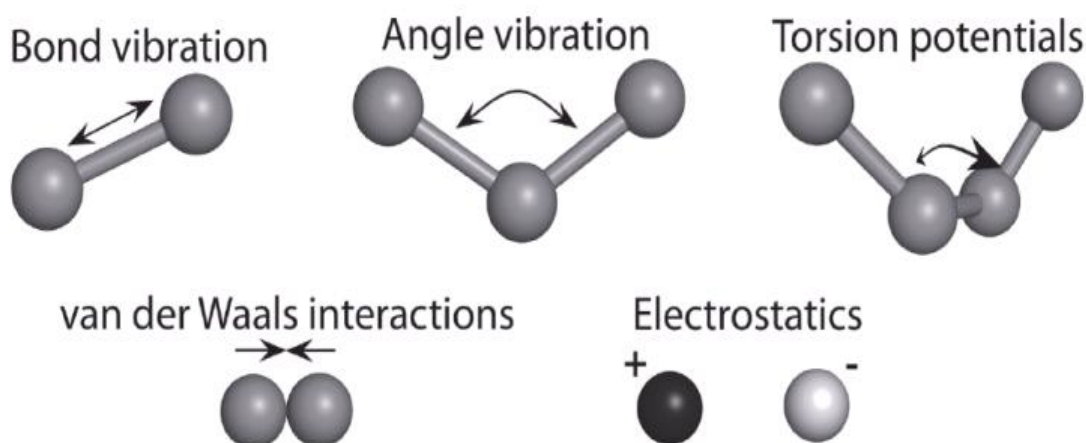
Бундан ташқари моделлаштириш электрон микрокопия, рентген нураланиши, ЯМР (ядро магнит резонс) ва молекуляр тузилмаларнинг аниқ маълумотларини олишга қаратилган бошқа усулларда олинган маълумотларни аниқлаштириш учун қўлланилади.

МД моделлаштиришнинг таркибий қисмларини молекуланинг атом координатлари одатда *pdb* файлда берилиб, атомларнинг типини аниқлаш олар орасидаги боғланишлар ва бурчаклар ва моделлаштириш тизимида молекулаларнинг миқдори ташкил этади.

Бу аниқлашни *топология* деб аталади. Катта биомолекулаларнинг атомлари орасидаги ўзаро боғланишлар классик механика принциплари асосида ўрганилади. Яъни бунда молекула компьютерда бир бири билан пружина ёрдамида боғланган сферик шакллар йиғиндиси сифатида қаралади. Потенциал энергия V ни физиканинг классик тенгламасига асосан қуйидагича ифодаланади:

$$V = \sum_{bonds} k_i^{bond} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{bondangles} k_i^{angle} (\alpha_i - \alpha_{i,0})^2 + \sum_{torsionangles} k_i^{torsion} (1 - \cos(n_i \phi_i - \phi_{i,0})) + \sum_{pairs-ij} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \sum_{pairs-ij} \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{Q_i Q_j}{r_{ij}} \quad (1)$$

Ҳар бир йиғинди чапдан ўнгга томон боғланишлар, валент бурчаклар, торсион бурчакларни, ван дер Ваальс ўзаро боғланишларини ва электростатик таъсирларни, уни қуйидаги расмда берилган



Тенглама шаклида кўриб чиқилган (1) k bond, k angle, k torsion ван дер Ваальс ва электростатик таъсирлар каби куч майдонлари параметрлари ҳисобланади моделлаштиришнинг аниқлигини белгилайди.

Энг кенг қўлланиладиган куч майдонлари AMBER, CHARMM, OPLS ва GROMOS ҳисобланади. GROMOS куч майдони бошқалардан водород атомлари жойлашуви билан фарқ қилади.

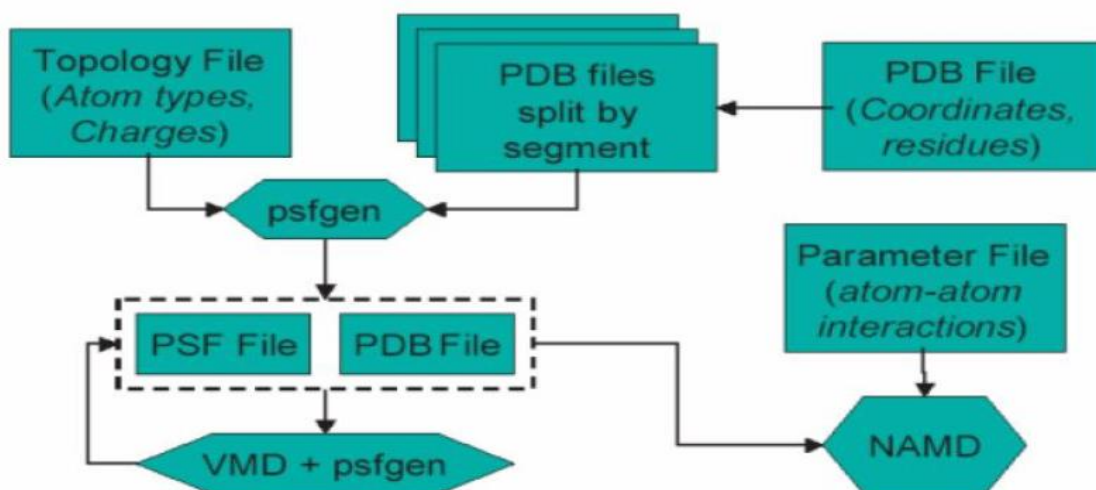
2. Материаллар ва усуллар

L7 / L12 рибосома оксилининг C-учли домени ЯМР спектроскопия йўли билан аниқланади.

График фойдаланувчилик интерфейси VMD да иккиламчи структурани STRIDE билан башорат қилинади.

NAMD молекуляр динамика дастури 3 D моделлаштиришни созлаш.

Моделлаштириш учун NAMD дастуридан фойдаланалилади. Бунинг учун VMD дастуридан фойдаланишни билаш лозим бўлиб, у моделлаштиришда NAMD ни ишга тушириш ва таҳлил ўтказиш учун керакли қурилмаларни созлашни таъминлаб беради. Талаб этиладиган масалалар қуйдаги арсмада кўрсатилган блок схемада акс эттирилган. У pdb файл билан бошланиб NAMDни стимуляция қилиш билан якунланади.



40-расм. NAMD да моделлаштириш учун керак бўладиган қадамлар, pdb-файл билан бошланиб, pdb-файл фақат битта занжир / сегментга эга. Расм NAMD дарслигидан олинган (Phillips et al, 2012).

Барча қадамлар VMD гарфик фойдаланувчи интерфейси ёрдамида бажарилиб, фақат NAMD сатр командаси томонидан ишга туширилади. Моделлаштириш масалаларининг файллари турли параметрлари параметров қўшимча zip-файлда берилган. Бунинг учун NotePad ёки AkelPad. матн редакторлари ҳам керак бўлади.

3.1 Оқсилнинг тузилиши файлини яратиш (psf-файл)

riboprotein.pdb файлини zip-файлдан олинади а моделлаштириш амалга ошириладиган папкага сақлаб қўйилади. Pdb-файлда атомнинг керакли координатлари сақланган бўлиб, компьютерга pdb-файлдаги атомларнинг қайси типи учраши ва улар қандайдир заряд ташувчими, атомлар қандай боғланган ва боғлар атрофида эркин ва чегараланган айланиш мавжудлиги тўғрисида маълумот бериш мумкин.

Бу маълумотларнинг барчаси psf-файлда сақланади ва оқсиллар учун ҳам *pfsген* ёрдамида автоматик равишда бошқарилади. VMD дастурини ишга туширинг ва “Consol TK” (Consol TK-кенгайтирилган менюси) ойнасини очинг Consol ойнасидадан ўзингиз ишломқчи бўлган (*riboprotein.pdb* деб сақланган), масалан, % cd u: / ab2-3 папкага ўтинг.

Эътибор бериш лозимки, эгри чизик папкаларни ажратиш учун ишлатилади (бу LINUX битими бўлиб, Windows да "\" ишлатилади). Сиз фаол папкани «pwd» ёрдамида текширишингиз мумкин. Автоматик psfbuilder: Extensions - Modeling - Automatic PSF Builder ни очинг.

«Rbp» га кириш асосий номини ўзгартиринг ва «Загрузить входные файлы» ни босинг кейин «Угадайте и разбейте цепочки» ни босинг. Охирги босишдан кейин ҳосил бўладиган сурат ... расмда келтирилган. Кейин «Create Chains» ни босинг. Консол ойнасидда жуда кўп огоҳлантиришлар бўлиб, сиз «tbr.psf» файли ҳақиқатдан ҳам бошқарилаётганлигини текширишингиз мумкин. Кейинги қадамлар оқсилни сувли ҳажм марказига жойлаштириш учун керак бўлади.

3.2.Тизимни сольватлаш (сувда эришини башорат қилиш)

«AutoPSF» ойнасини ёпинг ва барча молекулаларни «VMD Main» ойнасидан ҳар бир ёзувни Molecule - Delete Molecule менюсидан фойдаланиб рўйхатдан танлаб олинг. Кейин дастлаб psf дан («Загрузить файлы для: rbp.psf») параметри танлаб олинганига ишонч ҳосил қилиб). rbp.psf ва rbp.pdb ни юклаб олинг. Энди оқсилни сув солинган қутига жойлаштириш лозим. Дастлаб молекула координаталар тизимининг марказига жойланиши лозим, уни «Консоли VMD ТК» ойнасида бажарилади (американча “centre” британча “...” билан фарқ қилади).

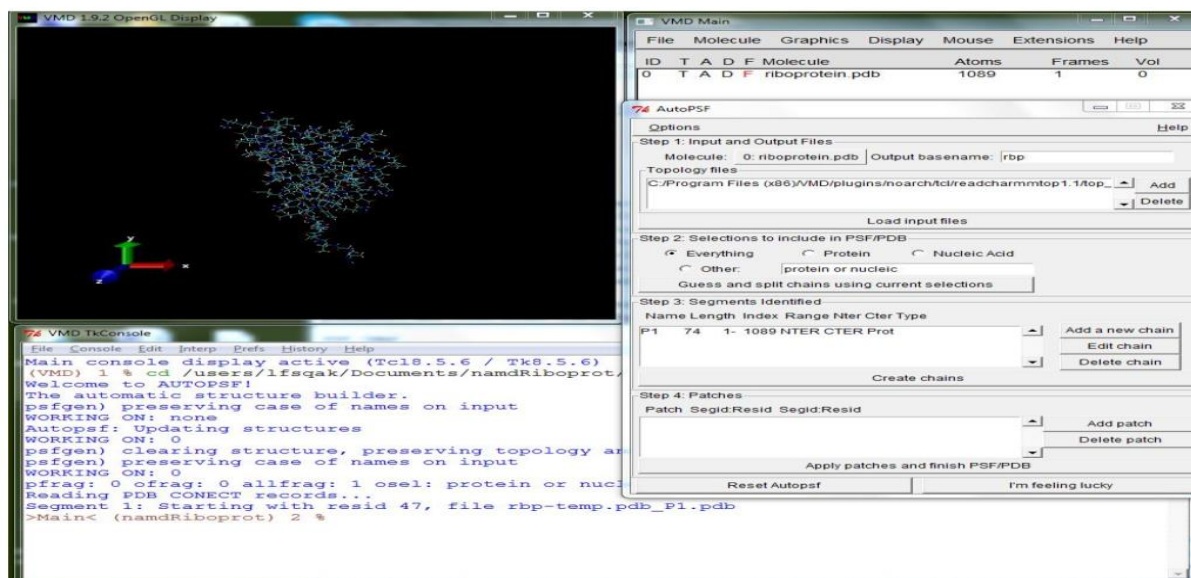
% барчасини ўрнатиш [atomselect top all]

% measure center \$ all (тегишли координатлар x, y, z ни марказдан чиқариш)

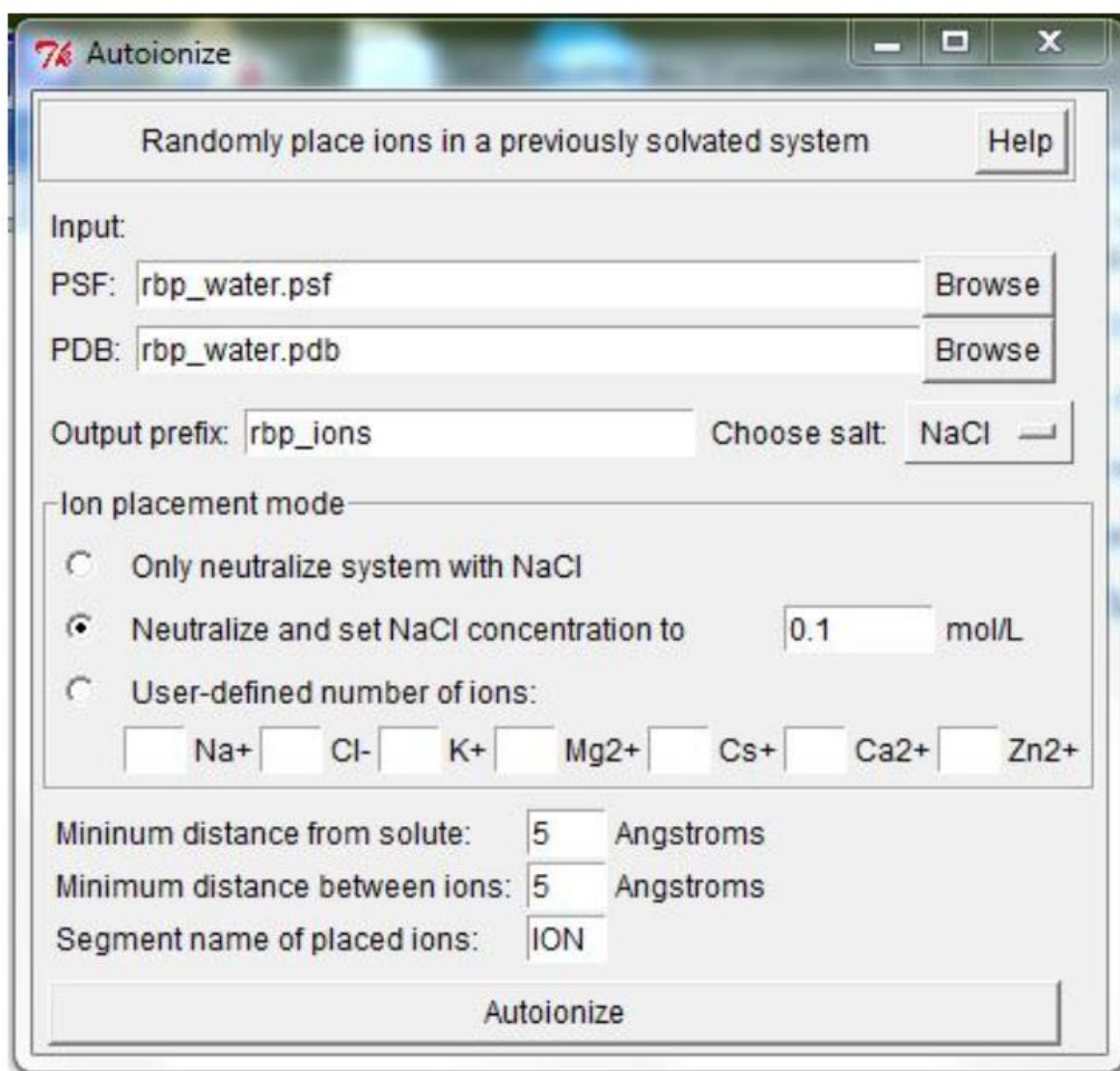
% \$ all moveby [vecinvert [ўлчаш маркази \$ барчаси]

% measure center \$ all (фазовий жойини ўзгариши мувафақиятли чиққан-чиқмаганлигини текширади)

Охирги командадан кўриниб турибдики координаталар нолга яқин шунинг учун оқсил марказлашган. Барча командалар Tcl / ТК тилида дастурлашнинг қисмлари ҳисобланади.



41-рasm. Барча қадамлар бажарилгандан сўнг «Угадай и раздели цепочки с использованием текущего подборки» ёқилгач олинган экран расми.



42-расм. Солватлаш тизимининг кўриниш.

Энди VMD Solvation Boxing Tool ёрдамида оксилни солватлашга тайёр бўлинади. Кенгайтмалар – Модкллаштириш- Қарорлар қўшиш ойнаси янги ойнани очади.

Ушбу ойнада Чиқиш (vsвод) ни "rbp_water" га ўзгартиринг ва барча "Box Padding" қийматларни 10 Å га ўзгартиринг.

Мазкур қиймат оксил ва қутининг чеккаси ўртасидаги масофани билдиради; сув молекуласининг ўлчами тақрибан 3 Å га тенг бўлиб оксил ва сув ўртасида тақрибан уч қатлам сув ва қутининг чеккаси бўлади.

Энг охирида solvat ни босинг. Қанча сув молекулалари қўшилган эди?

Ушбу саволга жавоб бериш учун қуйидаги Tcl / Tk буйруқлари ёрдам

беради. Сўнгида сув молекулаларига тегишли атомлар соникелиб чиқади.

% set wat [юқоридаги сув атомини танлаш]

% \$ ват сон

3.3 Тизимни нейтраллаш

Оқсиллар заряд ташийди, оқсилнинг соф заряди - бу Asp, Glu, Arg, Lys, His) аминокислота қолдиқлари ва N- ҳамда C-учлар ён занжирлари томонидан бериладиган мусбат ва манфий зарядларнинг йиғиндисидир.

Соф заряд рибопроtein учун нолли қийматга эга бўлиши мумкин эмас, лекин молекуланинг исталган тизими нол зарядга эга бўлади. исталган тизим. Зарядни симуляцияда қолдириб, тизим реал бўлмаган шароитларни яратади, шунинг учун сизнинг тизимингизда ҳар қандай заряд қарама-қарши ионлар билан нейтралланиши керак. Мазкур босқичда NaCl тузининг реал конйентрацияси 0,1 М бўлиб, ушбу кадам қурилма ёрдамида ионларни қўшиш йўли билан амалга оширилади:

Кенгайтирма –Моделлаштириш –Ионларни қўшиш (Расширения - Моделирование - Добавить ионы). Ушбу ойнада чиқиш перфексини «`grp_ions`» га созлаб, расмдаги каби «Ионларни жойлаштириш режими» га байроқча қўйилади ва «Нейтраллаш ва NaCl конйентрациясини 0,1 моль/л га созлаш» тугмасини босилади. Охирида «Автоионизация» ни босилади.

Саволлар:

1. Натрий хлор ионидан қанча қўшилди?
2. Сиз бу сонларни Вы Tcl / ТК командаси ёрдамида текширишингиз мумкин.
3. Альтернатив сифатида Windows проводнигидан фойдаланиб, ўзинингизнинг ишчи папканингизга ўтиб Блокнотда `grp_ions.pdb` файлини очинг. Файлнинг охирида натрий ва хлор ионларидан қанча қўшилганлигини кўришингиз мумкин.
4. Бу соннинг охирида эса дианмикада соф зарядни аниқлаш мумкин.

Ҳақиқий моделлаштиришда симуляция қилишни бошлашдан олдин 10000 пс дан ортиқ бурилиш чақириладиган "Ишлаб чиқариш цикли" ни бошлашдан олдин бир қатор моделлаштириш босқичларини бажариш талаб этилади. Бунда энергияни минималлаштириш (ЭМ), сўнгра сув ва оксил молекуласи молекулаларининг мувозанатга келтириш. Бундай мувозанат бўлмаса, сув молекулалари симуляция бошида оксил билан тўқнашиши ва структурани бузиш мумкин. Аммо ЯМР тажриба маълумотлари сунъий равишда бузилмаслиги керак. Баланслаш ехеу барча оксил атомларини фазода ушлаб турилади, сувнинг молекулалари ва ионлари эса эркин ҳаракат қилишга қўйилади.

Бунга МД ни позицион чеклаш дейилади, унга кўра оксил атомларининг позициялари ЯМР структурасидан чекланган позициялардир. Бунинг учун Windows буйруқ сатрида NAMD дан фойдаланилади, EM и MD билан боғлиқ барча параметрлар имитация «.namd» кенгайтмаси бўлган матнли файлларда кўрсатилган.

4.1 Энергияни минималлаштириш (ЭМ)

Биринчи энергияни минималлаштириш учун биз моделлаштириш ойнаси ва марказ координаталари ўлчами ҳақида бир оз маълумот олишимиз керак. Ушбу маълумотни журналингизни ёзинг ва ёзиб олишингиз керак ва уни namd файлига ёзинг. VMD -да rbp_ions.pdb файлини юкланг, аллақачон юкланган бўлса ва TKConsole да қуйидаги буйруқларни киритинг

```
% барчасини юкланг [atomselect top all]
```

```
% measure minmax $ барчаси  
Натижа эса тахминан мана шундай кўриниши  
керак: {-23.841999053955078 -37.52799987792969 -21.398000717163086}
```

```
{24.74799919128418 27.742000579833984 21.966999053955078}
```

Бу чапдан моделлаштириш ойнасининг пастдаги ва ўнгдан юқоридаги бурчаклари координатларидир. Бу координатлар орқали моделлаштириш ойнасида координатлар бўйича қуйидаги ўлчамларга эга бўламиз: xdim = 24,75 - (-23,84) = 48,59 ҳамда ydim ва zdim худди шу тарзда бўлади. Моделлаштириш ойнаси маркази қуйидагилар ёрдамида олинади:

% ўлчамлар маркази \$ барчаси:

0,5794315338134766 -4,7676897048950195 0,3911421597003937

Ушбу рақамларни ҳам ёзиб олинг. Энди «minim.namd» файлини солашга тайёрмиз. Тизим энергиясини минималлаштиришни кўрсатадигант файлини қўшимча zip-файл қисмидан олинг ва файлини керакли маълумотларни файлида кўрсатилганидек жойлаштиринг ҳамда ишчи папкадаги 22 саҳифадан 12-саҳифангизда сақланг.

Кейин Windows командаси буйруғини очинг, ишчи папкангизга ўтинг ва энергияни минималлаштиришни бошланг

(Windows қайтар эгри чизигидан фойдаланади «\»):

> u:

> cd \ ab2-3

> c: \ NAMD_2.10_Win64-multicore \ namd2 + p4 minim.namd>

minim.log (namd2 дастурининг компютерингиздаги жойлашуви бошқача бўлиши мумкинлигига ётибор беринг).

Минималлаштириш бир дақиқадан камроқ вақт ичида тугайди, ҳаммаси муаммосиз ўтганлигига ишонч ҳосил қилиш учун minim.log файлини Блокнот ёрдамида очинг.

4.2 МД ҳолатини чеклаш

МД-нинг позицион чеклови учун биз NAMD га тизимда қайси атомлар чекланган ва улар қандай координаталарда чекланиши кераклигини айтиб беришимиз керак. Биз оқсилнинг барча водородли бўлмаган атомларини энергияни минималлаштириш натижасида олинган позициялар билан чеклаймиз (олдинги қадамнинг натижаси, emin.pdb да чиқади). NAMD га қайси атомлар чекланган бўлиши кераклигини хабар бериш учун биз бета-факторда 1.00 рақамини ўз ичига олган устун pdb файлини яратишимиз керак Бунинг учун VMD -ни қайта ишга туширинг (ёки барча молекулаларни олиб ташланг), emin.pdb ва TKConsole ни очинг.

TKConsole га қуйидагиларни киритинг:

% set allprotein [юқориги оқсил atomselect]

```
% set fix [Atomselect top «водород эмас оксил»]
% $ allprotein бета 0 ни қайд этади
% $ fix set beta 1
% [atomselect top all] writepdb fixsystem.pdb
fixsystem.pdb ни Блокнот ёрдамида очинг ва охиридан олдинги устунда 1.00
белгиси билан оксилнинг новодород атомлари белгиланганлигига ишонч
ҳосил қилинг. Шунда моделлаштиришда MD позицион чекланишларини
ишга туширишга тайёр бўламиз:
> c: \ NAMD_2.10_Win64-кўп ядроли \ namd2 + p4 sim_fixprot.namd>
simfix.log
```

Моделлаштириш пайтида ($\approx 1,5$ соат) қуйидаги саволларга жавоб беринг MD позициясини чеклашни моделлаштириш бўйича журналингда қайд этинг. Бунда 13-саҳифанинг 22-қисми NAMD Онлайн фойдаланувчи қўлланмаси (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/ug.html>) сиз учун фойдали бўлиши мумкин.

Саволлар

1. Электростатик ва Ван дер Ваалс ўзаро таъсирларини ҳисоблаш учун чегаравий масофасининг қиймати қандай (Å да)?
2. Моделлаштириш вақтининг орттирилиши нима (аниқлашнинг тўғри бирликлар билан) (агар аниқланмаган бўлса, 4-бетга қаранг)?
3. Жойлашув чекловларини моделлаштириш учун неча қадам керак?
4. Тизим координаталари траектория файлига (.dcd) неча марта ёзилади (иккала босқичга ва ҳақиқий вақт оралиғига эътибор беринг).

4.3 MD ни чекланмаган моделлаштириш (ишлаб чиқариш цикли)

Бундан олдинги моделлаштириш тугагач, рибопро테인нинг юқори ҳароратда парчаланишини аниқлаш мақсадида MD ни чекланмаган моделлаштиришни ишга тушириш мумкин. Бундан олдинги боқичда sim_fixprot.pdb дан чиққан маълумотлар 10000 пс 550 К ҳароратда узоқ муддатли моделлаштиришни ишга тушириш учун ишлатилади.

Ишчи папкангизга қўшимча zip-файлдан sim_free.namd конфигурациясини файлини сақланг ва аввалги каби моделлаштиришни бажаринг. Моделлаштириш пайтида сиз sim_free.namd таркибини таҳлил қилишингиз мумкин.

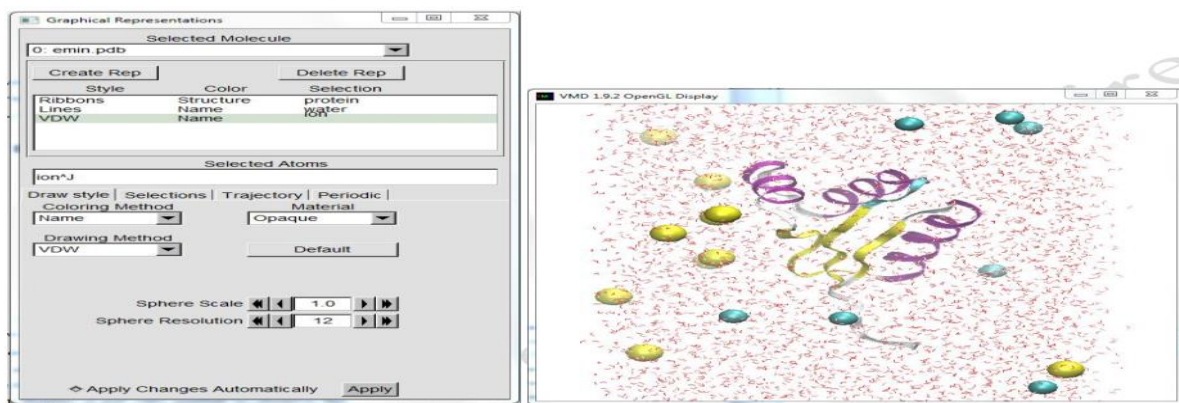
Эътибор берингки, бу ерда босим назорати йўқ, шунинг учун моделлаштириш қатъий белгиланган ҳажмда амалга оширилади,

Бундай юқори ҳароратда. Сувнинг буғланиши, эҳтимол олдини олиш учун NVT ансамбли (статистик механикада "даги анъанай - ансамбл") қўлланилади. Умуман, моделлаштириш вақти қанча кўрсатилган?

Сиз фақат жуда қисқа моделлаштиришлар бажарилишини кўришингиз мумкин. Тўлиқ моделлаштириш 10000 пс лар оддий икки ядроли процессорда бир неча кун давом этади. Кейинги маълумотларни тўлиқ траектория sim_free.dcd ва лог-файл simfree.log қисмини олиш ҳамда таҳлил қилиш учун sim_free.namd файлини ўзгартиришингиз керак бўлади (Моделлаштириш қўлланмасининг охири) 22-бетдан 14-бети

5. Маълумотларни таҳлил қилиш

Визуал таҳлил. 42VMD -ни TKConsole ёрдамида ишга туширинг ва иш каталогингизга ўтинг. emin.pdb файлини очинг. Кейин Menu Display - Orthographic дан фойдаланинг. Графика менюси билан – Кўринишларни ўзингизнинг хоҳишингизга кўра, масалан, қуйидаги 43-расмда кўрсатилгандек ўзгартиришингиз мумкин.



43-расм.: чапда VMD (слева) ни ўнгда кўрсатилган кўриниш учун созлаш.

Кейин асосий ойнадаги молекулани фаоллаштиринг ва Меню Файл - Маълумотларни молекулага юклаш-ни танланг, . sim_fixprot.dcd га ўтинг ва уни VMD -га юкланг. Тахминан 1000 кадр юкланди. «VMD Main», ойнасининг пастки қисмидаги плеер бошқарувидан фойдаланиб, ҳолатни чеклашни моделлаштириш муваффақиятли бўлишини фақат ионларни кузатиш орқали текширишингиз керак, бунда сув молекулалари ўрнини ўзгартиради, лекин оксил атомларининг ҳолати эса доимий сақланиб қолади. Ионларнинг йўқ бўлиб, кутининг чеккаларида яна пайдо бўлишининг сабаби нимада?

Энди Molecule - Delete Molecule билан молекулани ўчириб ташланг ва sim_fixprot.pdb, ни юкланг, бу ҳолатни чеклашни моделлаштиришнинг чиқишини охиргиси бўлади. Ушбу молекулага узун 10000 пс траекториясини юкланг. У 5000 кадрни сақлаши керак.

Сиз L7 / L12, рибосомал оксилнинг жойлашишини траекторияни олдинга ёки орқага йўналтириш билан катланишини кўришингиз мумкин. Жорий дисплейда оксил таркибидаги ўзгаришларни кузатиш унчалик манфаатли эмас, чунки молекула 22 саҳифанинг 15 саҳифасида молекула тарқоқ ва айланма ҳаракатларга эга бўлади. Айланиш ва диффузияни йўқ қилиш учун барча траектория рамкаларини дастлабки ҳолатига текисланг. Очiq кенгайтмалар - RMSD Trajectory Tool қурилмаси билан анализ ва «Selection Modifiers» дан- «Backbone» танланг кейин «ВЫПРАВНИТЬ» - “Текисланг” тугмасини танланг. Бироз кутгач қурилма ойнасини ва траекторияни қайтадан ишга туширинг. Энди оксилнинг ички ҳаракатларига диққатни қаратиш мумкин.

5.2 Микдорий таҳлил

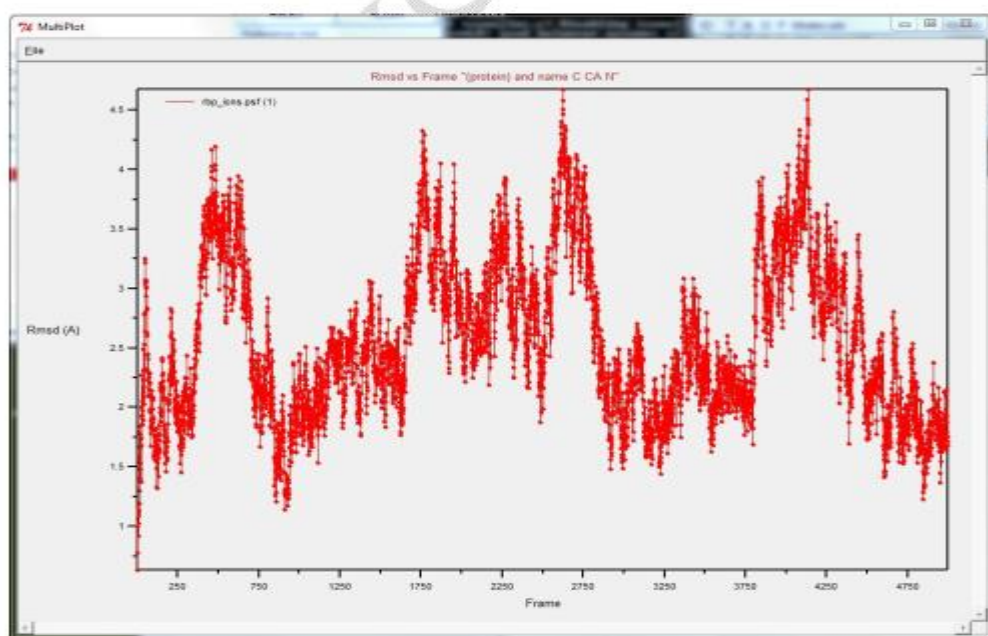
5.2.1 Квадратнинг ўртача оғиши

Икки тузилиш орасидаги ўртача квадратик оғиш (RMSD) умумий кўрсаткич бўлиб, 0 молекула ва 1 молекула орасидаги структуравий ўхшашлик ва асосий занжирнинг барча N атомлари бўйича ўртача вазн массаси сифатида ҳисобланади.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i (r_i^0 - r_i^1)^2}$$

бунда $r_i = (x, y, z)$ - координатлар вектори, m_i эса ҳар бир атомнинг массаси 0,2 нм (2 Å) га яқин RMSD катта бўлмаган структуравий тебранишларни кўрсатади, бу вақтда $RMSD > 0,3$ нм (3 Å) конформацион ўзгаришларни кўрсатади. 0 Молекула - бу траекториянинг биринчи кадри (ҳисоблаш тизими), 1 молекула эса траекториядаги барча кетма-кет тизимларга мос келади.

RMSD Trajectory қурилмаси ҳар бир RMSD-кадрини шакллантириш учун биринчи кадрга ҳавола билан ишлатилиши мумкин. Унда "Trajectory" бўлимидаги "Grafika" ни ажратилади. "Magistral" вариантини қолдирилади ва текширилади. RMSD графиги 44 -расмда келтирилган. Бу тўхтатилган ўлчанмаган RMSD ҳисобланади.



44-расм: кадр рақамига боғлиқ бўлган RMSD графиги. RMSD қурилмаси ёрдамида яратилган. 5000 та кадр 10,000 пс моделлаштиришдан олинган.

Шундай қилиб кетма-кет икки кадр орасидаги вақт фарқи 2 тани ташкил этади. Биз оқсилларни катланиш (фолдинг) жараёнини унинг траекториясини ўзгартириб ўрганишни истаганимиз учун, буни амалга оширамиз.

Электрон жадвал дастурига (масалан, например, Microsoft Excel) RMSD маълумотларини импорт қилинг ва 22-саҳифанинг 16-саҳифасини очинг.

Графика ойнасини ёпинг, "Plot" белгисини олиб ташланг, "Сохранить" ёнига тасдиқ белгисини қўйинг ва яна RMSD тугмасини босинг. Дастур сизнинг ишчи папкангизда «trajrmsd.dat» файлини яратди. Microsoft Excel -да «trajrmsd.dat» файлини очинг. Файл тури очиладиган рўйхатидаги "Барча файллари"-«Все файлы» ни танлашни унутманг.

"Матнни импорт қилиш устаси" - «Мастер импорта текста» автоматик равишда пайдо бўлади. Юқорига юриб; сиз "Рухсат етилган кенглик" - «Фиксированная ширина» ва "Кейинги - Кейинги - Тугатиш" - Далее - Далее - Готово» ни танлайсиз.

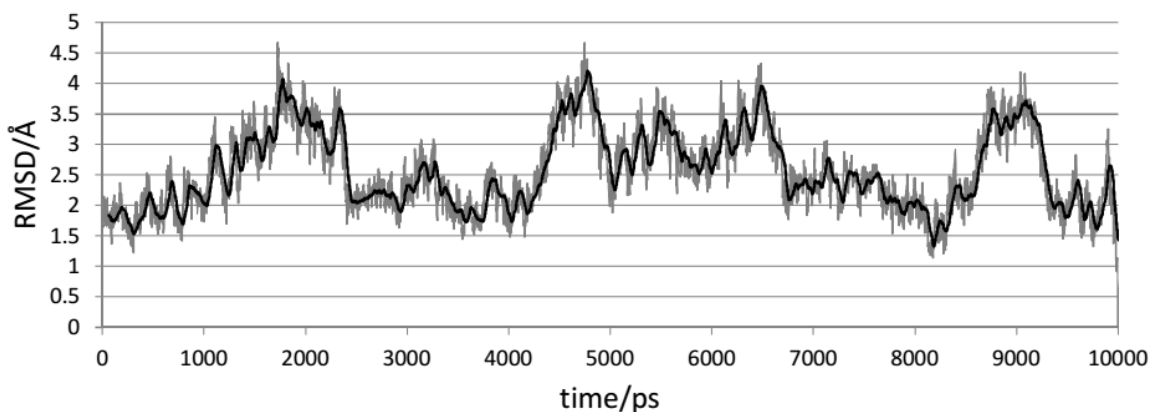
НА ни нолга алмаштиринг ва кейин кадрлар оралиғи 9-расмда кўрсатилгандек 2 пс / квадрат (= 10000 пс / 5000 квадрат) бўлишини ҳисобга олиб, тўғри вақтни ҳосил қилишингиз керак.

	C2		f_x	=A2*2	
	A	B	C	D	E
1	frame	mol1	time/ps		
2	0	0	0		
3	1	0.634	2		
4	2	0.784	4		
5	3	1.001	6		
6	4	1.089	8		
7	5	1.138	10		
8	6	1.031	12		
9	7	0.918	14		

45-расм: RMSD га импорт қилинган маълумотлар ва C устунда вақт оралиғида шакллантирилган кадрлар.

Кейин А устундаги таркибни С устунига алмаштиринг, С устундан нусха олинг ва “Вставить Значения в столбец”- А устундаги қийматларни қўйинг -ни босинг. Биз оксил катланишини таҳлил қилмоқчи бўлганимиз учун, биз ҳийла ишлатамиз ва Б устундаги маълумотларни ўзгартирамиз. Бунинг учун А устундан С устунига нусха олинг, сўнгра Б ва С устунларини танланг ва Маълумотлар - С устуни бўйича саралаш «Сортировать по столбцу С»ни танлаб ва каттадан кичикгача тартиблаш орқали «Данные - Сортировка» функциядан саралаш фойдаланинг.

Кейинги босқичда А устунларини танлаб, вақтга нисбатан RMSD графигини яратинг, бунинг учун А ва Б устунларни танланг ва "тўғри чизиқлар билан нуқтали диаграммаси «точечная диаграмма с прямыми линиями» типининг - "нуқтали диаграммаси" ни яратинг. Мисол 10-расмда кўрсатилган. Ушбу мисолда RMSD 2 ва 4 Å оралиғида тебраниб туриб, бу эса оксилнинг ҳеч қачон тўлиқ ёзилиб кетмаслигини кўрсатади. Сизнинг траекторияни моделлаштириш натижаларингиз бошқача бўлиши мумкин.



46 -расм: L7 / L12рибосома оксили С-терминал доменининг катланиш RMSD асосий занжирининг траекторияси. Тўқ чизиқ - бу 25 та нуқтали маълумотдан иборат ойна бўйлаб ҳаракатланувчи ўртача қиймат.

Саволлар:

1. Катланиш бошланишини қанча вақтдан кейин кўрасиз?
2. Катланиш қайси вақтда содир бўлади
3. Тезлик сезиларли даражада ошадими?

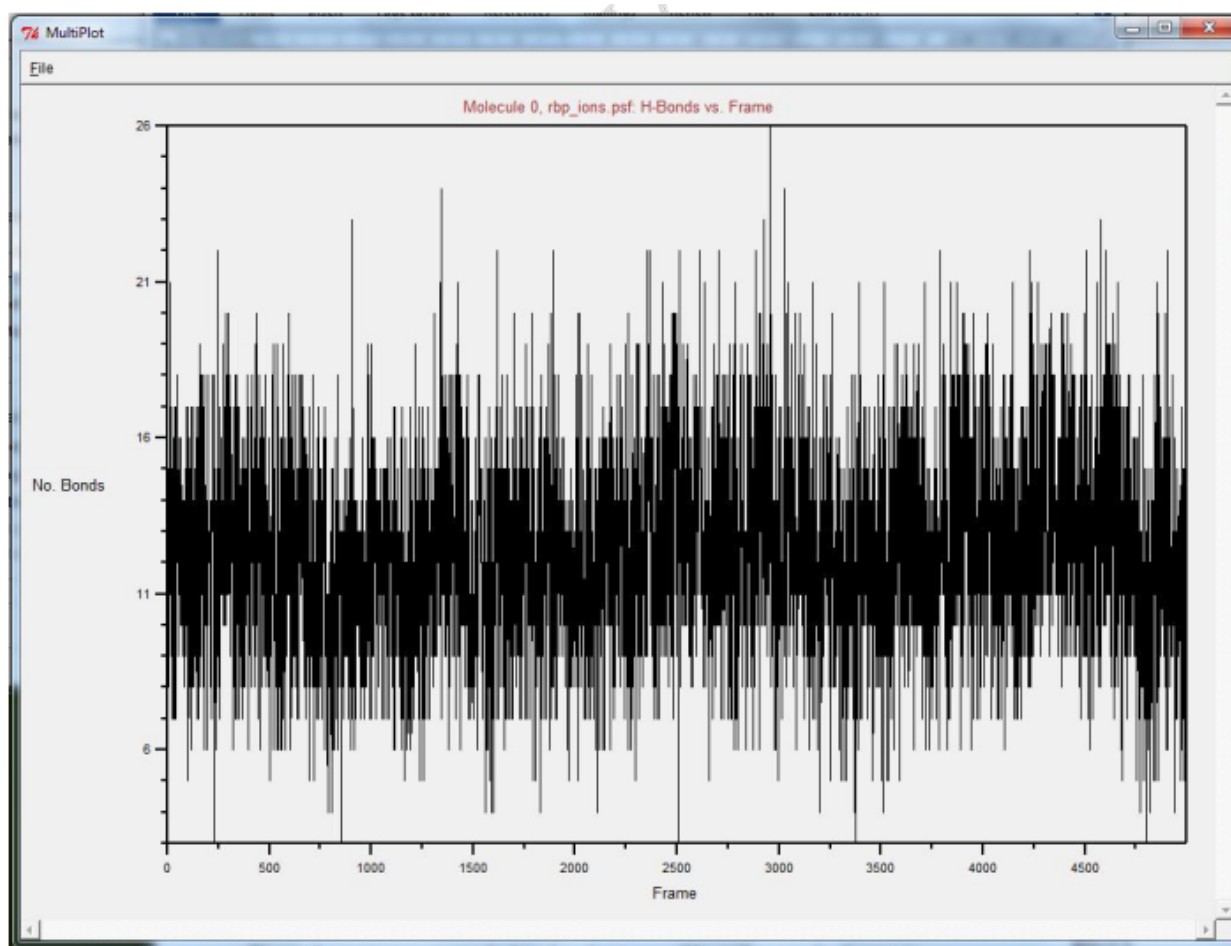
4. Сиз VMD га қайтиб, траекторияни қайтадан ишлаб чиқишингиз мумкин

5. RMSD графигида кузатилган таркибий ўзгаришларни визуал тасдиқлашингиз мумкин.

5.2.2. Водород боғларининг ҳосил бўлиши

Траектория шаклланиши даврида водород боғларининг сонини ҳисоблаш учун Extensions -Анализ - Водородные боғлардан фойдаланинг. .

«Расстояние донор-акцептор» “Донор акцептор масофаси”ни ни 3,5 Å га, «Угол отсечения» “Бурчак кесишмаси” ни 30° ўзгартиринг ва водород боғларини «Найти» “Қидириш” ни босинг. Бироз ватдан сўнг қуйидаги 47-расм ҳосил бўлади (47-расм).



47-Расм. Водород боғлари сони ва квадрат сонига нисбатан. 22-бетнинг 18-саҳифаси

Multiplot ойнасидан маълумотларни векторларига экспорт қилишни танлаб Файл - Экспорт в векторы ASCIIни экспорт қилинг. Кейин ушбу

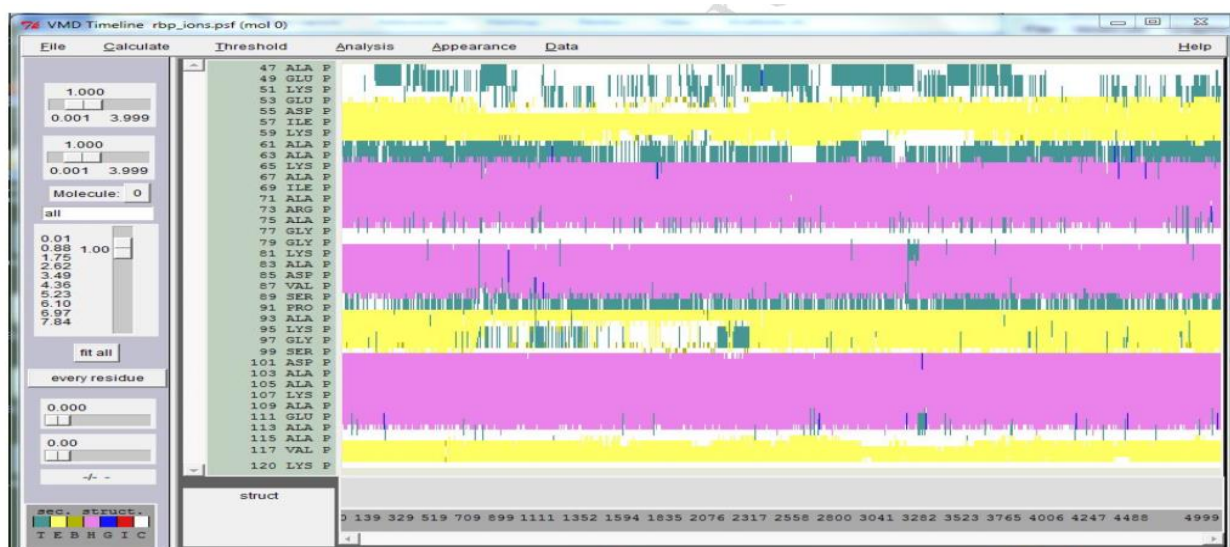
маълумотларни Excel га 5.2.1-бандда айтиб ўтилганидек импорт қилинг ва вақтни ўзгартиринг.

Саволлар

1. Протеинни катламаниш пайтида водород боғлари сонининг ўзгариш жараёни тенденциясини кузатаяпсизми?
2. Водород боғланишлари ва ўртача чекланиш (sd) нинг ўртача сонини кўрсатинг, бу рақам $n_{hb} \pm sd$ га тенг бўлади. n_{hb} учун муҳим рақамларнинг тўғри сонини киритганингизга ишонч ҳосил қилинг; стандарт чекланиш сизга қандай рақамлардан фойдаланиш муҳим эканлигини айтиб беради. Стандарт чекланишлар одатда бир ёки иккита муҳим рақам билан кўрсатилади. Масалан: 14.123 ± 1.2 нотўғри, 14.1 ± 1.2 ёки 14 ± 1 тўғри.

5.2.3 Иккиламчи структура

Моделлаштириш вақимда Extensions - Timeline қурилмаси ёрдамида оқсилнинг иккиламчи структурасининг ўзгаришларини тадқиқ этишимиз мумкин. Ҳисоблаш ишлари кўп вақт (30+ минут) талаб этгани боис бу босқичда олдиндан танаффус режалаштириб олиш талаб этилади, Қурилмлар ойнасидан Calculate - Calc. Struct бўлимини танланг..



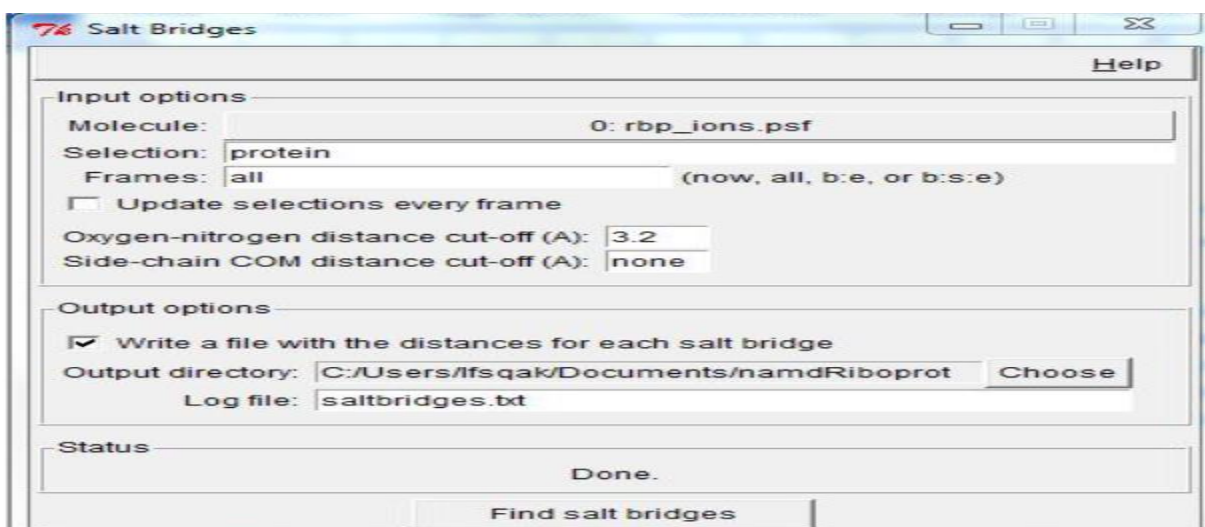
47- расм. Кадр номерига боғлиқ равишда ҳар бир кодиқнинг иккиламчи структураси (Т: бурилиш, Е: в-занжир, В:ажратилган кўприк, Н: а-спирал, G: спирал 3-10, I: р-спирал, С: спирал).

22 саҳифанинг 19 саҳифаси

47-расмда келтирилган мисолдан моделлаштириш пайтида сиз учта α -спирал етарли даражада барқарор қолаётганини кўришингиз мумкин, шу билан бир вақтда N-терминал б занжирнинг иккиламчи тузилиши марказда Pe57 бурилишлар, хусусан, 1500 рамка атрофида ҳосил бўлиши туфайли камайганлиги (3000 пс, вақт бирлигида "ёзилиши" ни англатади). Маркази Lys95 бўлган иккинчи б занжири бундан ҳам бир вақтнинг ўзида сезиларли каттароқ даражада тушиб кетди. б-занжирининг C-учи 3200 (6400 пс) кадр атрофида қисқариши кузатилади. Траекторияни моделлаштириш натижалари сизнинг тажрибангизда бутунлай бошқача бўлиши мумкин. Пастки қисмдаги кадррақамини босиш орқали сиз траекториянинг мавжуд нуктасини VMD график ифодалаш ойнасида кўрсатасиз. График дисплейда чапдаги кетма-кетликлар сатрида сиз аминокислатани қизил ранг билан ажратиб кўрастишингиз мумкин. Дисплейларни янгилаш «VMD не отвечает» “VMD жавоб бермаяпти” сифатида биров вақт юзага чиқмаслиги мумкин, лекин биров вақт ўтгач дисплей янгиланади.

5.2.4. Туз кўприкчалар

Кенгайтирилган – таҳлил - пез кўприкчалар ёрдамида биз туз кўприкларини аниқлаш, шуниндек ҳар бир кўприкча учун – вақт оралиғини топишимиз мумкин.



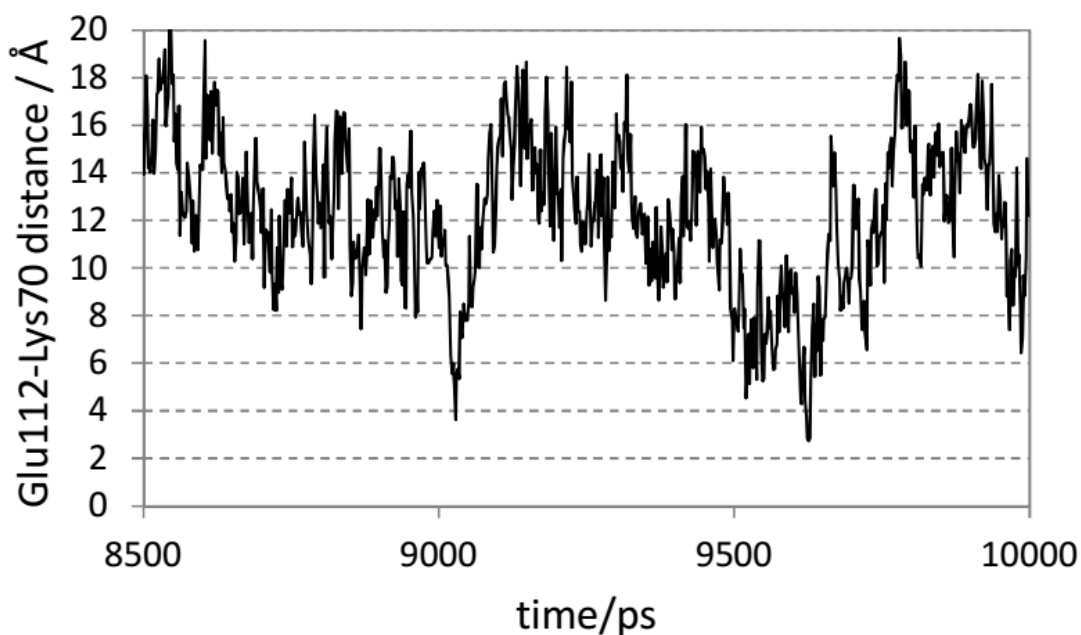
48-расм Salt Bridges қурилмасининг созуламалари. “ Чиқиш параметрлари” даги созуламаларга эътибор беринг, қўшимча равишда “Ҳар бир кадрдаги танлашни янгилаш” белгиланмаган.

13-расмда кўрсатилган каби чиқиш параметрларини сошлаш натижасида қуйидаги туз кўприклари аниқланган.

22 саҳифанинг 20 саҳифаси

GLU96-LYS95, ASP102-LYS95, GLU116-LYS107, ASP85-LYS95, GLU111-LYS108, GLU104-LYS108,
GLU50-LYS100, GLU112-LYS70, GLU53-LYS51, ASP101-LYS100, GLU82-LYS81, GLU49-LYS100,
GLU104-LYS100, GLU88-LYS65, ASP55-LYS120, ASP85-LYS84, GLU104-LYS107, GLU118-LYS120,
GLU111-LYS107, GLU49-LYS51, ASP55-LYS51, GLU82-LYS95, GLU118-LYS59, GLU88-LYS84,
GLU53-LYS120, GLU96-LYS120, ASP85-LYS81, GLU116-LYS59, GLU112-LYS108, GLU50-LYS51

Эътибор беринг, агар траекториянинг ҳар бир нуқтасида масофа 3,2 Å га тенг ёки ундан кам бўлса, , у ҳолда бир жуфт қолдиқ туз кўприкчаси сифатида аниқланади. Туз кўприкчаси учун Glu112- Lys70 орасидаги масофа 14-расмдаги "жойлаштириш" вақтига нисбатан кўрсатилган.



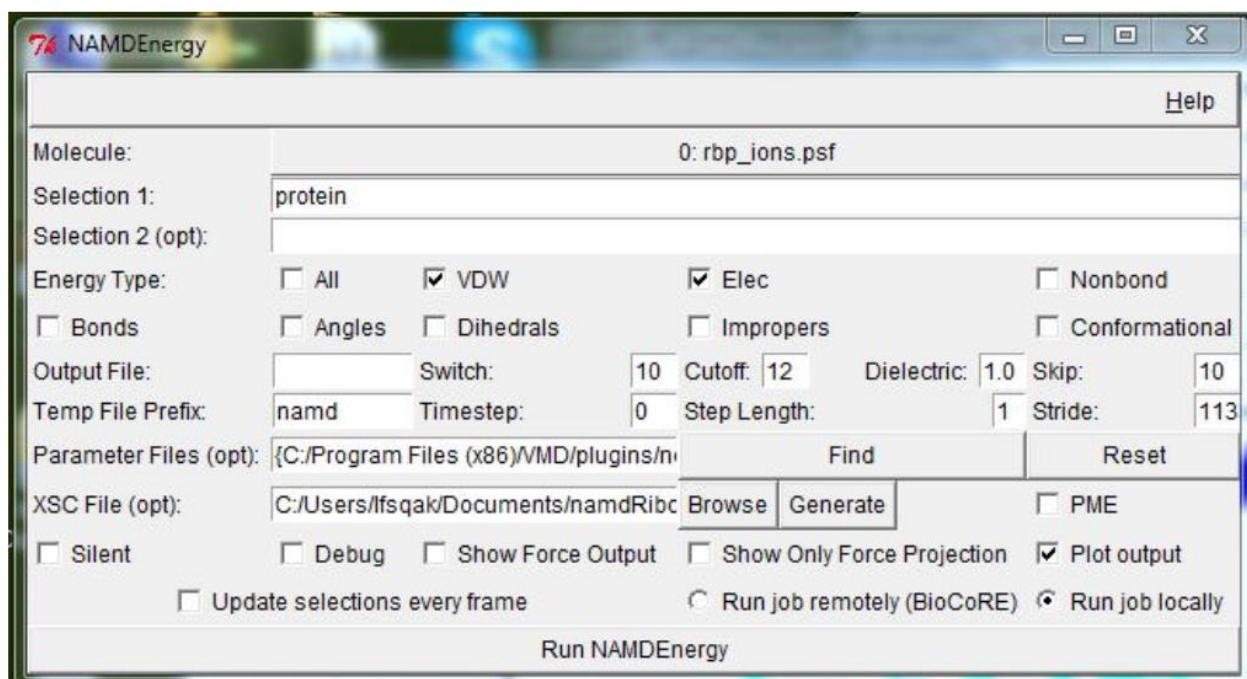
49- расм. Glu112 и Lys17 орасидаги масофа траекториянинг “ёзилишини” чақариб олишнинг вақтга боғлиқлиги.

Савол:

1. Траекторияни моделлаштириш даврида қанча тузли кўприкчалар аниқланди?

5.2.5 Энергетика

Кейинги таҳлилда оксилнинг вақтга боғлиқ равишда Ван-дер-Ваальс графигини қуриб, ички электростатик энергиясини ҳисобланади. Бу таҳлилни NAMD Energy қурилмасида 14-расмда кўрсатилгани каби соғламалар Кенгайтмалар - Анализ - NAMD Energy с ёрдамида ўтказилади. Ўзтибор беринг параметрларнинг файли автоматик қўйилади.



50- расм. Моделлаштириш вақти функцияси сифатида оксилни катланиш пайтида Ван-дер-ваальс энергияси ва ички электростатик энергияни ҳисоблаш/

Кўрсатилган Multiplot ойнасида Филе - File - Export to ASCII matrix. матрицасидан фойдаланинг. Кейин Excel да яратилган multiplot.dat файли импорт қилинг. Биринчи устун траектория рамкасини билдиради, кейин тўлиқ, электростатик ва Ван дер Ваальс энергиялари ккал / молда ифодаланади. 15-расмда оксилнинг катланиш жараёни ва участкасини ифодалаш учун илгари кўрсатилган мисолдаги каби вақт бирлигида ўқи мисолида кўрсатилгандек, электростатик ва ички ван дер Ваальс энергияси

вақтга нисбатан орқага 15-расм да қайта катланиш жараёни ва участкасини ифодалаш учун илгари тасвирланган вақт ўқи мисолида кўрсатилгандек, электростатик ва ички ван дер Ваальс энергияси вақтга нисбатан ифодаланган.

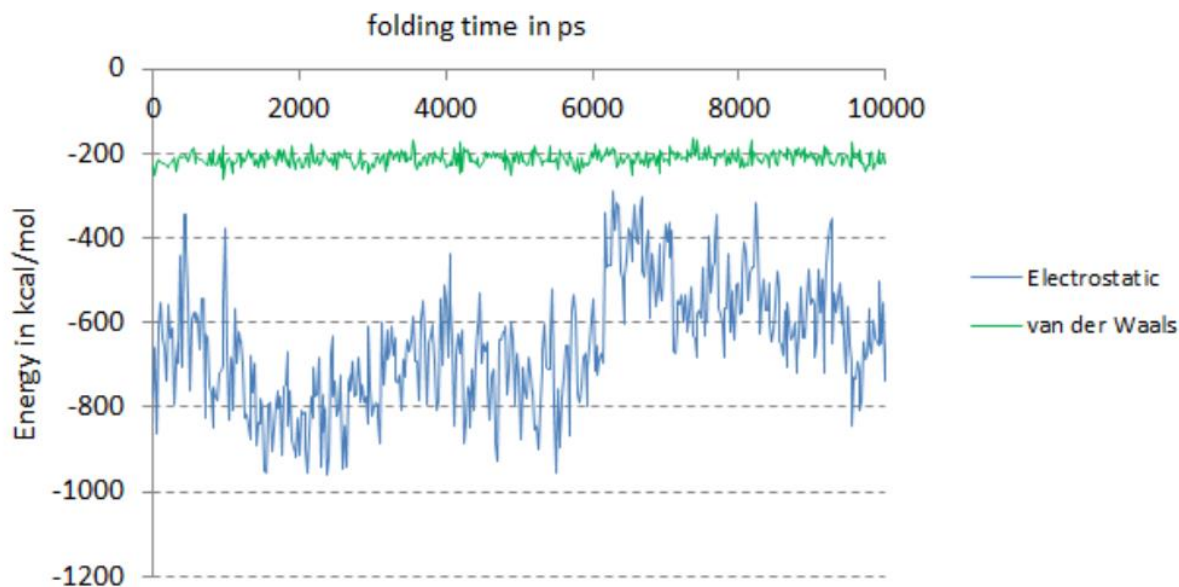


Figure 15: Protein internal energy terms plotted against folding time.

51-расм. Қатланиш вақтига қараб ички энергиясининг тузилиши.

Адабиётлар

- A. Fiser, R.K. Do, & A. Sali. Modeling of loops in protein structures, *Protein Science* 9. 1753-1773, 2000.
- A. Sali & T.L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993.
- B. Webb, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics* 54, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.37, 2016.
1. Bocharov EV, Sobol AG, Pavlov KV, Korzhnev DM, Jaravine VA, Gudkov AT, Arseniev AS (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *Journal of Biological Chemistry* 279: 17697-17706

2. Day R, Daggett V (2007) Direct observation of microscopic reversibility in single-molecule protein folding. *J Mol Biol* 366: 677-686
3. Dodson GG, Lane DP, Verma CS (2008) Molecular simulations of protein dynamics: new windows on mechanisms in biology. *EMBO reports* 9: 144-150
4. Frishman D, Argos P (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins-Structure Function and Genetics* 23: 566-579
5. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics & modelling* 14: 33-38
6. Karplus M, Petsko GA (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631-639
7. Lindahl E (2008) Molecular dynamics simulations. In *Molecular Modeling of Proteins*, Kukol A (ed), Vol. 443, pp 3-23.
8. M.A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Sali. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325, 2000.
9. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26: 1781-1802
10. Totowa: Humana Press Phillips J, Isgro T, Sotomayor M, Villa E, Yu H, Tanner D, Liu Y. (2012) NAMD tutorial. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- C. Webb, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics* 54, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.37, 2016.
11. M.A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Sali. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325, 2000.
- A. Sali & T.L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993.

- A. Fiser, R.K. Do, & A. Sali. Modeling of loops in protein structures, *Protein Science* 9. 1753-1773, 2000.
12. Bocharov EV, Sobol AG, Pavlov KV, Korzhnev DM, Jaravine VA, Gudkov AT, Arseniev AS (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *Journal of Biological Chemistry* 279: 17697-17706
13. Day R, Daggett V (2007) Direct observation of microscopic reversibility in single-molecule protein folding. *J Mol Biol* 366: 677-686
14. Dodson GG, Lane DP, Verma CS (2008) Molecular simulations of protein dynamics: new windows on mechanisms in biology. *EMBO reports* 9: 144-150
15. Frishman D, Argos P (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins-Structure Function and Genetics* 23: 566-579
16. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics & modelling* 14: 33-38
17. Karplus M, Petsko GA (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631-639
18. Lindahl E (2008) Molecular dynamics simulations. In *Molecular Modeling of Proteins*, Kukol A (ed), Vol. 443, pp 3-23.
19. Totowa: Humana Press Phillips J, Isgro T, Sotomayor M, Villa E, Yu H, Tanner D, Liu Y. (2012) NAMD tutorial. University of Illinois at Urbana-Champaign.
20. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26: 1781-1802

§6. АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ. ОҚСИЛЛАРНИ КОМПЬЮТЕРДА ДИЗАЙНЕРЛАШ УСУЛИ

Оқсиллар, аминокислоталарнинг полимерлари бўлиб, ҳужайранинг асосий таркибий қисмлари ва функционал молекулалари ҳисобланади. Улар тирик тизимлардаги энг кўп қиррали макромолекулалар бўлиб, турли муҳим функцияларга, шу жумладан структуравий, каталитик, сезувчанлик ва

тартибга солувчи функцияларга эга. Аминокислоталар кетма-кетлигини ўз ичига олган аниқ тузилмаларни ҳосил қилиш учун оқсилларни бир-бирига тўплаш қобилияти бу кўплаб ролларни бажаришга имкон беради. Протеинлар кетма-кетлиги ҳақидаги маълумотлар тўплами тез суръатлар билан ўсиб бормоқда, ҳозирги вақтда Universal Protein Resurs (UniProt) маълумот базасида тахминан 6 миллион ёзув мавжуд [1 - 8].

Оқсилнинг функциясини тўлиқ тушуниш учун унинг уч ўлчовли тузилиши тўғрисида билимга эга бўлиш зарур. Афсуски, бугунги кунда экспериментал текширилаётган тажрибаларда барча оқсилларнинг таркиби тузилишини бутунлай аниқлаш имкони кенг эмас, оқсилларнинг фақат бир кичик бир бўлаги (2,8 – 10) қисмини аниқлаш мумкин, тахминан 2% мумкин. Қолган 98% учун структурани башорат қилиш ягона муқобил усул ҳисобланади. Шунинг учун, оқсилларнинг структуравий баҳолаб ҳисоблаш биологияда муҳим мақсад ҳисобланади..

Молекуляр моделлаштиришдаги ютуқлар табиатда мавжуд бўлган маълум оқсиллар кетма-кетликлари асосида янги оқсилларни яратишдан тортиб, маълум бир тузилишга ўралган ёки маълум бир функцияни бажарадиган янги оқсилларни лойиҳалашга қадар ҳисоблаш оқсилларини лойиҳалаш майдонини кенгайтирди.

Ҳисоблаш усуллари қўллаш орқали оқсилларни лойиҳалашни мақсад қилишдан олдин, оқсилнинг қатланиши (фолдинги), барқарорлиги ва функциясини тартибга солувчи асосий физикавий принципларни тушуниб олиш керак. Буни ўнлаб йиллар давомида олимлар ва тадқиқотчилар оқсилнинг функционаллигини аниқлаш учун оғиши ёки ўзгаришга асосланган парадигма (мисоллар) ни кузатиб боришган. Усул юзлаб ва минглаб протеин мутантларининг ҳосил бўлишига ва керакли хусусиятларга эга вариантларни аниқлаш учун селектив таъсир билан боғлиқ. Шу билан бир қаторда, ҳисоблаш оқсиллини лойиҳалашда оғишга асосланган парадигма ўрнига дизайнга асосланган парадигмага йўналтирилгандир.

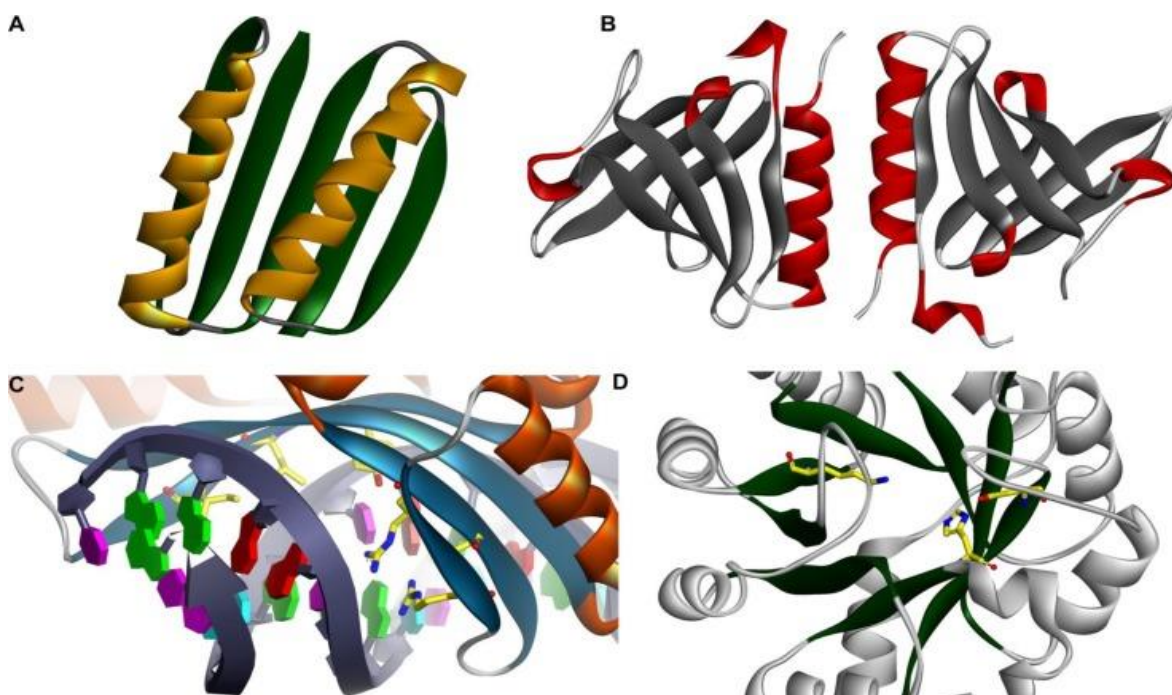
Дизайнга асосланган парадигмада биологлар дизайн парадигмаларини ёки масалаларнинг ечимини ҳал қилишда барча усуллари хисоблаш моделлаштириш техникаси билан бирлаштириб, ўз дизайнларининг муваффақиятини тахмин қилишади. Ушбу парадигма янги ғоялар ва ихтироларни яратиш ва амалга ошириш учун самарали бўлиб чиққан. Лойиҳалашга асосланган парадигма мумкин бўлган дизайнларнинг чегараларини аниқлаш ва алтернативага асосланган парадигма ёрдамида аниқлаш қийин бўлган имконсиз, амалий бўлмаган, самарасиз ёки аксинча ўрин алмашишга асосланган парадигмалар кирувчи дизайнларни йўқотиш учун ишлатилади.

Тузилишга асосланган ҳисоблаш усулида оқсил эволюцияси, функцияси, барқарорлиги ва функционаллигини ҳисобга олган ҳолда ҳисоблаш ёки математик асос тузилади. Кейин мўлжалланган оқсиллар экспериментал равишда уларнинг ўзига хос функциялари учун текширилади. Агар ишлаб чиқилган оқсиллар ушбу хусусиятларнинг барчасини намоиш қилса, унда математик модел ёки рамка оқсилнинг моҳиятини тубдан қамраб олиши мумкин деган хулосага келиш мумкин. Бошқа томондан, агар экспериментлар натижа бермаса, унда янги ҳаётий оқсилни ҳисоблаш йўли билан лойиҳалаштиришнинг якуний мақсадига хизмат қиладиган янги моделни ўзгартириш ва яратишдаги муваффақиятсизликлардан керакли маълумотларни ўрганиш мумкин.

Шундай қилиб, нолдан оқсил дизайни табиий оқсиллар ўз функцияларини қандай амалга ошириши ҳақидаги билимларимизни текширишнинг энг аниқ усули ҳисобланади. у ҳолда математик модел ёки рамка оқсил моҳиятини тубдан қамраб олиши мумкин деган хулосага келиш мумкин. Бошқа томондан, агар тажрибалар натижа бермаса, модификациялаш ва янги моделни яратишдаги муваффақиятсизликлардан ўрганиш мумкин, бу охир-оқибатда янги ҳаётий оқсилни ҳисоблаш йўли билан лойиҳалаштиришга хизмат қилади.

Яхшиланган функционал ёки янги дастурларга эга бўлган оксиллармуҳандислигига экспериментал равишда катта мутант кутубхоналарини скрининг қилиш орқали эришилди. Бироқ, бу оксилларнинг аксарияти лойиҳалаш тамойилларини сон жиҳатидан таъминлай олмайди ва / ёки керакли функцияни қўллаб-қувватловчи структуравий хусусиятларни тушунмайди. Ҳисобланган протеин дизайни бу камчиликларни енгишга ёрдам берди.

Ишончли таркибий башаротлаш, берилган шароитларда оксилнинг барқарорлиги ва молекулалари орасидаги ўзаро таъсир (оксил-протеин муносабатлари ва ДНК-оксил муносабатлари оксилларни ҳисоблаш йўли билан лойиҳалаштириш услуги биотехнология ва биотиббиде тез ривожланаётган тенденциялардан бири бўлиб қолди. Бундан ташқари, ҳисоблаш орқали оксил дизайн, масалан, янги биокатализатор дизайнини ишлаб чиқишда маррага эришилган нотабиий молекулалар учун биосенсорлар ишлаб чиқишда, боғланиш аффинлиги яхшиланган оксилларни қайта лойиҳалаштиришда юқори спецификликка эга боғланишли оксилларни қайта лойиҳалаштириш ва биологик бўлмаган кофакторларни боғлашга қодир бўлган оксилларнинг дизайнида муваффақият қозонилган (расм).



51-расм. Ҳисоблаб чиқилган тузилмалар ва ферментлар. (А) Атом даражасидаги аниқлик билан янги Top7 глобулар оксил катлами. (Б) ишлаб чиқилган SspB адаптер оксили. (С) ДНК билан боғланувчиқайта ишлаб чиқилган эндонуклеаза. Қайта ишлаб чиқилган фермент, табиий эндонуклеаза билан таққосланадиганда мақсадли дискриминация даражаси билан, ёввойи турдаги ферментга қараганда тахминан 10,000 марта самаралироқ сайтни таниб боғланади ва кеса олади. (Д) TIM-barrel scaffold рамкаси ичида яратилган янги ретро-алдол ферменти .

Фермент дизайни нафақат табиий аналоглари маълум бўлмаган катализаторларнинг *de novo* (оддий молекулалардан муракааб молекулаларнинг синтез бўлиши, лотин тилидан таржима қилинганда “*de novo* “yangi” маъносини беради, лекин “яна”, “нолдан бошлаб” деган маъноларни англатади)дизайнигина эмас, балки саноат органик синтези ва метаболик муҳандислик каби биотехнологик соҳаларда бўлган кўп функцияли ферментларни лойиҳалашда ҳам кенг қўллаш доирасига эга бўлиши мумкин.

Рационал ҳисоблаш дизайни

Биокатализаторларни нолдан яратиш олимлар ва муҳандисларга бир қатор турли хил кимёвий реакциялар учун синтетик ферментларни яратишга имкон беради, масалан, ретро-алдол реакцияси ва Кемп элиминацияси. Шунингдек, у оксилларнинг тузилиши ва функцияларининг мураккаблигини асосий тушунчамиз учун синов майдончасига айланади.

Ҳисоблаш оксил дизайни оксил асосий занжирининг координаталаридан бошланади ва магистрал геометрияни барқарорлаштириш учун мақбул бўлган аминокислоталарнинг кетма-кетликлари ва геометрияларини аниқлаш учун куч майдонидан фойдаланилади. Ҳатто кичик оксиллар учун ҳам мумкин бўлган кетма-кетликлар сони яхшилаб излаш мумкин бўлган кўрсаткичлардан анча юқори бўлади.

Оптимал ечимларни топиш учун кучли қидирув алгоритмларини ишлаб чиқиш соҳага катта туртки бўлади. Ҳисобланган оксил дизайни таркибий башоратлар (структуравий прогнозлари) ўзаро боғлиқлигини ва экспериментал барқарорликни талаб қилади. Сунъий ферментлар турли даражадаги ҳисоблаш таъсирида ишлаб чиқилган бўлиб, улар таркибига *de novo* ферментлар киради, бу ерда ҳам оксилларнинг топологияси, фаол нуқтаси ҳам нолдан қурилган бўлади.

***De novo* фаол сайт(нуқта) дизайни**

Аминокислоталар қолдиқларини мавжуд бўлган каркас (scaffold) жойларига фаол жой қолдиқлари кўринишида киритиш ферментлар катализини ҳисоблаш учун мўлжалланган. Ферментларнинг ушбу фаол жой қолдиқлари ўтиш ҳолатини барқарорлаштириш орқали активизация тўсиғини пасайтириш орқали кимёвий реакцияларни кучайтириш учун жавобгардир. Фаол майдонда муҳим кучларни аниқ моделлаштириш квант механик (КМ) ҳисоб-китобларни талаб қилади.

Ўтиш ҳолатига маҳкам боғланиб, функционал гуруҳларнинг керакли геометриясини сақлаб туришга қодир потенциал боғловчи чўнтаклар турли хил оксил скафолдларда аниқланади.

Геометрияга асосланган идентификациядан фойдаланиб, ўтиш ҳолати боғланиш жойи билан мос келадиган ҳолати ва каталитик ён занжирлар оптималлаштирилади. Ва ниҳоят, ўтиш ҳолатини қаттиқ боғлаш учун қолган қолдиқлар ишлаб чиқилган ва дизайнлар ўтиш ҳолатини боғлайдиган энергия ва каталитик геометрия асосида тартибланган. Бир вақтнинг ўзида тузилиш ва катализ дизайни сунъий ферментлар кўламини кенгайтиришни ваъда қилса-да, бу соҳа ҳали бошланғич босқичидадир.

Ҳисоблаш техникаси оксиллар ичига янги металл мажбурий сайтлар дизайни учун ишлатилган. Турли хил кислород оксидланиш-қайтарилиш кимёвий моддаларига эга бўлган оксил металлоферментлар металлнинг асосий координацион соҳаларидан бирини оксил билан қопланмаган ҳолда қолдириш натижасида ҳосил бўлган.

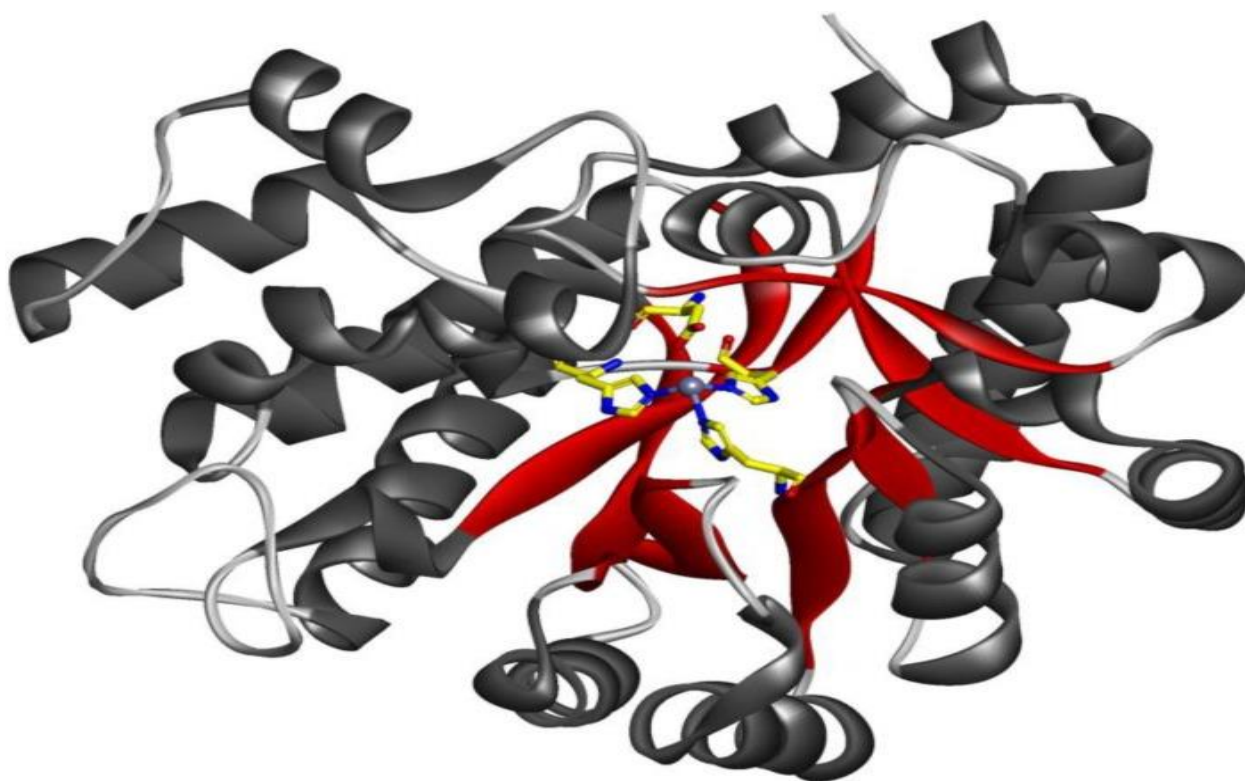
Металлларнинг хилма-хил ва кучли кимёси металлопротеин дизайнини ферментлар дизайнига истиқболли ёндашувга айлантиради. Дастлабки ишларда темирни диоксиген билан боғланган бирламчи координацион сфера билан моделлаштиришни ўз ичига олган ва тиоредоксин катламида бир қатор металлопротеидлар ишлаб чиқилган.

Ушбу оксиллар экспериментал равишда темирни боғлаб туриши кўрсатилган ва турли хил кислородли кимёвий моддаларни катализ қилган. Гистидин-катализланган *n*- нитрофенилацетат (PNPA) гидролизининг юқори энергетик ҳолати қатор занжир ротамери сифатида Bolon ва Mayo томонидан моделлаштирилган. Улар каталитик антикорларни лойиҳалашда ишлатиладиган усулга ўхшаш усулни қўллашди *Escherichia coli* *тиоредоксини* қулай экспрессион хусусиятлари, термодинамик барқарорлиги ва ҳисоблаш дизайнида муваффақиятли натижага эга бўлганлиги сабабли скафолда сифатида танланган.

Ушбу реакцияни ҳисоблаш йўли билан моделлаштириш учун PNPA билан ковалент равишда боғланган гистидиндан ташкил топган композит ён занжир киритилган ва конформацион равишда намуна олинган. Субстратни боғлаш ва таниб олишни осонлаштириш учун His-PNPA, майдонига қўшни аминокислоталарнинг аланин билан мутациясига рухсат берилган. His-PNPA ва унинг атрофидаги ён занжирларнинг конформациялари Dead End Elimination ёрдамида оптималлаштирилди.

Бунинг ортидан энг яхши баҳоланган иккита номзод - протозимлар дизайни (PZD) 1 ва PZD2. PZD2 синтези бошланган. PZD2 катализланмаган реакция ва субстрат концентрациясининг ортиши билан тўйинган кинетикага нисбатан сезиларли даражада яхшиланишларни намойиш этган. Дастлаб ушбу ҳисоблаш усуллари триозофосфатизомеразани лойиҳалаштириш учун татбиқ этиш муваффақиятиз бўлиб чиққан бўлса-да, ушбу тадқиқотларда илгари сурилган кўплаб муҳим ғоялар яқинда кимёвий машҳур сунъий ферментларнинг муваффақиятли дизайнига киритилган.

Яқинда функционал жиҳатдан ҳар хил тўпламдаги битта ядроли таркибида рух бўлган металлофермент скафолд тўпламидан бошлаб органофосфат гидролазани лойиҳалаштириш стратегияси ишлаб чиқилди. Органофосфат гидролиза фаоллигини ҳисоблаш дизайни учун шаблон сифатида таркибида рух бўлган фермент бўлган ядроли бактериал органофосфат гидролаза танланган. Рухни ўз ичига олган моно-ядроли фаол участкаларни ҳисоблашда аденозин деаминаза таркибидаги мутационлар мажмуаси муваффақиятли аниқланди, бу унга мақсадли фосфат гидролиза фаоллигини беради (52-расм). Деаминазада органофосфат гидролиз фаоллигининг пайдо бўлиши учун фақат бир вақтнинг ўзида тўртта мутациялар зарурлиги аниқланди. Сичқоннинг таркибида рух сақловчи аденозин деаминазаси модели ишлаб чиқилган бўлиб, каталитик самарадорлиги ($k_{\text{кат}} / K_m$) $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ бўлган фаоллик билан органофосфат гидролизини катализ қилди, бу эса ушбу фаолликнинг одатдагидан 10^7 -мартадан юқори бўлганлигини англатади.



52-расм. Органофосфат гидролазанинг ҳисоблаш дизайни. Сичқоннинг таркибида рух бўлган PT3.1 аденозин деаминазаси конструкция қилинган, каталитик қолдиқлар сарик рангда берилган.

Ҳисоблаш ишлари тараққиёти билан, фаол сайтларни лойиҳалаш рационал, интуитив стратегиялар ёрдамида ривожланиб бораверади. Протеин ва субстрат муҳандислиги ёрдамида эстераза фаоллиги одам карбонат ангидрази (HCAIII) га муваффақиятли киритилди. Бензазулфонамид сақловчи молекулаларга (HCAIII) нинг яқинлиги, субстратни моделлаштириш учун шундай ишлатилганки, қайчили боғланиш оқсилнинг ички тирқишида жойлашган. Олдинги *de novo* спирал-ҳалқа-спирал конструкцияларидаги His диадани улаш натижасида ёввойи турга нисбатан эстераза фаоллиги ошган HCAIII варианти пайдо бўлди. Ушбу ёндашувларнинг умумий қўлланилиши келажакдаги қизиқарли натижаларни, шу жумладан табиий ферментлар эриша олмайдиган реакцияларни катализлаш учун оқсилларни лойиҳалаштириш қобилиятини тахмин қилади.

Ҳисоблаш воситалари ва *de novo* да ферментларини лойиҳалаш Компьютерда оқсилларини лойиҳалаш воситалари бугунги кунгача жуда кўп функцияга эга бўлган муҳандислик оқсиллари учун фойдалидир.

Ушбу муваффақиятларнинг аксарияти аслида юқори аниқликдаги кристалли конструкцияларда кўринадиган магистрал конформацияларни сақлайдиган ва фақат ён занжирларни қайта тиклашга йўналтирилган асосий магистрал ёндашувларга таянади.

Ҳисоблаш оқсилларини лойиҳалаш дастурлари одатда иккита асосий компонентни ўз ичига олади: маълум бир аминокислота кетма-кетлиги берилган искала ва кетма-кетликни, шунингдек магистрал ва ён занжир конформацияларини намуна қиладиган қидирув функциясига қанчалик мос келишини баҳолаш учун энергия ёки скорлама функцияси. Оқсилларни ишлаб чиқариш учун энергия функциялари кўпинча жисмоний ва билимга асосланган атамаларнинг комбинациясини ўз ичига олади.

Адабиётлар

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962203>

Саволлар

1. Рационал ҳисоблаш дизайни нима?
2. *de novo* фаол сайт(нуқта) дизайни нима?
3. Ҳисоблаш воситалари ва *de novo* да ферментларини лойиҳалаш деганда нимани тушунаси