

M.G.SAFIN, B.S.ALIKULOV, F.A.RUZIEV

ENZIMOLOGIYA

fanidan laboratoriya va amaliy mashg'ulotlar

*“Biokimyo – 5A420109”, “Biotexnologiya – 5A420104” mutaxassisliklari
magistrlari uchun uslubiy qo'llanma*

SAMARQAND - 2012

ANNOTATSIYA

Mazkur uslubiy qo'llanma "Biokimyo – 5A420109" va "Biotexnologiya – 5A420104" mutaxassisliklari bo'yicha magistrLAR tayyorlashga oid davlat ta'lim standartlari (DTS) va unga mos ravishda ishlab chiqilgan namunaviy dastur talablariga muvofiq tarzda yaratilgan. Unga "Enzimologiya" fanidan laboratoriya va amaliy mashg'ulotlarni o'tish bo'yicha namunaviy va ishchi dasturlarda belgilab qo'yilgan barcha mavzular kiritilgan. Mavzular reja asosida yoritilgan bo'lib, har bir laboratoriya va amaliy ishlar nazariy hamda amaliy qismlarni o'z ichiga olgan.

Kirish

Fermentlar – oqsil tabiatiga ega boʻlgan biokatalizatorlar boʻlib, ular hayotiy jarayonlarning kechishida hosil boʻladi, moddalar almashinuvida ishtirok etish tufayli muhit va organizm oʻrtasidagi dialektik birlikni taʼminlaydi. Hayvonlar, oʻsimliklar va mikroorganizmlarda sodir boʻladigan hayotiy jarayonlarning kechishida fermentlarning ahamiyati beqiyosdir. Bu makromolekulalar shunday muhim hayotiy jarayonlarni taʼminlaydi-ki, ular orqali irsiy axborotning koʻchirilishi, bioenergetika, biomolekulalarning sintezi va parchalanishi kabilar amalga oshiriladi. Bu makromolekulalarni chuqur oʻrganish orqali hozirgacha sir boʻlib kelayotgan va hayot deb nomlangan keng qamrovli jumboq hodisalar elementlarini mohiyatini birin-ketin ochish imkoniyati yaratildi. Fermentlar va enzimologiyaning biologiya va tibbiyotdagi ahamiyati beqiyosdir. Fermentlarni oʻrganish genetik apparat ishini, membranalar faoliyatini, oziqlanish hamda makromolekulalar xususiyatlarini, hujayra ichidagi metabolizmni, kataliz, fiziologik boshqariluv, bakterial achish, energiyaning almashinuvi, biosintez jarayonlari va farmakologik taʼsir mexanizmlarini tushuntirishda muhim ahamiyatga ega boʻladi.

Eng avvalo shuni qayd etish joizki, biologiya – bakalavr akademik darajali mutaxassis, ayniqsa shu akademik daraja negizida magistratura boʻlinida tayyorlangan “*Biokimyo* – 5A420109”, “*Biotexnologiya* – 5A420104” boʻyicha mutaxassislar enzimologiyaga tegishli barcha bilimlarni toʻliq oʻzlashtirib olishlari, kasbiga oid muammolar yechimini topishda ulardan samarali foydalanishga oid koʻnikma va malakalariga ega boʻlishlari lozim boʻladi.

Ushbu uslubiy qoʻllanma “*Biokimyo* – 5A420109” va “*Biotexnologiya* – 5A420104” mutaxassisliklari boʻyicha magistrlar tayyorlashga oid davlat taʼlim standartlari (DTS) va unga mos ravishda ishlab chiqilgan namunaviy dastur talablariga toʻliq javob beradi. Samarqand davlat universitetining fiziologiya, genetika va biokimyo kafedrasida magistr biokimyogar va biotexnolog mutaxassislar tayyorlashda orttirilgan tajribalar va kafedrada mavjud boʻlgan jihozlar, reaktivlar va boshqa imkoniyatlarni hisobga olgan holda ushbu “Enzimologiya fanidan laboratoriya va amaliy mashgʻulotlar” deb nomlangan uslubiy qoʻllanma yaratildi.

Uslubiy qoʻllanmada fanga tegishli boʻlgan nazariy materiallarni oʻzlashtirilishini hisobga olgan holda zamonaviy enzimologiyaning amaliy jihatlariga oid maʼlumotlarni ancha ixcham, aniq boʻlib, ularni mumkin qadar tushunarli tarzda bayon qilishga harakat qilingan. Materiallarni oʻzlashtirish samaradorligini oshirish maqsadida qoʻllanmada biokimyoviy jarayonlarning kechishini ifodalovchi tenglamalar, formulalar, jadval, rasmlar keltirilgan boʻlib, ular tajribalarni olib borilishiga tegishli boʻlgan yoʻl-yoʻriqlar va matnlar bayoni bilan uygʻunlashtirilgan.

Ushbu uslubiy qoʻllanma oʻzbek tilida ilk bor yaratilayotganligi sababli unga tegishli boʻlgan barcha tanqidiy mulohazalar, xohish va takliflar mualliflar tomonidan mamnunlik bilan kutib olinadi.

1. FERMENTLARNI O`RGANISH USHLUBLARI

Fermentlar oqsil tabiatli makromolekulyar moddalar bo`lib, tirik organizmlarda ular juda ham kam miqdorda ajraladi. Ularni ajratib olish, tozalash, tozalik darajasi, molekulyar og`irligi, tuzilishi, tarkibi va xossalarini o`rganish juda keng qamrovli uslubiy yondashuvlarni amalga oshirishni talab qiladi. Umuman olganda, enzimologiyaning amaliy jihatlarini o`rganishni ikki bo`limga ajratish mumkin.

Uning birinchi bo`limi, fermentlarni ajratib olish va tozlash uslublaridan iborat. Bu uslublar fermentlarni to`qimlardan ekstraksiyalash, tuzli va organik erituvchilar yordamida cho`ktirish, qizdirish orqali cho`ktirish, kolonkalarda o`tkaziladigan ion almashinuvi xromotogafiyasidan foydalanish asosida tozalash, kristallizatsiyalash, qayta kristallizatsiyalashdan tashkil topadi va umuman olganda fermentlar xossalarini o`rganishga tegishli barcha bajariladigan ishlar oqsillar kimyosi uslublaridan foydalanishni hisobga oladi.

Enzimologiya amaliyotini ikkinchi – “Fermentlar faolligini boshqariluv” bo`limi subhujayraviiy elementlarni ajratib olish, disk-elektroforez usulida to`qimalarning izoenzim spektrini o`rganishni hisobga oladi. Bu bo`limga tegishli amaliy darslarda subhujayraviiy darajada fermentlar faolligini boshqariluv, izoenzimlarning xossalari, fermentlarning genetik xossalariga metabolitlarning ta`sirini o`rganishga oid laboratoriya ishlari bajariladi. Toza holda ajratib olingan yoki subhujayraviiy fraksiyalar tarkibidagi ferment preparatlarini tavsiflashda poliakrilamid gelda disk-elektroforez o`tkazish, muayyan ferment faolligini aniqlash borasida optimal sharoitlarni (oqsil, substrat konsentratsiyasi va koferementlar) tanlash lozim bo`ladi. Enzimologiyaning bu bo`limining amaliyotda toza holda ajratib olingan va subhujayraviiy elementlar tarkibidagi ferment preparatlarini fermentativ kinetik elementlari: reaksiyaning dastlabki va maksimal tezligi; substrat va fermentlar uchun Mixaelis konstantasi; faollikning pH optimumi; ferment ta`sirini maxsusligi; faollovchilar va ingibitorlarning ta`sirini aniqlash ishlari bajariladi.

1-LABORATORIYA ISHI:

Mavzu: Fermentlarni preparativ ajratib olish, tozalash va xossalarini o`rganish

Fermentlarni jaratib olish bilan bog`liq bo`lgan barcha ishlar sovuq xonalarda olib borilishi, ammo unda ajratib olish uchun foydalaniladigan eritmalar muzlamasligi lozim. Ko`p hollarda eritmalarini bidistillangan suvdan foydalanish asosida tayyorlanadi. Oqsillarni fraksiyalashda ishlatiladigan tuz eritmalarini fermentlarning ingibitorlari bo`lgan og`ir metallar tuzlaridan xolis bo`lishi lozim. Shuning uchun bu tuzlar tarkibida EDTA bo`lgan eritmada eritilib, so`ng shu eritmalaridan qaytadan perekristallizatsiya qilinadi. Oqsilli eritmalarini fraksiyalashda yanchilgan tuz kukunini ekstraktga kam-kam miqdorda qo`shib boriladi. Fraksiyalashda qo`llaniladigan suyuq reaktivlar oqsilli aralashmalarga tomchilab qo`shiladi.

Oqsilli eritmalarini arashtirganda denaturatsiyaga olib keluvchi ko`pik hosil bo`lishini oldini olish yo`lini tanlab, aralashtirish jarayonida mexanik yoki magnit aralashtirgichli qurilma-asboblardan foydalaniladi.

Oqsillarni organik erituvchilardan foydalanish asosida fraksiyalanganda bajariladigan ishlarni harorat 0 °C dan past bo`lgan chegarada o`tkaziladi. Oqsilli eritmalaridan fermentlarni “tuzlash” yo`li bilan cho`ktirishda eng ko`p foydalaniladigan tuzlar jumlasiga ammoniy sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kiradi. Bu tuzning oqsil eritmasini to`yintirish uchun kerak bo`ladigan miqdoriy ko`rsatkichini quyidagi formula yordamida aniqlanadi:

$$B = \frac{0,515 \cdot V \cdot (S_2 - S_1)}{1 - (0,272 \cdot S_2)}$$

Bu yerda: B ml hajmda S₁ darajadagi to`yinishga ega bo`lgan eritmaning S₂ darajasigacha to`yintirish uchun kerak bo`lgan gramm hisobidagi ammoniy sulfat miqdori B harfi bilan belgilanadi. S₁ va S₂ ni konsentratsiyasi 3,8 M ga teng bo`lgan ammoniy sulfatning 0 °C da to`yinishiga mos keladigan nisbiy birlik bilan ifodalanadi. Shu maqsadda maxsus jadavaldan ham foydalaniladi (1-Jadval).

1-Jadval

Turli xil foizlarda to'yinish uchun 1 litr eritmaga (25 °C da) qo`shiladigan quruq hol dagi ammoniy sulfat tuzi miqdorlari
(g hisobida)

%																				
	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
35							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
40								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
45									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
50										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
55											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
60												33	67	103	141	179	220	264	307	353
65													34	69	105	143	183	227	269	314
70														34	70	107	147	190	232	275
75															35	72	111	153	194	237
80																36	74	115	155	198
85																	38	77	117	157
90																		39	77	118
95																			38	77
100																				39

Quruq holdagi ammoniy sulfatning zaruriy darajadagi to'yinishini ta'minlash uchun kerak bo'ladigan miqdori 1-Jadvaldagi ko'rsatkichlardan aniqlanadi.

Unda foiz hisobida to'yinish uchun 1 litr eritmaga (25 °C da) qo'shiladigan quruq holdagi ammoniy sulfat tuzi miqdori keltirilgan. Ammoniy sulfatni 25 °C da to'yinishini ta'minlaganda, uning konsentratsiyasi 4,1 M bo'ladi. Bunga erishish uchun 1 litrga 767 g tuz qo'shish kerak bo'ladi. Cho'kmani eritlgandan so'ng oqsil eritmasini ammoniy sulfat bilan to'yinish darajasi quyidagi formula bilan aniqlanadi:

$$A = \frac{\Delta n}{V} \cdot S$$

Bu yerda: A – cho'kmani eritlgandan keyingi ammoniy sulfat konsentratsiyasi;

V – cho'kmani eritlgandan keyingi umumiy hajmi, l hisobida;

Δn – cho'kmani eritish hisobiga oshgan hajm, l hisobida;

S – oqsilni cho'ktirish jarayonidagi to'yinish.

Nessler reaktivi yordamida ammoniy sulfat konsentratsiyasini aniqlash

Oqsil eritmasidagi ammoniy sulfatning konsentratsiyasini aniqlashning aniqlik darajasini yanada ko'tarish uchun NH_4^+ ionini Nessler reaktivi yordamida kolorimetrik yo'l bilan aniqlash lozim bo'ladi.

Kerakli reaktivlar:

1. Qayta kristallangan va qayta vakuumli eksikatorida P_2O_5 ustida quritilgan ammoniy sulfatdan tayyorlangan standart eritma.
2. 0,002 n H_2SO_4 eritmasi.
3. Nessler reaktivi.

Nessler reaktivini tayyorlash. Amaliy tadqiqotlarda Nessler reaktivini tayyorlashning ikkita uslubi mavjud.

Nessler reaktivinin tayyorlashning birinchi uslubi. Kolbaga 20 ml distillangan suv solib, unda 30 g KI eritiladi. Aralashmaga 22 g yod kristali qo'shib, to'liq erib ketgunicha aralashtiriladi. Eritmadan 1 ml ajratib olinadi va alohida probirkaga solinadi. Qolgan eritmani qalin devorli shisha idishga o'tkazib, ustiga 30 g

toza simob solinadi va vodoprovod suvi oqimida sovutilib, yaxshilab aralashtiriladi. Aralashmadagi sariq rang yo`qolishi bilan aralashtirilish to`xtatiladi va eritma xona haroratida sovutiladi. Bundan keyin aralashmadagi yod miqdori ko`rsatkichi aniqlanadi. Bunda 1 ml 1 % li kraxmal eritmasiga bir tomchi cho`kma usti suyuqligi tomizilganda aralashma havorangga bo`yaladi. Agar bu rang hosil bo`lmasa, asosiy eritmaga bir tomchi oldin probirkaga olib qo`yilgan eritmada tomiziladi va aralashtiriladi. Biroz kutib turiladi, yana kraxmal yordamida sinab ko`riladi. Bu ishni namuna kuchsiz ko`k-havorang hosil bo`guniga qadar takrorlanadi va keyin asosiy eritmani hajmini distillangan suv yordamida 200 ml ga yetkaziladi hamda aralashma tingunga qadar saqlanadi. So`ng cho`kma usti suyuqligi dekantatsiya qilinadi va oldindan 975 ml 10 % li NaOH solib qo`yilgan idishga o`tkaziladi. Zarurat bo`lganda aniqlash ishini o`tkazishdan oldin aralashma filtrlanadi.

Nessler reaktivini tayyorlashning ikkinchi uslubi. Kolbaga 10 g KI kukunidan solib, 15 ml distillangan suvda eritiladi va unga 15 g HgI_2 qo`shib yaxshilab aralashtiriladi hamda ustiga yana 80 ml NaOH ning 50 % li (tarkibida karbonat kislota tuzlari bo`lmagan) eritmasi qo`shiladi. Aralashma yaxshilab aralashtirilib, hajmi tarkibida karbonat tuzlari bo`lmagan distillangan suv qo`shish orqali 500 ml ga yetkaziladi. Aralashma bir kecha-kunduz qorong`u joyda saqlangandan keyin filtrlanadi. Tayyor Nessler eritmasi tiniq bo`lishi lozim.

Ish tartibi: Namunadan 0,1 ml olib, 50 ml li o`lchov kolbasiga solinadi va  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ning 0,002 n eritmasi yordamida hajmi o`lchov chegarasiga yetkaziladi. Aralashma yaxshilab aralashtirilgandan keyin undan 1 ml olib yana 45 ml 0,002 n H_2SO_4 solinib, 50 ml li o`lchov kolbasiga o`tkaziladi. Aralashma yaxshilab aralashtirilgandan keyin 1,5 ml Nessler reaktivi qo`shiladi hamda hajmi 0,002 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  yordamida o`lchov chegarasiga yetkaziladi. Aralashma yaxshilab aralashtirilgach, 5 minut davomida xona haroratida qo`ldiriladi va yashil svestofiltrda kolorimetrlanadi. Bir yo`la parallel namunalarda ham aniqlash ishlari o`tkaziladi.

Ammoniy sulfatning standart eritmasini har xil miqdorlarda olib xuddi shu yo`sinda ishlov beriladi. Har xil miqdoriy ko`rsatkichlardagi standart eritmalar

asosida kalibrlangan egi chiziq chiziladi. Namuna tarkibdagi oqsil konsentratsiyasi 10 % gacha va EDTA konsentratsiyasi 1 % gacha bo'lgan sharoit aniqlashga xalaqit bermaydi va olingan ma'lumotlar haqiqatga yaqin bo'ladi. Tegishli to'yinish darajasiga erishish uchun kerak bo'ladigan suyuq reagentlar (spirt, atseton, ammoniy sulfat eritmasi) ning miqdori:

$$V = V_1 * (C_2 - C_1) / (1 - C_2)$$

formula asosida hisoblanadi.

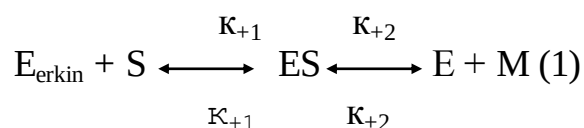
Bu yerda: V – talab qilinadigan eritma hajmi, ml hisobida; V_1 – ishchi eritma hajmi; C_1 – reagentning dastlabki konsentratsiyasi; C_2 – reagentning oxirgi konsentratsiyasi.

Ko'p holatlarda ajratib olinadigan ferment preparatlarini tozalash uchun selluloza yoki sefadeks bilan to'ldirilgan kolonkalarda o'tkaziladigan xromotografiyadan foydalanish tavsiya etiladi. Xromotografiya uchun DEAE – selluloza, KM – selluloza yoki har xil rusumli sefadekslardan foydalaniladi. Bu ionalmashtiruvchilardan foydalanishda ular uchun maxsus ishlab chiqilgan yo'riqnomalar me'yirlariga mos keladigan uslublar asosida ishlov beriladi.

2-LABORATORIYA ISHI:

Mavzu: Fermentativ reaksiyalar kinetikasi

Fermentativ reaksiyalarning ta'siri substrat konsentratsiyasiga bog'liq. Substrat konsentratsiyasi ancha yuqori ko'rsatkichga erishganda va uning konsentratsiyasi yanada oshirilishi reaksiya tezligiga ta'sir etmay qolganda fermentning faollik markazlari substrat bilan to'yingan hisoblanadi. Bu sharoitda reaksiya tezligi maksimal bo'ladi. Fermentning substrat bilan ta'sirlashib, ferment-substrat kompleksini hosil bo'lishini:



tenglama orqali hisoblab topiladi.

Bu yerda: E_{erkin} – erkin ferment; S – substrat; ES – ferment-substrat kompleksi; M – mahsulot.

Reaksiyaning dastlabki tezligi (V_0) ferment-substrat kompleksi konsentratsiyasiga bog'liq, ya'ni:

$$V_0 = k_3[ES] \quad (2).$$

Standart sharoitda, ya'ni $[ES]$ ning hosil bo'lishi va parchalanish tezligi bir xil bo'lganda:

$$d[ES] / dt = 0 = k_1 [E_{\text{erkin}}] [S] - (k_2 + k_3) [ES]$$

$$k_1 ([E_{\text{umumiy}}] - [ES])[S] - (k_2 + k_3)[ES] = 0$$

$$k_1 [E_{\text{umumiy}}][S] - k_1[ES][S] - (k_2 + k_3)[ES] = 0$$

$$[ES] = [E_{\text{umumiy}}][S] / [S] + (k_2 + k_3) / k_1 \quad (3) \text{ kelib chiqadi.}$$

$(k_2 + k_3) / k_1 = k_m$ kattalikni Mixaelis konstantasi deb yuritiladi. Dastlabki reaksiya tezligini aniqlash uchun (3) tenglamani ikkala qismi ham k_3 ga ko'paytiriladi. Agar $[ES]$ ni k_3 ga (2) ni V_0 ga almashtirsak:

$$V_0 = k_3[E_{\text{umumiy}}][S] / [S] + k_m \quad (4)$$

$$V_0 = k_3[E_{\text{umumiy}}] * 1 / (k_m/[S]) + 1 \quad (5)$$

kelib chiqadi. Tenglama (5) substratning barcha konsentratsiyalarida reaksiyaning boshlanishidagi tezligi ferment konsentratsiyasiga to'g'ri proporsional ekanligini ko'rsatadi.

Xuddi shu tenglamadan ko'rinib turibdi-ki, reaksiyaning boshlanishidagi tezligi substratning konsentratsiyasi kattaligiga ham, k_m kattaligiga ham bog'liq bo'ladi. Agar substrat konsentratsiyasi k_m ga nisbatan kam bo'lsa, unda reaksiya tezligi substratning funksiyasi hisoblanadi. Agar $[S]$ kattaligi k_m kattaligidan katta bo'lsa, unda reaksiya tezligi faqat $[E_{\text{umumiy}}]$ ga bog'liq bo'ladi. Shunday qilib, $[S] > k_m$ bo'lgan sharoitda:

$$V_0 = V_{\text{maks}} = k_3[E_{\text{umumiy}}] \quad (6)$$

bo'ladi.

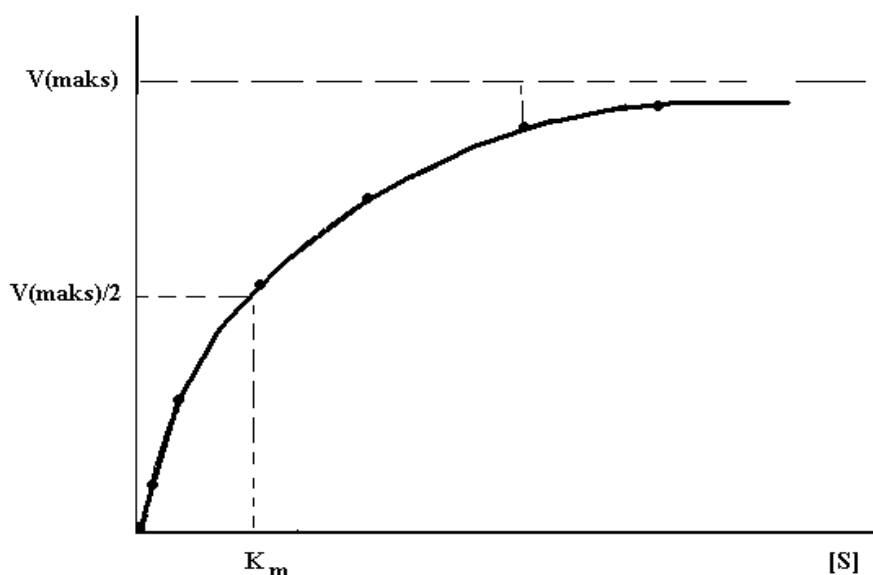
Bu tenglamani (4) tenglamaga qo'yib chiqsak, unda:

$$V = V_{\text{maks}} [S] / [S] + k_m \quad (7) \text{ yoki}$$

$$k_m = [S](V_{\text{maks}}/V_0 - 1) \quad (8)$$

kelib chiqadi.

Tenglamalar (7 va 8) Mixaelis-Menten tenglamalari sifatida ma'lum. k_m miqdoriy jihatdan substrat konsentratsiyasiga teng va mol/litr hisobida ifodalanadi. Maksimal reaksiya tezligini yarmiga teng tezlikni ta'minlaydigan substrat konsentratsiyasi k_m kattalikka ekvivalent bo'ladi (1- Rasm).



1-Rasm. Fermentativ reaksiyalar tezligining substrat konsentratsiyasiga bog'liqligi

Ma'lum sharoitlar (pH, harorat) da muayyan ferment uchun aniqlangan k_m ko'rsatkichi katta amaliy ahamiyatga ega bo'ladi. Lekin Mixaelis konstantasi k_m ferment-substrat kompleksining haqiqiy dissotsatsiya konstantasi deb bo'lmaydi. Ferment-substrat kompleksini dissotsatsiya konstantasi k_2 / k_3 ni k_s deb belgilanadi. Faqat $k_2 > k_3$, $k_m = k_s$ bo'lganda:

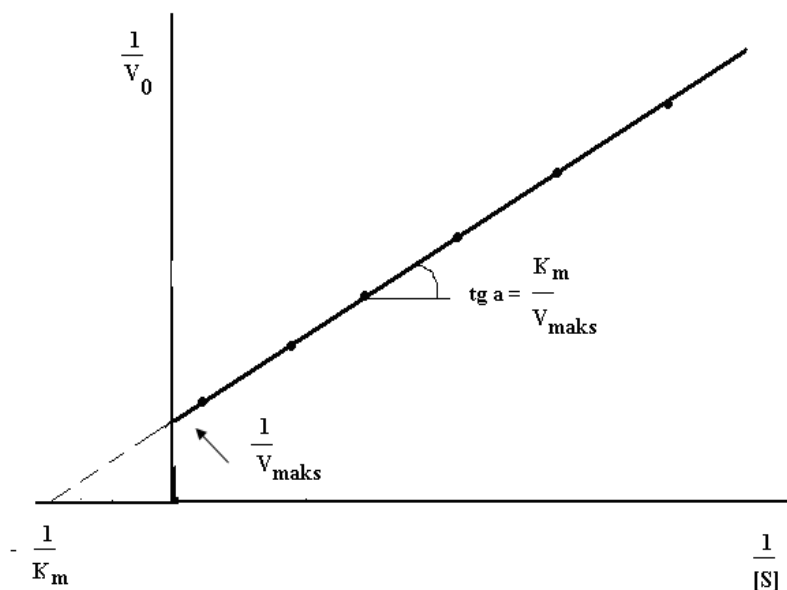
$$k_m = k_s = k_2 / k_3 = [E_{\text{erkin}}][S] / [ES] \quad (9)$$

Shu narsani alohida qayd etish joiz-ki, hamma fermentlarning k_m va k_s ko'rsatkichlari o'zaro yaqin bo'lmaydi. Dissotsatsiya konstantasi teskari bo'lgan kattalik fermentning substratga mos kelish konstantasi hisoblanadi.

Fermentning substratga mos kelish konstantasi qancha yuqori bo'lsa, k_s kattaligi shuncha kam bo'ladi. k_m kattaligini (8) formulaga muvofiq aniqlash mumkin

bo`ladi. Lekin aniqlashning aniqlik darajasini yuqoriligini ta`minlash uchun Mixaelis-Menten tenglamasining chiziqli shaklidan foydalanish talab qilinadi. G.Leynunver va D.Berklar Mixaelis-Menten tenglamasiga asoslanib, ikkilamchi teskari kattaliklar uslubida aniqlashni taklif etdilar (2-Rasm):

$$1/V_0 = (k_m/V_{maks} * 1/[S]) + 1/V_{maks}$$

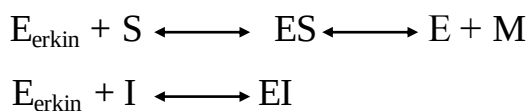


2-Rasm. Ikkilamchi teskari kattaliklarda fermentativ reaksiyalar tezligining substrat konsentratsiyasiga bo`g`liqligi (Leynunver-Berk grafigi)

2-Rasmda ko`rsatilganidek,  $1/[S]$  ning  $1/V_0$  ga bog`liqligini to`g`ri chiziqli ekstrapolyatsiya qilish yo`li bilan absitssa o`qini qisqartirib, k_m va V_{maks} lar hisoblab topiladi.

Har xil ingibitorlar yordamida fermentativ reaksiyalar tezligini o`zgartirish va ingibirlanish qaysi yo`l bilan bo`lib o`tayotganligini aniqlash mumkin. Misol tariqasida qaytar ingibitorlar ta`sirini ba`zi modellarini ko`rib chiqish mumkin.

Raqobatli ingibirlanish:



Bu yerda ingibitor faqat erkin ferment bilan reaksiyaga kiradi va substrat bilan birikkan fermentga birika olmaydi. Mixaelis tenglamasiga binoan raqobatli ingibitor ishtirokida kechadigan fermentativ reaksiya tezligini quyidagi formulaga asoslanib aniqlash mumkin bo`ladi:

$$V_0 = V_{\text{maks}} / ((k_m/[S]) * (1 + [I]/k_i))$$

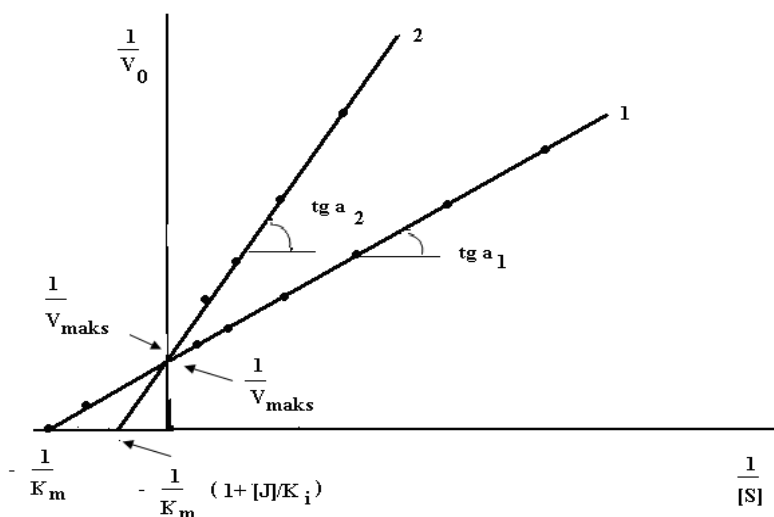
Bu yerda: $[I]$ – ingibitor konsentratsiyasi; k_i – ferment-ingibitor kompleksining dissotsiatsiya konstantasi, u quyidagi formula orqali aniqlanadi:

$$k_i = [E_{\text{erkin}}][I] / [EI]$$

Leynunver-Berk tenglamasi:

$$1/V_0 = k_m/V_{\text{maks}} ((1 + [I] / k_i * 1/[S]) + 1 / V_{\text{maks}})$$

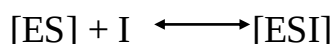
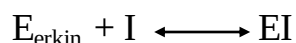
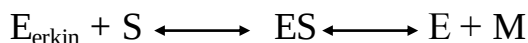
dan foydalanib, chizma tuziladi (3-Rasm).



3-Rasm. Leynunver-Berk koordinatalari reaksiya tezligini substrat konsentratsiyasiga bo`g`liqligiga ingibitorlarning ta`siri

Bu yerda: 1) – ingibitorsiz: $\text{tg } a_1 = k_m/V_{\text{maks}}$; 2) – ingibitor ishtirokida: $\text{tg } a_2 = k_m/V_{\text{maks}} (1 + [I]/k_i)$.

Raqobatsiz ingibirlanish:



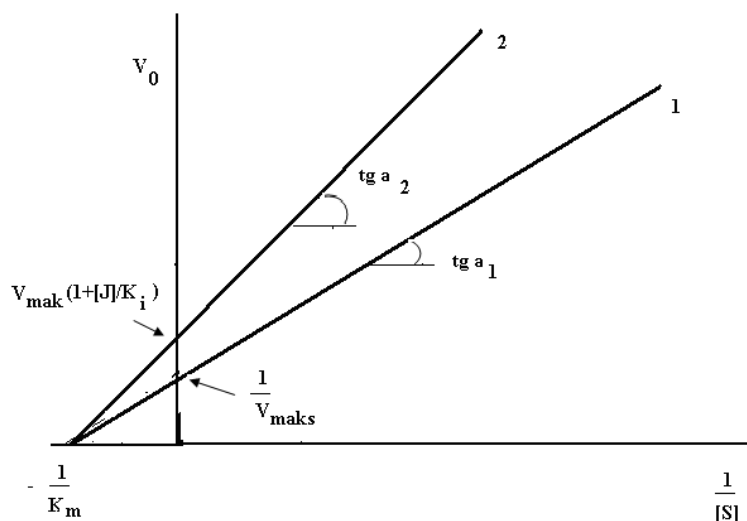
Bu xil ingibirlanishda ferment-ingibitor kompleksi substrat ishtirokiga bog'liq bo'lmagan holda hosil bo'ladi, ya'ni bunda [ES] kompleks nafaol bo'ladi.

Leynunver-Berk tenglamasi raqobatsiz ingibitor ishtirokida boshlang'ich reaksiya tezligini aniqlashda quyidagicha ko'rinishga ega bo'ladi:

$$1/V_0 = (1 + [I]/k_i) * (1/V_{maks} + k_m/V_{maks}[S])$$

$$k_i = [E][I]/[EI] = [ES][I]/[ESI].$$

Leynunver-Berk tenglamasidan $1/V_0$ koordinatalari chegarasidagi kattaliklardan foydalanib, konstantalarning miqdor qiymatlarini topish mumkin (4-Rasm).



4-Rasm. Reaksiya tezligining substrat konsentratsiyasiga bog'liqligiga ingitorlarning (Leynunver-Berk koordinatalaridagi) ta'siri

Bu yerda: 1) – ingibitorsiz: $\text{tg } a_1 = k_m/V_{maks}$; 2) – ingibitor ishtirokida: $\text{tg } a_2 = k_m/V_{maks} (1 + [I]/k_i)$.

Fermentlarni kinetik jihatdan tadqiq qilish ularning substrat bilan o'zaro ta'sirlanish mexanizmlari haqida ma'lumotlarni aniqlash imkonini beradi. Maxsus faollovchilar, ingibirlovchilar, pH va harorat ko'rsatkichlarini o'zgartirish k_m va V_{maks} lar qiymatlarini o'zgarishlarini yuzaga keltiradi. Bu ma'lumotlar fermentning maxsuslik darajasini aniqlashda muhim ahamiyatga ega bo'ladi. Shuningdek, bu

ma'lumotlar hujayrada ferment faolligini boshqarish mexanizmlarini tushunishda alohida ahamiyat kasb etadi.

3-LABORATORIYA ISHI:

Mavzu: Fermentlarning xossalarini o`rganish

Ferment preparatlarini uning solishtirma faolligi orqali, ya'ni mg oqsilga nisbatan faollik birligi miqdori bilan tavsiflanadi. Buning uchun avvalo dastlabki reaksiya tezligi aniqlanadi.

Reaksiyaning dastlabki tezligini aniqlash

Ajratib olingan fermentning miqdoriy ko'rsatkichlarini tavsiflaganda uning faolligini ma'lum chegarada bo'lgan pH, harorat va ion tarkibi kabilarda aniqlanadi. Mixaelis-Menten tenglamasidan ma'lumki, fermentativ reaksiyalar uchun substrat konsentratsiyasi $[S]$ birligini aniqlash muhim ahamiyatga ega bo'ladi. Reaksiyaning dastlabki tezligi ferment konsentratsiyasiga to'g'ri proporsional bo'lganligi sababli reaksiyaning dastlabki tezligi V_0 ni aniq baholaydigan ferment konsentratsiyasini aniqlash muhimdir. Bu masalaning yechimini topishning eng oddiy yondashuvi –bu fermentativ reaksiya jarayonida amaliy jihatdan o'zgarmaydigan darajada substratning yuqori konsentratsiyasidan foydalanish hisoblanadi:

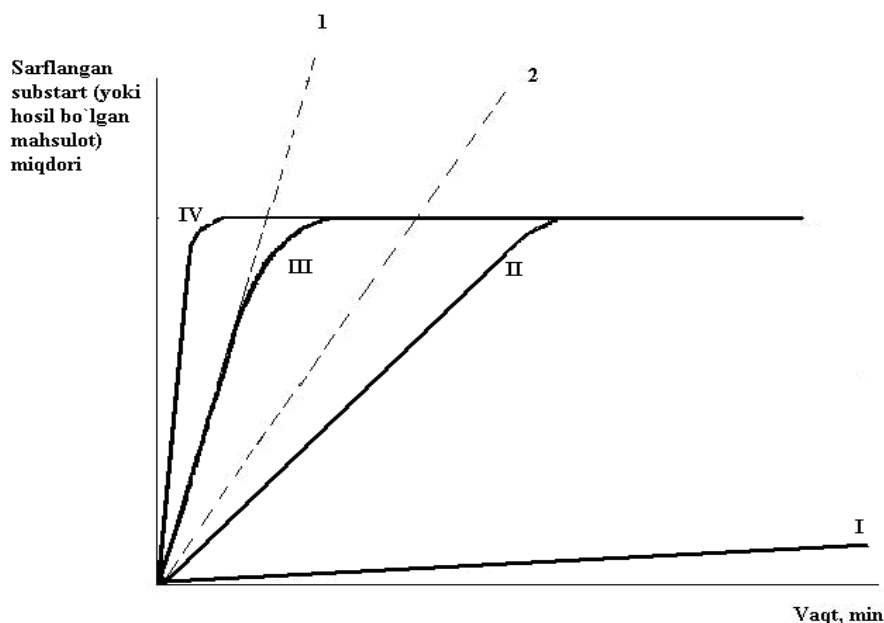
$$S_0 - \Delta [S_t] = [S_0]$$

Bu yerda: $[S_0]$ – substratning dastlabki konsentratsiyasi; $\Delta [S_t]$ – t vaqt birligida substrat konsentratsiyasining o'zgarishi.

Agar substratning past konsentratsiyasi ($[S]=k_m$) dan foydalanilsa, unda reaksiya tezligi asta-sekin susayadi va V_0 ni aniqlashni qiyinlashtiradi. Ferment konsentratsiyasi va substrat konsentratsiyasi o'rtasidagi nisbatlarni o'zgartirish asosida ish yuritib fermentativ reaksiyaning dastlabki tezliigni aniqlashni amalga oshirish mumkin (5-Rasm).

Birinchi holatda (1-Rasm) V_0 ni aniq ravishda aniqlab bo'lmaydi, chunki substratning konsentratsiyasi juda yuqori, ferment konsentratsiyasi esa past. Ferment konsentratsiyasi juda yuqori bo'lganda (2-4-Rasmlar) reaksiya tezligi juda yuqori bo'lganligi uchun V_0 ni aniqlash qiyinlashadi. Fermentativ reaksiyalarning to'g'ri

chiziqli yoki to'g'ri chiziqsizligi haqida xulosa chiqarish uchun tezlikni uzluksiz kuzatish yoki ma'lum vaqt birligida faollikni aniqlash orqali erishish mumkin. Oldindan optimal tezlikka ega bo'lish uchun qancha miqdorda ferment olinish kerakligini taxmin qilib bo'lmaydi (2-Rasm). Bu narsanni har xil darajada suyultirish orqali olib borilgan empirik tajribalar o'tkazish yo'li bilan aniqlash mumkin.

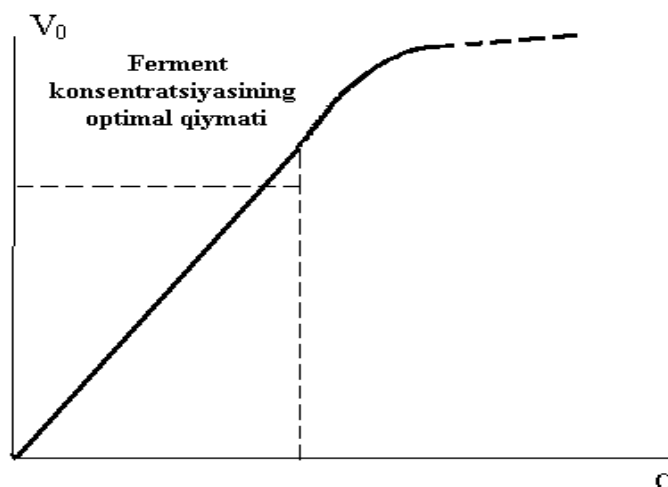


5-Rasm. Ma'lum vaqt birligidagi ferment faolligining o'zgarishi

Bu yerda: 1 – fermentning haqiqiy dastlabki faolligi (II egri chiziq); 2 – fermentning xatoli dastlabki faolligi (IV egri chiziq).

Ish ikki bosqichda olib boriladi. Dastlab namunani 10-50 marta suyultirib, doimiy va maksimal reaksiya tezligini ta'minlaydigan fermentning qaytar konsentratsiyasi topiladi.

Tajribaning ikkinchi bosqichida fermentning doimiy va maksimal tezligini ta'minlaydigan torroq chegaradagi suyultirish darajasi aniqlanadi. Agar fermentativ reaksiyani tezligiga oid sharoit to'g'ri tanlab olinsa, V_0 ning ferment konsentratsiyasiga bog'liqligini chizmada ko'rsatilganidek (6-Rasm), reaksiyaning dastlabki tezligi fermentning konsentratsiyasini chiziqli funksiyasi ekanligi oydinlashadi.



6-Rasm. Fermentativ faollikning ferment konsentratsiyasiga boʻgʻliqligi

Mixaelis konstantasini aniqlash

Substratning har xil toʻyinishda (100, 50, 20, 10 va undan kam boʻlgan miqdor) gi dastlabki reaksiyalari tezligi topiladi. Tajribaning qolgan sharoitlari (pH, harorat, ion konsentratsiyasi) doimiy boʻladi. Olingan tajriba maʼlumotlar asosida dastlabki reaksiya tezligining konsentratsiyasini Mixaelisning ($[S]$ dan V_0 ni) koordinatalari va Leynunver-Berkning ($1/[S]$ dan $1/V_0$ ni) teskari koordinatalari usullaridan foydalanib chizmalar chiziladi. Ular asosida k_m va V_{maks} lar hisoblab topiladi.

Fermentlarga xos umumiy hususiyatlar

Amaliy jihatdan fermentlarga xos boʻlgan umumiy hususiyatlar jumlasiga ularning maxsusligi, termolabilligi, fermentlar faolligining haroratga va muhitning pH koʻrsatkichlariga bogʻliqligi hamda faolliklarining namoyon boʻlishiga faollovchi va ingibirlovchi moddalarning taʼsir etishi kiradi.

Fermentlar faolligining muhit koʻrsatkichi (pH) ga bogʻliqligi

pH ning har xil koʻrsatkichlarida qolgan sharoitlar (ferment konsentratsiyasi, substrat konsentratsiyasi, kofaktorlar, harorat va boshqalar) doimiy boʻlgan holda fermentning dastlabki reaksiya tezligi aniqlanadi. Fermentlarning har xil ion tabiatli sezgirligini hisobga olib bufer eritmalar tanlab olinadi. Fermentativ faollikni pH ning

0,2 chegaradagi kattaligi intervalida aniqlanadi va olingan natijalar bo'yicha dastlabki, maksimal faollik tezliklarining pH ga bog'liqliligi Mixaelis-Menten va Laynunver-Berk tenglamalaridan foydalanilgan holda aniqlanadi.

Fermentlarning maxsusligi

Fermentlarning maxsusligi o'ziga xos xususiyat bo'lib, bu narsa ferment ta'sir etadigan substratning kimyoviy tuzilishi bilan bog'liq bo'ladi. Har bir ferment ma'lum bir substratgagina ta'sir eta oladi.

Amilaza va ureazalarning maxsusligiga xos reaksiyalar

Ma'lumki, kraxmal yod bilan ko'k rang hosil qiladi. Uning amilaza ta'sirida parchalanishi dastlab dekstrinlar (amilo-, eritro-, axro-, maltodekstrinlar) ni, keyin maltoza va undan keyin glyukozani hosil bo'lishiga olib keladi. Kraxmalning parchalanishi natijasida parchalanishning axrodekstrin bosqichidan o'tgandan keyin uning fragmentlari yod bilan hech qanday rang hosil qilmaydi. Yodli reaktiv kristall yodni kaliy yod eritmasida eritib tayyorlangan eritma hisoblanadi. Uni tayyorlash uchun 100 ml distillangan suvda 20 g kaliy yod eritiladi va uni ustiga 10 g yod kristali solinib aralashtiriladi. Kraxmalni aniqlash uchun aralashma 5 marta suyultiriladi.

Soya o'simligi dukkagida esa ureaza fermenti bo'lib, u siydikchilni gidrolizlanishini katalizlaydi va reaksiya natijasida ammoniy karbonat hosil bo'ladi:



Bu ikkala ferment uchun ham pH-optimum ko'rsatkichlari juda yaqin, ya'ni so'lak amilazasi uchun pH – 6,8 bo'lsa, soya ureazasi uchun pH – 7,0 hisoblanadi. Shu bois, fermentlarning maxsusligini shu ikki ferment yordamida namoyish qilish o'rinli bo'ladi.

Amilazaning maxsusligini o'rganish uchun so'lak suyuqligidan foydalanilsa, ureza uchun soya o'simligi urug'idan ajratib olingan ekstraktdan foydalaniladi.

So'lak suyuqligini ajratib olish. So'lak suyuqligini ajratib olish uchun og'iz bo'shlig'iga distillangan suv olib chayqatiladi. So'ng yana og'izga distillangan suv olinib, 1 minut davomida ushlab turiladi, bu so'lakli suyuqlik alohida konussimon

kolbaga o'tkaziladi va voronkaga filtr joylashtirilib boshqa idishga filtrlanadi hamda distillangan suv yordamida 10 marta suyultiriladi.

Soya urug'idan ureaza fermenti ekstraktini ajratib olish. Quruq soya urug'ini yaxshilab yanchib maydalanadi va ko'p karra petroley efiri bilan ishlov berilib, yog'idan xolis qilinadi. Soyaning yog'sizlantirilgan uni havo haroratida filtr qog'ozi ustida quritiladi va unga 5 °C da besh hajm birligida distillangan suv qo'shiladi. Aralashma sentrifugalanadi va hosil bo'lgan sentrifugatning tarkibi aynan ureaza fermentli ekstrakt hisoblanadi.

Ish tartibi: Ikkita probirkaga (1 va 2) 5 ml dan 0,1 % li kraxmal eritmasi (kraxmal eritmasi oldindan I va KI eritmasi solganda havorang rangga bo'yalishi bu oldindan sinab ko'rilgan bo'lishi lozim) solinadi. So'ng boshqa ikkita probirkaga (3 va 4) oldindan bir necha tomchi fenolftalein qo'shib qo'yilgan siydikchilning 1 % li eritmasidan 5 ml dan solinadi. Bundan keyin 1- va 3-probirkalarga 1 ml dan filtrlangan va suyultirilgan so'lak eritmasi hamda 2- va 4- probirkalarga esa 1 ml dan yuqorida keltirilgan tartibda tayyorlangan ureaza fermenti ekstrakti solinadi. Aralashmalar yaxshilab aralashtiriladi va 20 minutga 38-40 °C li termostat yoki suv hammomiga qo'yiladi. Qizdirish nihoyasiga yetgandan so'ng 1- va 2-probirkalarga yod eritmasidan bir tomchi tomiziladi. Bunda 1-probirkadagi aralashmaning ko'k rangi yo'qoladi, chunki kraxmalga so'lak amilazasi ta'sir etishi tufayli u parchalangan bo'ladi, 2-probirkaga esa ureaza fermenti ekstrakti solinganligi sababli reaksiya sodir bo'lmaydi va ko'k rang saqlanadi. 3-probirkada amilaza fermenti siydikchilga ta'sir eta olmaydi, reaksiya muhitida o'zgarish bo'lmaydi, 4-probirkada ureaza ta'siridagi reaksiya tufayli fenolftalein gulobi rangga bo'yaladi, chunki siydikchil gidrolizlanadi.

Har xil pH ko'rsatkichli fosfat-sitrat bufer eritmalarini tayyorlash

Fikrimizcha, fermentlarning o'ziga xos xususiyatlarini o'rganishda ularning pH optimumini inobatga olinganligi va xilma-xil fermentlarning pH-optimumlari turlicha bo'lganligi sababli keyingi tajribalarda foydalaniladigan va har xil pH chegarasida

boʻlgan fosfat-sitrat bufer eritmasi aralashmasini tayyorlashga oid koʻrsatmalarni keltirish oʻrinli boʻladi.

2-Jadval

Har xil pH koʻrsatkichiga ega boʻlgan bufer eritmalarini tayyorlash

№	pH	Na₂HPO₄ ning 0,2 M eritmasi (ml da)	Limon kislotasini 0,1 M eritmasi (ml da)
1	2,2	0,40	19,60
2	2,4	1,24	18,76
3	2,6	2,18	17,82
4	2,8	3,17	16,83
5	3,0	4,11	15,89
6	3,2	4,94	15,06
7	3,4	5,70	14,30
8	3,6	6,44	13,56
9	3,8	7,10	12,90
10	4,0	7,71	12,29
11	4,2	8,28	11,72
12	4,4	8,82	11,18
13	4,6	9,35	10,65
14	4,8	9,86	10,14
15	5,0	10,30	9,70
16	5,2	10,72	9,28
17	5,4	11,15	8,85
18	5,6	11,60	8,40
19	5,8	12,09	7,91
20	6,0	12,63	7,37
21	6,2	13,22	6,78
22	6,4	13,85	6,15
23	6,6	14,55	5,45
24	6,8	15,45	4,55
25	7,0	16,47	3,53
26	7,2	17,39	2,61
27	7,4	18,17	1,83
28	7,6	18,73	1,27
29	7,8	19,15	0,85
30	8,0	19,45	0,55

Bu xil bufer eritmasi aralashmalarini tayyorlashda Na₂HPO₄ ning 0,2 M eritmasi va limon kislotasining 0,1 M eritmalaridan foydalaniladi. Na₂HPO₄ ning 0,2 M eritmasini tayyorlashda Na₂HPO₄·2H₂O dan 35,62 gr olinib distillangan suv

yordamida hajmi 1000 ml ga yetkaziladi. Limon kislotasining 0,1 M eritmasini tayyorlash uchun esa, 21,008 gr limon kislotasi distillangan suv solib hajmi 1000 ml ga yetkaziladi.

Tegishli pH ko'rsatkichlaridagi bufer eritmalar tayyorlashda yuqorida keltirilgan bufer eritmasi komponentlari 2-Jadvalda keltirilgan tarzda miqdorlarda aralashtiriladi.

Fermentlarning termolabiligi va pH ko'rsatkichlarining fermentativ reaksiyaga ta'siri

Fermentlar termolabil va muhitning vodorod ioni ko'rsatkichiga sezgir, ya'ni harorat va muhitning pH ko'rsatkichlarini qisman o'zgarishi ham fermentativ jarayonga kuchli ta'sir ko'rsatadi.

Fermentativ reaksiyalarning termolabiligini aniqlash

Ish tartibi: Uchta probirka olib, ularning har biriga 5 ml dan 0,1 % li kraxmal eritmasi solinadi. Bundan keyin ularning birinchisi va ikkinchisiga 1 ml dan distillangan suv, uchinchisiga 1 ml 0,1 n xlorid kislotasi eritmasi solinadi. So'ng birinchi va uchinchisi probirkalarga 1 ml dan suyultirilgan so'lak eritmasi, ikkinchi probirkaga shuncha miqdorda qaynatib sovutilgan so'lak eritmasi solinadi.

Uchchala probirka ham 20-25 minutga 37 °C li termostatga joylashtiriladi. Probirkalar termostaddan chiqarilib, muz solingan idishga o'tkazilib sovutiladi va ularning har biriga 1-2 tomchi yodning kaliy yoddagi eritmasidan tomiziladi. Bunda birinchi probirkadagi kraxmalning parchalanishi yuz berishi tufayli yod eritmasi bilan ko'k rang hosil bo'lmaydi. Ikkinchi probirkada so'lak tarkibidagi amilaza faolsizlanganligi tufayli reaksiya yuz bermaganligi, ya'ni rang o'zgarmaganligi, uchinchisi probirkada muhit nordon bo'lganligi sababli reaksiya sekinlashganligi kuzatiladi. Demak, ikkinchi va uchinchisi probirkalar yod va kaliy yodli aralashma ta'sirida ko'k rangga bo'yaladi.

Fermentativ reaksiya tezligiga haroratning ta'sirini aniqlash

Ish tartibi: Uchta probirka olib, ularning har biriga kraxmalning 0,25 % li eritmasidan 5 ml dan solinadi. Bundan keyin birinchi probirkani muz solingan

idishga, ikkinchi va uchinchi probirkalarni 38 °C li termostatga joylashtiriladi. So`ng birinchi va ikkinchi probirkalarga 0,5 ml dan suyultirilgan so`lak, uchinchi probirkaga xuddi shu miqdorda qaynatib sovutilgan so`lak qo`shiladi. Vaqti-vaqti bilan ikkinchi probirkadagi aralashmadan bir tomchi olib, ustiga 1 ml yodning kaliy yodli eritmasi qo`shib, aralashtiriladi. Shu yo`sinda kraxmalning parchalanish dinamikasi kuzatiladi. Eng oxirida, ikkinchi probirkadan olingan tomchini solinganda solingan yodni kaliy yodli eritma bilan rang hosil qilmaydigan payt keladi. Bu narsa kraxmalning so`lak tarkibidagi amilaza ishtirokida to`liq parchalanganligini ko`rsatadi.

Keyin hamma probirkalardagi aralashmalarga 3-4 ml dan 1 n H₂SO₄ qo`shiladi va sovutiladi. Uchchala probirkalarga ham yodning kaliy yodli eritmasidan 2-3 tomchi tomiziladi. Bunda ikkinchi probirkada kraxmalning parchalanishi nihoyasiga yetadi va rang hosil bo`lmaydi, birinchi probirkada kraxmalning parchalanishi qisman yuz berib qizg`ish rang hosil bo`ladi, uchinchi probirkada kraxmal umuman parchalanmaydi va ko`k rang hosil bo`ladi.

Fermentativ reaksiyalar tezligining ferment konsentratsiyasiga bog`liqligini aniqlash

Ish tartibi: To`rtta probirka olib, ularning har biriga 3 ml dan pH ko`rsatkichi 6,8 bo`lgan fosfat-sitrat bufer eritmasi hamda 4 ml dan 0,25 % li kraxmal eritmasi qo`shib aralashtiriladi. So`ng birinchi probirkaga 20 marta, ikkinchi probirkaga 40 marta, uchinchi probirkaga 80 marta va to`rtinchi probirkaga 160 marta suyultirilgan so`lak eritmalaridan 1 ml dan qo`shiladi va bu aralashmalar 38-40 °C li termostatga o`tkaziladi. Bundan keyin vaqti-vaqti bilan namunalardan bir necha tomchi olib, juda kuchli ravishda suyultirilgan yodning kaliy yodli eritmasi bilan aralashtiriladi. Namunalar dastavval ko`k, so`ng qizg`ish-binafsha rangga bo`yaladi. To`rttala probirka uchun ham yod bilan ko`k rangga bo`yalishining yo`qolishi 0,5 minut aniqlikda qayd qilinadi. Bu fursat oralig`i amilolitik parchalanishning nihoyasi hisoblanadi. Tajriba natijalari egri chiziq orqali ifodalanib, bunda absitssa o`qiga amilazaning nisbiy konsentratsiyasi, ordinata o`qiga esa unga tegishli bo`lgan vaqt

birligi joylashtiriladi. Amilolitik reaksiya tufayli kraxmalning parchalanishi uchun sarflangan vaqt reaksiya tezligiga teskari proporsional bo'ladi.

So'lak amilazasining amilolitik faolligini va pH-optimumini aniqlash

Ish tartibi: Yettita probirka olib, ularning har biriga 5 ml dan fosfat-sitrat buferining har xil pH ko'rsatkichlariga ega bo'lgan aralashmasi tayyorlanadi. Aralashma komponentlarini miqdorlarini yuqorida keltirilgan 2-jadval asosidagi pH ko'rsatkichlari mos bo'lgan tarzda olinadi:

Probirka №	1	2	3	4	5	6	7
Aralashmani 2-jadvaldagi №	10	15	17	21	24	27	30
pH	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0

So'ng har bir probirkaga kraxmalning 0,25 % li eritmasidan 4 ml dan va suyultirilgan so'lak eritmasidan 1 ml dan solinadi. Hamma probirkalar tezda 38 °C li termostatga ko'chiriladi. Vaqti-vaqti bilan hamma probirkalardagi aralashmalardan bir necha tomchi namunalar alohida probirkalarga ko'chirilib, o'ta suyultirilgan yodning kaliy yodli aralashmasi bilan aralashtiriladi. Dastlab aralashmalar ko'k rang bersa, ma'lum vaqt o'tgandan keyon qizg'ish-binafsha, keyin esa qizil rangga bo'yaladi va nihoyat yod bilan rang hosil qilmay qo'yadi.

Bunda beshta probirka (3, 4, 5, 6, 7) larda ko'k rangning yo'qolishi kuzatiladi va bu rangning yo'qolishi jadalligida tegishli minut hisobidagi raqamlarni 0,5 minut aniqligida kechadigan amilolitik faollik qiymatlariga o'tkaziladi:

3) $1:60=0,017$

4) $1:8=0,125$

5) $1:5=0,2$

6) $1:14=0,071$

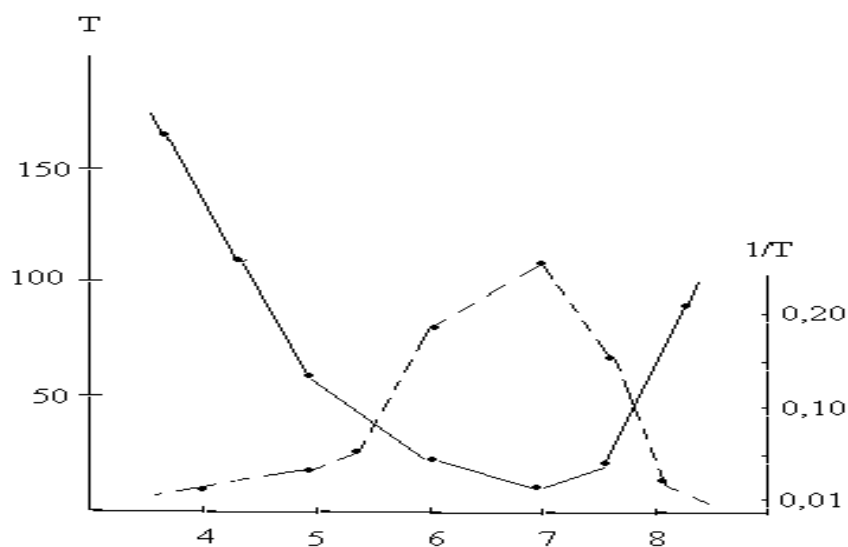
7) $1:85=0,011$

Shu olingan raqamlar asosida jadval tuziladi (3-Jadval):

3-Jadval ma'lumotlarini egri chiziq tarzida ifodalasa bo'ladi. Bunda absitssa chizig'iga pH ko'rsatkichini, chap ordinata chizig'iga kraxmal parchalanishiga muvofiq keladigan vaqt (minut hisobida) va qo'shimcha ordinata (o'ng tomonda) chizig'iga amilolitik faollikning 5 minutdagi ulushini qo'yib chiziladi (7-Rasm).

Soʻlak amilazasi faolligini pH optimumini aniqlash natijalari

pH	Kraxmalni gidroliz qilish vaqti (minut hisobida)	0,5 minut aniqligida kechadigan amilolitik faollik (1/T minut hisobida)
4,0	160	0,006
5,0	110	0,009
5,4	60	0,017
6,2	8	0,125
6,8	5	0,200
7,4	14	0,071
8,0	85	0,011



7-Rasm. Soʻlak amilazasi faolligini pH optimumini aniqlash natijalari

Bu yerda: T – kraxmalni gidrolizlanish vaqti, minut hisobida; 1/T – 0,5 minut aniqligida kechadigan amilolitik faollik (1/minut hisobida).

3-Jadval va 7-Rasmga asoslanib, eng qisqa muddatda fermentativ faollikni namoyon qiladigan pH koʻrsatkichni (6,8) soʻlak amilazasining pH-optimumi deb hisoblash mumkin.

Soʻlak amilazasi faolligiga faollovchilar va ingibirlovchilarning taʼsirini oʻrganish

Soʻlak amilazasiga past konsentratsiyali NaCl tuzi faollovchi omil sifatida taʼsir koʻrsatadi. Xususan, dializ qilingan soʻlak amilazasini kraxmalga nisbatan faolligi yoʻqoladi. Xuddi shuningdek, baʼzi metal tuzlari fermentlarga faollovchi taʼsir koʻrsatishi va boshqalari ingibirlovchi taʼsir koʻrsatishi mumkin.

Ish tartibi: Uchta probirka olib, ularga 5 tomchidan 0,5 % li kraxmal eritmasidan tomiziladi, birinchi probirkaga 10 tomchi distillangan suv, ikkinchisiga 8 tomchi suv bilan 2 tomchi 1 % li NaCl eritmasi, uchinchisiga 8 tomchi suv bilan 2 tomchi 1 % li CuSO_4 eritmasi tomiziladi, hammasiga 5 marta suyultirilgan soʻlakdan 10 tomchidan qoʻshib, yaxshilab aralashtirilib, xona haroratida qoldiriladi. 5 minutdan keyin uchchala probirkaga ham 10 tomchidan distillangan suv, 1-2 tomchidan 0,1 % li yod eritmasidan solib aralashtiriladi, ularning ustiga tajribadagi uchchala probirkadagi aralashmaning har biridan 2-3 tomchidan alohida probirkalarga tomiziladi. Yod bilan qilinadigan reaksiya 10-15 minutda yana takrorlanadi. Birinchi probirkadagi suyuqlik binafsha yoki qizil rangga, ikkinchisi qizil yoki sariq, uchinchisi esa koʻk rangga kiradi. Demak, ikkinchi probirkada kraxmal yaxshiroq gidrolizlangan, uchinchisida umuman gidroliz ketmagan. Ish natijasi jadvalda (4-Jadval) qayd qilinadi.

4-Jadval

Amilaza faolligiga faollovchi va ingibirlovchilarning taʼsiri

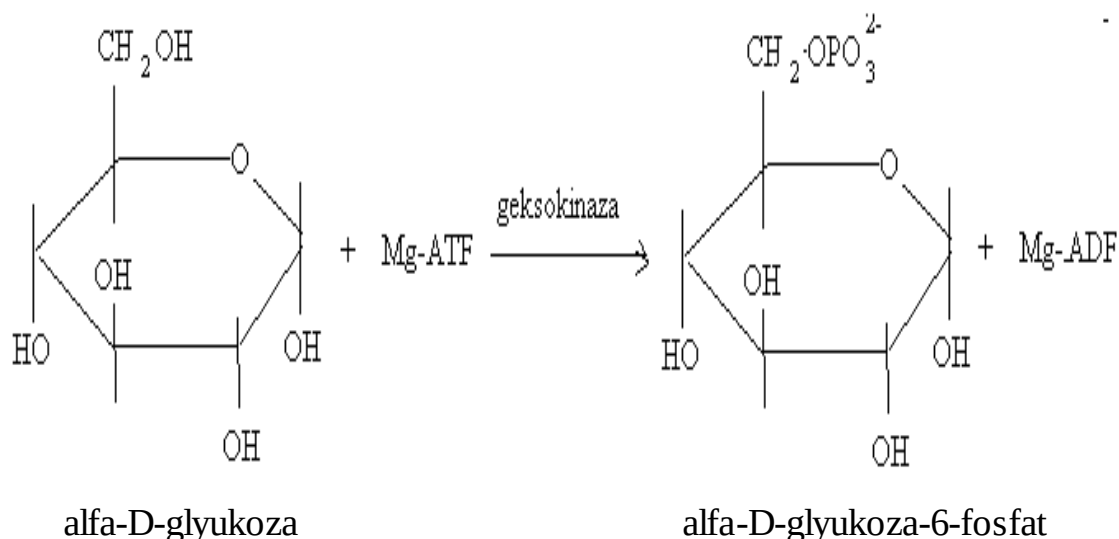
№	Ferment	Substrat	Fermentning taʼsir etish vaqti, min	Reaksiya aralashmaning yod bilan bergan ranggi		
1	Soʻlak amilazasi	Kraxmal	5			
2	Soʻlak amilazasi	Kraxmal	10			
3	Soʻlak amilazasi	Kraxmal	15			
Xulosa:						

2. FERMENTLARNI AJRATISH, TOZALASH VA FAOLLIGINI ANIQLASH

1-AMALIY ISH:

Mavzu: Geksokinaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

Geksokinaza ATF va Mg ishtirokida alfa-D-glyukozadan alfa-D-glyukoza-6-fosfat hosil bo'lish reaksiyasini katalizlaydigan ferment hisoblanadi:



Bu fermentning molekulyar massasi 54000 Da, pH – optimumi 7,5 ga teng. Geksokinazani ajratish uchun eng qulay biologik material non pishirishda foydalaniladigan xamirtirush hisoblanadi.

Kerakli reaktivlar:

1. Xamirtirush – 1 kg.
2. 0,02 M fosfat bufer (pH – 7,0, ion kuchi 0,1 bo'lgan) eritmasi, tarkibi:
 - a) KH_2PO_4 – 2,8 g;
 - b) K_2HPO_4 – 4,6 g;
 - c) D-glyukoza – 5,0 g;
 - d) EDTA – 0,37 g;
 - e) H_2O – 1 litrgacha.
3. 0,02 M atsetat bufer (pH – 5,0, ion kuchi 0,013 bo'lgan) eritmasi, tarkibi:
 - a) CH_3COOH (muz sirka kislota) – 0,4 ml;
 - b) CH_3COONa (suvsiz) – 1,1 g;

- c) D-glyukoza – 5,0 g;
 - d) EDTA – 0,37 g;
 - e) H₂O – 1 litrgacha.
4. Atsetat bufer (pH – 4,5, ion kuchi 0,05 bo`lgan) eritmasi, tarkibi:
- a) CH₃COOH (muz sirka kislota) – 4,3 ml;
 - b) CH₃COONa (suvsiz) – 4,3 g;
 - c) D-glyukoza – 5,0 g;
 - d) EDTA – 0,37 g;
 - e) H₂O – 1 litrgacha.
5. D-glyukoza.
6. EDTA.
7. Na₂HPO₄ ning 0,2 M ertimasi.
8. CH₃COOH ning 3 n ertimasi.
9. EDTA eritmasi (bir litr suvga 1,5 g) da qayta perekristallizatsiyalangan (NH₄)₂SO₄ ning quruq kukuni.
10. DEAE-sellyuloza.
11. KM – sellyuloza.
12. KCl ning 0,3 M eritmasi.
13. NaCl ning 0,4 M ertimasi.

Xamirtirushni quritish va ekstraksiyalash. Non pishirishda foydalaniladigan xamirtirush xona haroratida quritiladi, natijada 1 kg xamirtirushdan 200 g quruq kukun qoladi. Quritilgan xamirtirushni chinni havonchada yaxshilab ezib maydalanadi va uning 100 g ga tarkibida 1 mM EDTA bo`lgan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ning 0,2 M ertimasidan 400 ml qo`shib suspenziyalanadi. Aralashma 37 °C da 3 soat davomida inkubatsiyalanadi. Bundan keyin 0 °C da 30 minut oralig`i (5000 g) da sentrifugalanadi. Cho`kma usti suyuqligi keyingi bosqichda foydalaniladi, cho`kma tashlab yuboriladi.

***Muhit pH ko`rsatkichini o`zgartirish asosida cho`ktirish.*** Cho`kma usti suyuqligi muz solingan idishga ko`chiriladi va aralashma doimo aralashtirilib turilgan holda CH<sub>3</sub>COOH ning 3 n ertimasidan kam-kam solib, pH ko`rsatkichi 4,5 ga yetkaziladi

(bu jarayon uchun 1,5-2,0 soat vaqt talab qilinadi). Aralashma 4 °C li sharoitda kelas kungacha qoldiriladi, so`ng 10000 g da, 20 minut davomida sentrifugalanadi.

**Ammoniy sulfat yordamida cho`ktirish.** Oldingi bosqichda olingan supernatantni quruq ammoniy sulfat kukunidan foydalanib, to`yinish darajasini 0,39 (100 ml aralashmaga 24 g) yetkaziladi. Bir soat muddat o`tgandan keyin aralashma sentrifugalanadi. Cho`kma tashlab yuboriladi. Supernatantning to`yinish darajasini oshirib (100 ml ga  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan yana 10 g qo`shib) 0,55 yetkaziladi. Aralashma 15000 g da 30 minut davomida sentrifugalanadi. Cho`kmaga pH 7,0 bo`lgan fosfat buferidan 20 ml qo`shib eritladi va hosil bo`lgan eritma shu buferning o`zida dializlanadi. Dializ jarayonida dializlashda foydalanilayotgan bufer eritma yangisi bilan 2-3 marta almashtiriladi. Bunda hosil bo`lgan cho`kma sentrifugalash yo`li bilan ajratib olinadi va tashlab yuboriladi.

Geksokinazali aralashmani DEAE-sellyulozali kolonkada xromotografiya o`tkazish yo`li bilan tozalash. DEAE – sellyulozali kolonka tegishli yo`riqnomaga muvofiq ravishda tayyorlanadi. Kolonka (3x25 sm li) fosfat buferi eritmasi yordamida muvozanatlanadi. Kolonkaga yuqorida olingan sentrifugat kiritiladi va muayyan fosfat buferining 0-0,3 M KCl eritmali chiziqli gradiyentli eritmasidan foydalanib, elyutsiya o`tkaziladi. Elyutsiya tezligi 90 ml/soat ni tashkil qilib, fraksiyalarni 9 ml hajmda yig`ib olinadi va ularda oqsil miqdori hamda ferment faolligi ko`rsatkichlari aniqlanadi.

Geksokinaza faolligi kuzatilgan fraksiyalar birlashtiriladi va yana qaytadan DEAE-sellyulozada xromotografiya (rexromotografiya) qilinadi. Buning uchun 1,4x15 sm li kolonka tayyorlanib, fosfat buferi (reaktivlar ro`yxatida 2-turgan) ning tarkibida 0,3 M KCl bo`lgan chiziqli gradiyentli eritmasidan foydalanib, elyutsiya o`tkaziladi. Elyutsiya tezligi 35 ml/soat ni tashkil qiladi. Fraksiyalarni 4 ml hajmdan yig`iladi va ulardagi oqsil miqdori hamda fermentativ faollik aniqlanadi.

Fermentativ faollikni namoyon qilgan fraksiyalar yig`ib olinadi. Olingan oqsil eritmasini dializlagandan so`ng liofilizatsiyalash mumkin. Bu liofillangan enzim ikki xil izoenzimdan iborat bo`ladi. Bu izoenzimlarni ajratish uchun qo`shimcha ravishda

KM-sellyulozada va qaytadan DEAE-sellyulozada xromotografiya o'tkazish lozim bo'ladi.

KM – sellyulozali kolonkada xromotografiya o'tkazish yo'li bilan tozalash.

Yuqoridagi fermentativ faollikka ega bo'lgan fraksiyalar birlashtirilib, ultrafiltratsiyalash orqali konsentrlanadi va pH ko'rsatkichi 5,0 bo'lgan atsetat buferiga qarshi dializ qilinadi. KM – sellyuloza yo'riqnomaga muvofiq tayyorlanadi, 1,4x15 sm li kolonkaga joylashtirilib, oqsil eritmasi kolonkadagi gelga singgandan so'ng undan KM – sellyuloza bilan bog'lanmagan oqsilni chiqib ketishini ta'minlash uchun kolonkaning 1-2 hajmida atsetat bufer eritmasi o'tkaziladi. Keyin pH ko'rsatkichi 5,0 bo'lgan tarkibida 0-0,4 M NaCl bo'lgan bufer eritma o'tkaziladi. Elyutsiya tezligi 20 ml/soat. Fraksiyalar 4 ml dan ajratiladi. Elyuat ultrafiltratsiya yordamida konsentrlanadi va fosfat buferiga qarshi dializlanadi.

DEAE-sellyulozada pH – gradiyenti asosida xromotografiya o'tkazish. DEAE – sellyuloza solinib, fosfat buferi bilan muvozanatlangan 1,2x27 sm li kolonkaga yuqorida keltirilgan tartibda dializlangan oqsil kiritiladi. Elyutsiyani pH gradiyentida 150 ml fosfat va 150 ml atsetat buferlarini chiziqli gradiyent asosida aralashtirib, o'tkazish orqali olib boriladi. Kolonkaga 10 mg atrofida oqsil kiritish mumkin bo'ladi. Elyutsiya tezligi 20 ml/soat. Fraksiyalar 4 ml hajmda yig'iladi. Xromotografiya jarayonida pH ko'rsatkichi 7,0 dan 5,0 gacha bo'lgan gradiyent chegarasida o'zgaradi. Kolonkadan taxminan 100 ml eritma o'tgandan so'ng izoenzim A va undan keyin izoenzim B ga tegishli oqsillar ajralib chiqadi.

Geksokinazaning faolligini aniqlash

Kerakli reaktivlar:

1. 5×10^{-2} M tris-HCl bufer eritmasi, pH – 8,0;
2. 5×10^{-1} M D-glyukoza eritmasi;
3. $4,5 \times 10^{-2}$ M – $MgCl_2$ eritmasi;
4. $2,25 \times 10^{-2}$ M ATF eritmasi;
5. $1,0 \times 10^{-2}$ M NADF eritmasi, pH – 6,5;
6. Glyukoza – 6 – fosfat degidrogenaza (fermentning asosiy eritmasi tris-HCl buferi bilan 50-100 marta suyultiriladi) eritmasi;

7. Geksokinaza – 0,5 mg/ml (faollikni aniqlash oldidan tris-HCl buferi bilan suyultiriladi) eritmasi.

Barcha eritmalar bidistillangan suvda tayyorlanadi.

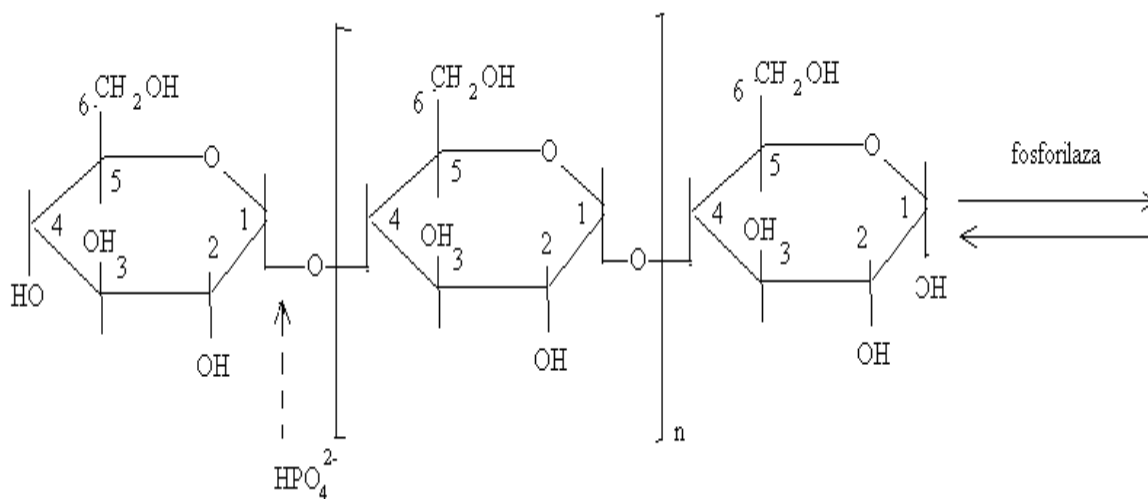
Ish tartibi: Spektrofotometrning kyuvetasi 0,4 ml substrat aralashmasi (D-glyukoza, $MgCl_2$ va ATF) 0,1 ml NADF eritmasi, 0,01-0,04 ml glyukoza-6-fosfat dehidrogenaza boʻlgan eritma, tris-HCl buferining 50 mM li eritmasidan qoʻshib, umumiy hajmi 3 ml ga yetkaziladi va yaxshilab aralashtirilgandan keyin unga 0,01-0,02 ml geksokinaza eritmasini qoʻshish orqali reaksiya boshlab yuboriladi. Reaksiyaning boshlanishi sekundlarda qayd qilinadi va 340 nm da, har sekund oraligʻida optic zichlikning oshib borishi kuzatiladi. Ajratib olingan ferment preparatini solishtirma faolligi sarhisob qilinadi.

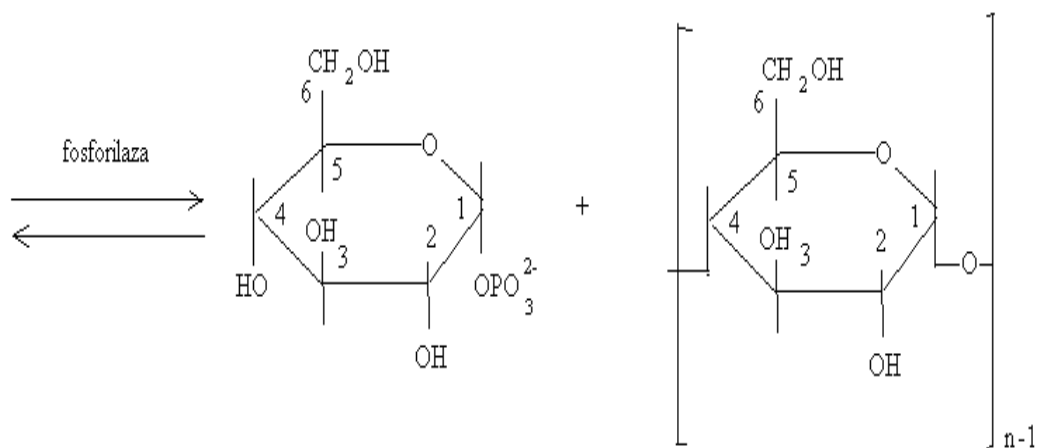
Oqsil miqdorini spektrofotometrik yoʻl bilan 280 nm da konsentratsiyasi 1,0 mg/ml boʻlganda koʻrsatkichi 0,9 ga tengligiga qarab aniqlanadi.

2-AMALIY ISH:

Mavzu: Glikogenfosforilaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

Glikogenfosforilaza fermenti skelet mushagida ikki xil shaklda, yaʼni fosforilaza-B-nofaol va fosforilaza-A-faol shakllarda uchraydi. Fosforilaza-B ning toʻrtlamchi tuzilmasi dimer, Fosforilaza-A niki esa tetramer boʻladi va ularning molekulyar massalari oʻzaro mos holda 185000 Da va 370000 Da ga teng boʻladi.





Fosforilaza-B ni fosforilaza-A ga aylanishi serin-14 qoldig`ini fosforilaza-B-kinaza fermenti ta`sirida fosforlanishi orqali yuz beradi. Bu ferment yuqoridagi reaksiyani katalizlaydi.

Kerakli reaktivlar:

1. 1,5 mM EDTA eritmasi, pH – 7,0;
2. 1 n CH_3COOH eritmasi;
3. KHCO_3 quruq holda (qayta kristallangan);
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ xona haroratida to`yingan eritmasi, pH – 7,0;
5. 1,0 mM tris-HCl bufer eritmasi, pH – 7,5;
6. 2,0 M tris eritmasi;
7. 0,3 M sisteyinning yangi tayyorlangan eritmasi, pH – 7,5;
8. NH_4OH , konsentrlangan;
9. 1,0 M $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ eritmasi;
10. 0,1 M AMF eritmasi, pH – 7,0.

Barcha eritmalar kimyoviy toza rusumli reaktivlardan tayyorlangan bo`lishi va bidistillangan suvda tayyorlanishi lozim.

Fosforilaza-B ni quyoningning skelet mushagidan ajratib olish

Quyinni so`yib, uning oyoqlarini mushaklari ajratib olinadi va yog`lardan xolis qilinadi. So`ng go`sht massasi go`sht maydalagichda maydalanadi.

Ekstraktsiyalash. Tarozida 150-200 g mushak massasi tortib olinib, ustiga teng miqdorda (150-200 ml) 1,5 mM EDTA eritmasi (pH – 7,0) dan qo`shiladi va xona haroratida 15-20 minut ekstraktsiyalanadi. Hosil bo`lgan massani ikki qavatli doka orqali siqib ekstrakti ajratiladi va qolgan massa bilan ekstraktsiyani yana shu yo`sinda takrorlanadi va hosil bo`lgan ekstraktlar birlashtiriladi. Birlashtirilgan ekstrakt solingan idish muz solingan idishga ko`chiriladi hamda 1 n sovutilgan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  eritmasi qo`shib, pH 5,2-5,5 gacha nordonlashtiriladi. Bundan so`ng eritma sentrifugalanadi. Tajribaning qolgan qismlarini hammasi sovuq sharoitda o`tkaziladi. Cho`kma usti suyuqligi Byuxner voronkasi orqali suv nasosidan foydalanib filtrlanadi va hosil bo`lgan eritma quruq KHCO_3 qo`shib nordon holga keltiriladi.

Ammoniy sulfat yordamida fraksiyalash. Neytral holga keltirilgan oqsilli aralashmaga doimo aralashtirgan holda ammoniy sulfat qo`shib, to`yinish darajasi 0,41 bo`lgunga (1 litrga 700 ml) qadar to`yintiriladi. Ammoniy sulfat eritmasini oldindan ammiak yordamida pH 7,0 ga yetkazilgan bo`lishi lozim. Oqsilning cho`kishi uchun eritma sovuq sharoitda bir kecha qoldiriladi, cho`kma sentrifugalash ( 15 minut, 10000-15000 g) yo`li bilan ajratiladi. Cho`kma EDTA eritmasida 25 °C da eritiladi. Aralashma ammoniy sulfat qoldig`idan xolis bo`lishi uchun 3-5 litr hajmdagi pH 7,5 bo`lgan 1 mM tris-HCl bufer eritmasiga qarshi dializlanadi.

Dializatga harorat yordamida ishlov berish. Dializ nihoyasiga yetgandan so`ng, unga 0,3 M sistein eritmasini umumiy hajmda konsentratsiyasi 0,03 M bo`lguncha EDTA niki 0,01 bo`lguncha qo`shiladi, pH esa 2,0 M tris eritmasidan foydalanib, 7,5 ga yetkaziladi. Aralashma 37 °C da 30 minut inkubatsiyalanadi. Bunda hosil bo`lgan cho`kma sentrifugalash orqali ajratib tashlanadi. Cho`kma usti suyuqligi 2,0 M tris eritmasi qo`shib, pH 8,5 gacha yetkaziladi va shu sharoitda yana 30 minut inkubatsiyalanadi. So`ng aralashma xona darajasigacha sovutiladi, sovutilgandan keyin 1 n sirka kislotasi yordamida neytrallanadi. Bunda hosil bo`lgan cho`kma 10 minut 3000 g tezligida sentrifugalab ajratib tashlanadi. Supernatant fermentli eritma hisoblanadi.

Kristallizatsiyalash. Fermentli eritma sovutiladi va unga 1,0 M $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 M AMF eritmalaridan 1/100 hajmda qo`shiladi. Odatda, oqsil kristallizatsiyasi 20-30 minut o`tgandan keyin boshlanadi.

Qayta kristallizatsiyalash. Kristall suspenziyasi 2-4 °C, 15000 g da sentrifugalanadi, cho`kma 25-30 °C da 3-5 ml sistein eritmasi (0,003 M) da eritiladi. Bunda oqsilning erimagan qismi xona haroratida sentrifugalsh yo`li bilan ajratib olinib tashlab yuboriladi. Fermentli eritma (supernatant) ga $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ va AMF eritmalaridan o`zaro mos holda 0,01 va 0,001 M konsentratsiyaga yetgunicha qo`shiladi. Eritma sovutilganda fermentning kristallanishi sodir bo`ladi. Suspenziya 4 °C da saqlanadi va keyingi tajribalar uchun ishlatiladi.

Fosforilaza-B ning faolligini aniqlash

Fosforilaza-B faolligini aniqlash glikogen sinteziga asoslanib olib boriladi:



Uslub glyukoza-1-fosfatdan ajralib chiqqan anorganik fosforni miqdorini aniqlashga asoslangan bo`lib, bunda glyukozani o`zi glikogen molekulasiga birikadi. Aniqlash ATF ishtirokida olib boriladi.

Kerakli reaktivlar:

1. 0,05 M Na-beta-glitserofosfat-sistein bufer eritmasi, pH – 6,8;
2. Na-beta-glitserofosfat-sistein bufer eritmasida tayyorlangan glikogenning 4 % li eritmasi;
3. Na-beta-glitserofosfat-sistein bufer eritmasida tayyorlangan 0,064 M glyukoza-1-fosfat eritmasi;
4. 0,05 M AMF eritmasi, pH – 7,0;
5. Yuqoridagi usulda ajratib olingan fosforilazani suspppenziyani faolligini aniqlashni olib borish oldidan Na-beta-glitserofosfat-sistein bufer eritma bilan 1 mg/ml darajasigacha suyultirilgan aralashma;
6. Fiske va Sobbarou uslubida anorganik fosforni aaniqlash uchun ishlatiladigan reaktiv.

Ish tartibi: Probirkaga 0,2 ml glikogen, fosforilazali eritmadan 0,01-0,02 ml, bufer eritmadan 0,38 ml solinadi va 30 °C da 10 minut davomida inkubatsiyalanadi.

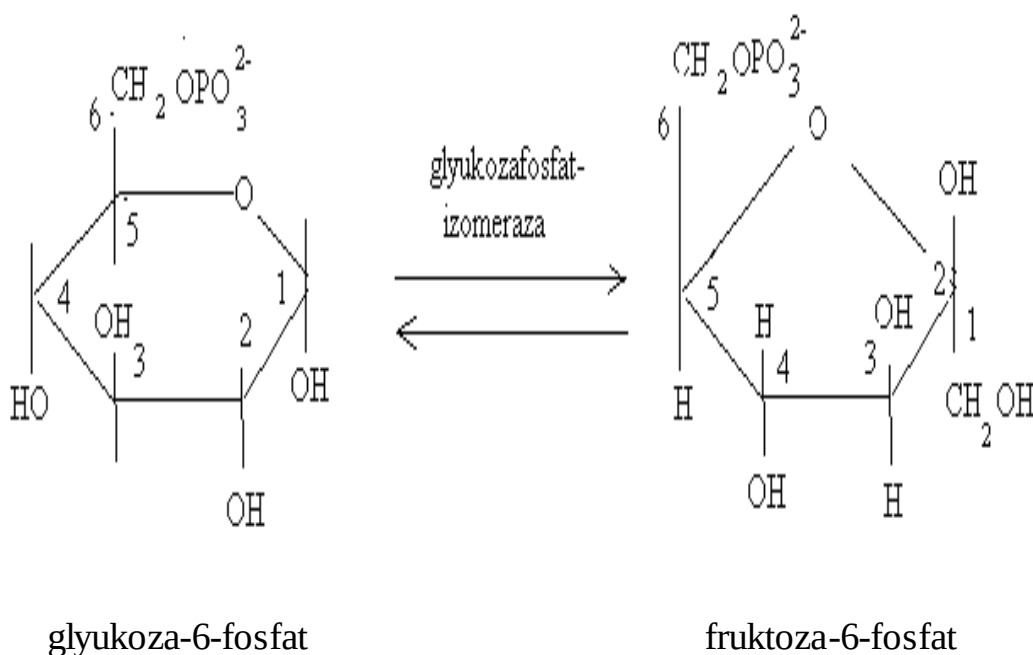
Keyin aralashmaga AMF eritmasidan 0,016 ml va glyukoza-1-fosfat eritmasidan 0,2 ml qo`shiladi hamda yaxshilab aralashtirilib inkubatsiyalanadi, vaqt sekundomerd qayd qilinadi. Ma`lum vaqtlar oralig`ida (5, 10, 15 minut) reaksiya muhitidan 0,2 ml dan eritmalar ajratib olinadi. Reaksiyani to`xtatish uchun olingan namunalar 3 ml dan 0,1 n H_2SO_4 solib qo`yilgan probirkalarga solinadi. Bu probirkalarda anorganik fosforning miqdoriy ko`rsatkichi aniqlanadi. Nazorat namunasi sifatida tarkibida AMF ning o`rniga 0,016 ml distillangan suv solingan namuna inkubatsiyalanadi.

Fermentning solishtirma faolligi hisoblab topiladi. Oqsil miqdori Louri usulida aniqlanadi. Beta-glitsero fosfat va sistein rangning hosil bo`lishiga xalaqit berganligi sababli oqsilni uch xlorli sirka kislota bilan cho`ktirib, ajratiladi va tashlab yuboriladi.

3-AMALIY ISH:

Mavzu: Glyukozafosfatizomeraza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

Glyukozafosfatizomeraza fermenti glyukoza-6-fosfatni fruktoza-6-fosfatga aylanish reaksiyasini katalizlaydi:



Bu reaksiya qaytar reaksiyadir. Ushbu ferment xilma-xil biologik manbalardan ajratib olingan. Glyukozafosfatizomeraza fermenti ikkita subbirlikdan iborat bo'ladi. Fermentativ reaksiya ATF va glyukonat-6-fosfat tomonidan ingibirlanadi. Molekulyar og'irligi 14000-15000 Da, pH – 8,5, harorat 30 °C bo'lganda glyukoza-6-fosfat uchun Mixaelis konstantasi - $3,1 \times 10^{-4}$ M, fruktoza-6-fosfat uchun esa $1,7 \times 10^{-4}$ M ni tashkil qiladi.

Kerakli reaktivlar:

1. 0,015 M EDTA li eritmada tayyorlangan 0,01 M HCl eritmasi, pH – 7,0;
2. 1,0 M $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ eritmasi;
3. 1 n NaOH eritmasi;
4. 0,25 M natriy-sitrat eritmasi, pH – 8,5;
5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ quruq kukun (EDTA li eritmada qayta kristallangan);
6. 0,1 M $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ eritmasi;
7. 0,5 n NH_4OH eritmasi;
8. 0,025 M EDTA eritmasi, pH – 8,0;
9. Etil spirti;
10. Atseton;
11. 0,2 M CH_3COOH eritmasi;
12. Bentonit;
13. 0,2 M tris-HCl bufer eritmasi, pH – 8,0;
14. 0,1 M Na_2HPO_4 eritmasi;
15. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning to'yingan eritmasi.

Barcha eritmalar komyoviy toza rusumli reaktivlardan tayyorlangan bo'lishi va bidistillangan suvda tayyorlanishi lozim.

Quyong mushagidan glyukozafosfatizomeraza fermentini ajratib olish

Fermentni ajratishga qaratilgan barcha ishlar sovuq sharoitda o'tkazilishi lozim.

Ekstraksiyalash. Quyong mushaklari qonsizlantirilgandan keyin go'sht maydalagichdan o'tkaziladi. Maydalangan 150-200 g go'sht uch hajm 0,01 M KCl qo'shib bir minut davomida gomogenizatsiyalanadi. Gomogenat 30 minut davomida mexanik aralashtirgich yordamida aralashtiriladi va so'ng 15000 g/min tezlikda 15

minut sentrifugalanadi. Bu fraksiyaning hajmi dastlab qo`shilgan KCl ning hajmiga teng deb hisoblanadi (1-fraksiya).

Rux atsetati yordamida fraksiyalash. Yuqorida olingan supernatantga 1,0 M rux atsetati hajm bo`yicha konsentratsiyasi 0,03 M bo`lguncha qo`shiladi, pH ko`rsatkichi esa 1 n NaOH qo`shib, 8,5 ga yetkaziladi. 1-2 soat o`tgandan so`ng oq rangli suspenziya 15000 g/min tezlikda 15 minut sentrifugalanadi. Cho`kma pH 8,5 bo`lgan 0,25 M ammoniy sitratda suspenziyalanadi (bunda 1-fraksiya hajmiga nisbatan 1/5 hajm qo`shiladi) va bir kecha shu holatda qoldiriladi. Kelgusi kuni cho`kma yana 15000 g/min tezlikda 30 minut sentrifugalanadi. Ajratib olingan cho`kma 0,25 M ammoniy sitrat eritmasi bilan yuviladi (bunda 1-fraksiya hajmiga nisbatan 1/15 hajm qo`shiladi). Ikkala eritma birlashtiriladi va qizg`ish loyqali eritma hosil bo`lishi kuzatiladi (2-fraksiya).

Ammoniy sulfat yordamida fraksiyalash. 2-fraksiyani ammoniy sulfatning quruq kukuni bilan 0,33 darajasigacha to`yintiriladi. Cho`kma sentrifugalash usuli bilan ajratib tashlanadi. Supernatantni to`yintirish darajasi ammoniy sulfat yordamida oshiriladi va 0,63 ga yetkaziladi hamda so`ng 15000 g/min tezlikda 30 minut sentrifugalanadi. Ajratib olingan cho`kma pH ko`rsatkichi 8,5 bo`lgan 0,025 M EDTA (2-fraksiyani 1/8 hajmiga teng bo`lgan) eritmasida eritiladi. So`ng aralashma 0,005 M magniy atsetat eritmasiga qarshi bir kech-kunduz dializlanadi. Eritmani qolgan cho`kmasi sentrifugalash orqali ajratib tashlanadi va tiniq eritma hosil bo`lishi kuzatiladi (3-fraksiya).

Spirit yordamida fraksiyalash. 3-fraksiyadagi oqsil miqdori Louri uslubida aniqlanadi va 0,005 M magniy atsetat eritmasida, shu darajada suyultiladiki, bunda undagi oqsil konsentratsiyasi 15 mg/ml bo`lishi kerak. Eritmaga 1 n sovitilgan NaOH qo`shish orqali uning pH ko`rsatkichi 8,6 ga yetkaziladi. Bundan keyin oqsil eritmasini 10 °C li sharoitga ko`chirib, unga sovitilgan 96 % li etil spirit qo`shiladi va aralashmadagi uning konsentratsiyasi 34 % ga yetkaziladi. Oqsil eritmasini harorati 0 °C dan oshmasligini ta`minlash zarur, aks holda u denaturatsiyaga uchraydi. Aralashmaga eng so`nggi ulush spirit qo`shilgandan keyin 20 minut tinch qoldiriladi va -15 °C da 15000 g/min tezlikda 15 minut sentrifugalanadi va ajratib olingan cho`kma tashlab

yuboriladi hamda bundan keyin supernatantdagi spirtning konsentratsiyasi 64 % ga yetkaziladi. Yana yuqoridagi sharoitda sentrifugalash o'tkaziladi. Hosil bo'lgan cho'kma 3-fraksiyadagi hajmning 1/4 qismicha 0,1 M magniy atsetat qo'shib suspenziyalanadi. Suspenziyalash darajasi oqsilning eritmadagi konsentratsiyasi 15 mg/ml darajasigacha yetishi kerak. Suspenziya 15000 g/min tezlikda 20 minut sentrifugalanadi va tiniq to'q sariq rangli eritma hosil bo'lishi kuzatiladi (4-fraksiya).

Atseton yordamida fraksiyalash. 4-fraksiyaga atseton bilan ishlov beriladi. Buning uchun uning aralashmadagi konsentratsiyasi 40 % ga yetkaziladi. Atseton oldindan -10°C gacha sovitiladi va uni aralashmaga asta-sekin qo'shib borilib, atsetonning konsentratsiyasi 50 % ga yetkaziladi, bunda harorat 0°C atrofida bo'lishiga erishish lozim. 10 minutdan keyin o'sha sharoitda yana sentrifugalash o'tkaziladi va hosil bo'lgan cho'kma 4-fraksiya hajmiga nisbatan 1/2 miqdordagi 0,05 M magniy atsetatda eritiladi. Bunda och sariq rangli oqsil eritmasi hosil bo'lishi kuzatiladi (5-fraksiya).

Bentonit yordamida fraksiyalash. 5-fraksiyadagi oqsil miqdori aniqlanadi va keyin undagi oqsilning konsentratsiyasi 7 mg/ml bo'lguniga qadar suyultiriladi. Buning uchun 0,05 M magniy atsetatdan foydalaniladi, uning pH ko'rsatkichi sovitilgan 0,2 n sirka kislota qo'shib, 7,4 ga tenglashtiriladi. Oqsil aralasmasi yaxshilab aralashtirilib unga bentonit qo'shiladi (1 g oqsil hisobiga 4 g). Aralashma 10 minut davomida chayqatilib turiladi va undan keyin adsorbentni 15000 g/min tezlikda 30 minut sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi va tiniq supernatant hosil bo'lishi kuzatiladi (6-fraksiya).

Oqsil eritmasini atseton yordamida konsentrlash. Oqsilni konsentrlash uchun 6-fraksiyaga teng hajmda -10°C gacha sovitilgan atseton asta-sekinlik bilan qo'shib boriladi, bunda haroratning 0°C dan oshib ketmasligini nazorat qilish zarur. Atsetonning so'nggi ulushini qo'shib bo'lgandan 10 minut o'tgandan keyin sutsimon oq emulsiya hosil bo'ladi, u 15000 g/min tezlikda sentrifugalanadi. Hosil bo'lgan cho'kma pH ko'rsatkichi 8,0 bo'lgan 0,2 M tris eritmasi (6-fraksiya hajmini 1/100 qismi hisobida) da eritiladi va pH ko'rsatkichi 7,0 ga teng bo'lgan 0,01 M fosfat

eritmasining 1000 karra hajmiga nisbatan bir kecha davomida dializlanadi. Olingan eritma 7-fraksiya hisoblanadi.

Kristallizatsiya. 7-fraksiyaning oqsil konsentratsiyasi 30 mg/ml bo'lgan eritmasini neytrallangan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning to'yingan eritmasidan qo'shib, 0,45 darajasigacha to'yintiriladi. Bunda eritmaning qayishqoqligi kuchayadi. Paydo bo'lgan cho'kma zudlik bilan ajratib tashlanadi va keyin eritmani to'yinish darajasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning to'yingan eritmasidan foydalanib, 0,48-0,50 ga yetkaziladi. Asta-sekin shoyisimon ipchalarga o'xshash cho'kma hosil bo'ladi. Keyingi kunlari eritmaning to'yinish darajasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning to'yingan eritmasi yordamida 0,1-0,2 ga oshirib boriladi. Aralshmaning to'yinish darajasi 0,8 ga yetgandan 2 kun keyin fermentativ faollikka ega bo'lgan oqsil kristallanadi. Oqsil cho'kmasini ajratib olish uchun aralashma 20000 g/min tezlikda 60 minut sentrifugalanadi. Cho'kma glyukozafosfatizomeraza hisoblanib, uni pH ko'rsatkichi 7,0 ga teng bo'lgan 0,1 M fosfat buferida eritib, bu fermentning faolligini aniqlashga qaratilgan keyingi tajribalarda foydalaniladi.

Glyukozafosfatizomeraza fermentini faolligini aniqlash

Glyukozafosfatizomeraza fermentini faolligini ikki xil uslubda: kimyoviy va enzimatik uslublarda aniqlash mumkin. Kimyoviy uslubda aniqlash fruktoza-6-fosfatni rezorsin (Selivanov reaktivi) bilan reaksiyasiga asoslangan.

Kerakli reaktivlar:

1. 5×10^{-2} M tris-HCl bufer eritmasi, pH – 8,5;
2. 5×10^{-2} M tris-HCl bufer eritmasida tayyorlangan 1×10^{-2} M glyukoza-6-fosfat eritmasi;
3. Selivanov reaktivi (0,05 g rezorsin 100 ml 20 % li HCl da eritib tayyorlanadi);
4. Yuqoridagi uslublar asosida ajratib olingan glyukozafosfatizomeraza preparati faolligini aniqlashdan oldin bidistillangan suvda 0,5-1,0 mg/ml konsentratsiyada suyultiriladi.

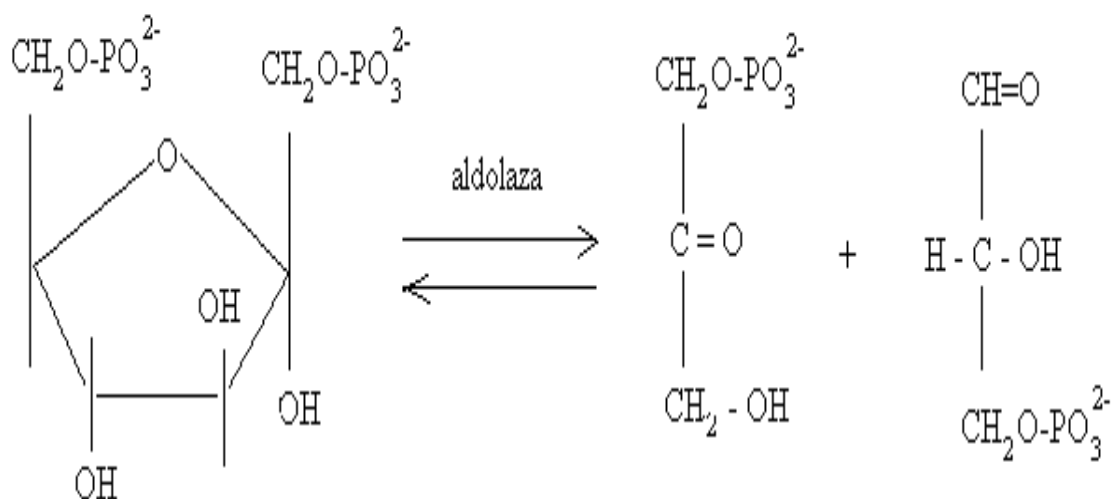
Ish tartibi: To'rtta probirka olib, har biriga 0,1 ml dan glyukoza-6-fosfat va 0,35-0,37 ml tris-HCl bufer eritmalaridan solinadi. So'ng 2-3 minut intervalda navbatma-navbat 0,04 ml ferment eritmasi tomizilib aralashtiriladi va reaksiyaning boshlanish vaqti sekundomerda qayd qilinadi. Inkubatsiya 30°C li suv hammomida

o'tkaziladi. Reaksiyani to'xtatish uchun ma'lum vaqt birligida (1,2,3, ... minut) har bir probirkaga 8,3 n HCl dan 3,5 ml dan solinadi. Bundan keyin fruktozani miqdorini aniqlash tajribasi o'tkaziladi. Nazorat namunasi uchun ferment eritmasi o'rniga bidistillangan suvdan foydalaniladi. So'ng ferment preparatining solishtirma faolligi hisoblab chiqiladi.

4-AMALIY ISH:

Mavzu: Aldolaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

Aldolaza fermenti fruktoza-1,6-difosfatni 3-fosfoglitseraldegid va fosfodioksiatsetongacha parchalanish reaksiyasini katalizlaydigan ferment hisoblanadi:



fruktoza-1,6-difosfat

fosfodioksiatseton

3-fosfoglitseraldegid

Mushak to'qimasining aldolaza fermenti molekulyar og'irligi 160000 Da bo'lgan tetramer hisoblanadi. Mixaelis konstantasi (pH – 7,1, 25 °C da) fruktoza – 1,6 – difosfat uchun $1,4 \times 10^{-5}$ M, pH – optimumi 7,0 ga teng.

Quyong mushagidan aldolaza fermentini ajratib olish

Kerakli reaktivlar:

1. Ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi, pH – 7,5 va 5,7;

2. 5 mM EDTA eritmasi, pH – 7,5;

3. Ammiak.

Barcha reaktivlarni bidistillangan suvda tayyorlanadi.

Ekstraksiyalash. Sovitilgan quyon mushaklari go`sht maydalagichdan o`tkaziladi. Maydalangan go`shtdan 200-300 g olib, unga teng hajmda 5 mM EDTA eritmasi qo`shib, 10 minut aralashtiriladi va so`ng sentrifugalanadi. Cho`kmaga dastlabki olingan hajmda EDTA eritmasi qo`shiladi va ekstraksiya yana takrorlanadi hamda resentrifugalanadi. So`ng oldingi va keyingi ekstraktlar birlashtiriladi.

Ammoniy sulfat bilan fraksiyalash. Ekstraktning pH ko`rsatkichi ammiak qo`shib 7,5 ga yetkaziladi. Unga teng hajmda to`yingan ammoniy sulfat eritmasi (pH – 7,5) qo`shiladi va aralashtiriladi hamda 10-15 minut tinch qoldirilgandan keyin sentrifugalanadi. Supernatantning to`yoinish darajasini 0,52 ( har 100 ml ga 4 ml dan pH ko`rsatkichi 7,5 bo`lgan to`yingan ammoniy sulfat eritmasi qo`shib) ga yetkaziladi. Bundan keyin ammiak qo`shib, pH 8,5 gacha oshiriladi. Hamma ishlar sovuq sharoitda olib boriladi. Aralashma bir kecha sovuq sharoitda qoldiriladi. Kristallizatsiyani kuchaytirish uchun aralashmani sovutib, so`ng xona haroratida eriguncha saqlab va keyin yana sovutish orqali tezlashtirish mumkin. Aralashma sentrifugalanib, cho`kmasi ajratiladi.

Qayta kristallash. Cho`kma 5 mM EDTA (pH – 7,5) yordamida oqsil konsentratsiyasi 1-2 % bo`lishini inobatga olib eritiladi. Aralashmaga asta-sekinlik bilan ammoniy sulfatning to`yingan eritmasi (pH ko`rsatkichi 7,5) dan qo`shib aralashtiriladi va amorf cho`kma hosil bo`lgunicha qo`shib boriladi. Bu amorf cho`kma sentrifugalash yo`li bilan ajratiladi va tashlab yuboriladi. Sentrifugatga kristallizatsiya boshlanguncha ammoniy sulfat eritmasi qo`shiladi. Aldolazaning kristallari suspenziya holida ammoniy sulfating yarim to`yingan eritmasida sovitkichda saqlanadi.

Aldolaza fermentini faolligini aniqlash

Aldolaza fermentining faolligini aniqlashning ham kimyoviy va enzimatik uslublari mavjud. Quyida kimyoviy uslubda aldolaza fermentining faolligini aniqlash usuli bayoni keltirilgan.

Aldolaza fermenti faolligini aniqlash uslubi ishqoriy-labil triozofosfatdagi fosfatni miqdoriy ko'rsatkichini aniqlashga asoslangan. Reaksiya fosfotriozalarni bir-biriga bog'lovchi sianid ishtirokida yuz beradi.

Kerakli reaktivlar:

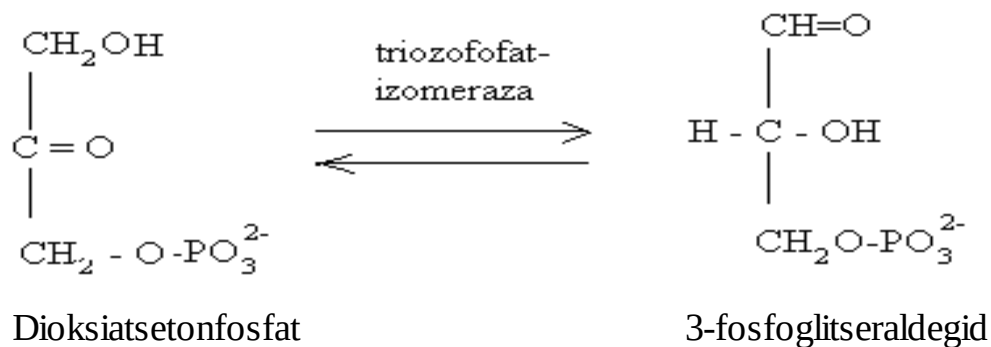
1. 0,1 M glitsin bufer eritmasi, pH - 9,0 (EDTA nig 5 mM eritmasida tayyorlangan);
2. 0,01 M fruktoza-1,6-difosfat eritmasi (0,1 M glitsin bufer eritmasi (pH - 9,0) da tayyorlangan);
3. 0,1 M KCN eritmasi (sianid bilan olib boriladigan ishlarda avtomatik pipetkadan foydalanib, ishni mo'rili shkafda olib boorish kerak);
4. 2 n NaOH eritmasi;
5. 2 n HCl eritmasi;
6. Fiske-Subbarou uslubida fosforni aniqlash uchun kerak bo'lgan reaktiv.

Ish tartibi: To'rtta probirka olib, ularga 0,1 ml dan fruktoza-1,6-difosfat va 0,2 ml KCN eritmalari solinadi. So'ng 2-3 minut intervalda sekundomerda qayd qilib, har bir probirkaga 0,1 ml aldolazali eritma solinadi. Birinchi probirkadagi inkubatsiyani 30 sekund, ikkinchisida 60 sekund, uchinchisida 90 sekund va to'rtinchisida 120 sekund o'tgandan keyin NaOH ning 2 n eritmasidan 0,4 ml dan qo'shib reaksiya to'xtatiladi. Namunalardagi aralashmalar yaxshilab aralashtirilgandan keyin 20 minut davomida xona haroratida qoldiriladi va bundan keyin 2 n HCl yordamida neytrallanadi. So'ng aralashmalar tarkibidagi anorganik fosfor miqdori aniqlanadi. Nazorat namunasi sifatida aldolaza o'rniga 0,1 M glitsin buferi qo'shilgan namunadan foydalaniladi.

5-AMALIY ISH:

Mavzu: Triozofosfatizomeraza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

Triozofosfatizomeraza fermenti dioksiatsetonfosfatni 3-fosfatglitseraldegidga aylanish reaksiyasini katalizlaydi:



Bu ferment molekulyar massasi 54000 Da ga teng boʻlgan dimer boʻlib, ikkita bir xil subbirlikdan tashkil topgan. Ferment molekulasida 10 ta sistein qoldigʻi boʻladi. Faollikni namoyon boʻlishi pH koʻrsatkichi 8,0-9,0 gacha boʻlib, ogʻir metallar taʼsirida faolligi toʻxtaydi.

Quy on mushagidan triozofosfatizomeraza fermentini ajratib olish

Kerakli reaktivlar:

1. EDTA ishtirokida (1,5 g/l) qayta kristallangan ammoniy sulfat kukuni;
2. Beta-merkaptioetanol;
3. Atseton;
4. Sefadeks G-100;
5. Tarkibida 3,0 mM EDTA va 1,0 mM beta-merkaptioetanol boʻlgan 0,05 M natriy fosfatli bufer eritmasi, pH – 7,0;
6. Tarkibida 3,0 mM EDTA va 1,0 mM beta-merkaptioetanol boʻlgan 0,05 M tris-HCl bufer eritmasi, pH – 7,5;
7. 1,5 mM EDTA eritmasi, pH – 5,2.

Barcha eritmalar bidistillangan suvda tayyorlanadi.

Ekstraksiyalash. 150 g quy on mushagi sovitilgan goʻsht maydalagichdan oʻtkaziladi. Soʻng maydalangan mushak boʻlakchalariga 200 ml 1,5 mM EDTA eritmasi qoʻshib, 1 minut davomida gomogenatsiyalanadi. Hosil boʻlgan gomogenat 30 minut davomida mexanik aralshtrigich yordamida aralashtiriladi va keyin 10000 g/min tezlikda 15 minut sentrifugalanadi. Supernatant shisha filtr orqali filtrlanadi. Choʻkma 130 ml 1,5 mM EDTA eritmasi qoʻshib takroran gomogenizatsiyalanadi, yana 30 minut aralashtirib, yuqorida keltirilgan tartibda sentrifugalanadi. Ekstraktlar

birlashtirilib, hajmi 1,5 mM EDTA qo'shib 310 ml ga yetkaziladi hamda unga aralashma tarkibidagi merkaptotanolning oxirgi konsentratsiyasi 1,0 mM bo'lgunga qadar beta-merkaptetanol qo'shiladi.

Atseton yordamida fraksiyalash. Mushak ekstraktiga doimo aralashtirib turgan holda va 3 minut davomida 166 ml sovutilgan (-15°C) atseton qo'shiladi. Bunda atsetonning so'nggi konsentratsiyasi 35 % ga yetadi. Aralashmaning harorati 7°C dan oshmasligi kerak. Aralashma 10 minut davomida 10400 g/min tezlikda sentrifugalanadi va hosil bo'lgan cho'kma tashlab yuboriladi. Supernatantga yana atseton qo'shib (1 litr supernatantga 183 ml) uning konsentratsiyasi 45 % ga yetkaziladi. Aralashma 10 minut davomida 10400 g/min tezlikda sentrifugalanadi va yana hosil bo'lgan cho'kma tashlab yuboriladi. Supernatantga yana atseton qo'shib (1 litrga 195 ml) uning so'nggi konsentratsiyasi 54 % ga yetkaziladi. Aralashma yana sentrifugalanadi va supernatant tashlab yuboriladi.

Harorat ta'sirida ishlov berish. Cho'kma tarkibida 3 mM EDTA va 1 mM beta-merkaptotanol bo'lgan ($\text{pH} = 7,0$) 0,05 M natriy fosfatli bufer eritmasini qo'shib, oqsilning konsentratsiyasi 40 mg/ml darajasiga yetkazishni e'tiborga olib eritiladi. Eritma atsetonning qoldiqlaridan xolis bo'lish uchun 25°C da 12 soat davomida magnitli aralashtirgich yordamida aralashtiriladi. Aralashmaning hajmi shu bufer eritmani qo'shish asosida 30 ml ga yetkaziladi va uni 10 minut davomida ko'piklatmasdan asta aralashtirib suv hammomida 51°C gacha isitiladi. Shu holatda aralashma yana 30 minunt saqlanadi. Hosil bo'lgan cho'kma 15400 g/min tezlikda 15 minut sentrifugalash yo'li bilan cho'ktirib olib tashlanadi. Supernatantda oqsilning konsentratsiyasi aniqlanadi.

Gelfiltratsiya. Tarkibida 100 mg oqsili bo'lgan oqsilli eritma (supernatant) sefadeks G-100 to'ldirilgan tarkibida 3 mM EDTA va 1 mM beta-merkaptotanol bo'lgan 0,05 M tris-HCl bilan muvozanatlangan kolonka (2x60 sm li) dan o'tkaziladi. Supernatantning qolgan qismi saqlash uchun olib qo'yiladi va uni kolonkani o'zidan takror va takror gelfiltratsiya qilish uchun foydalanish mumkin. Elyutsiya shu yuqoridagi bufer eritmasi yordamida amalga oshiriladi. Faollik ko'rsatkichi eng yuqori (1000 va undan yuqori) bo'lgan fraksiyalar birlashtiriladi. Nisbiy faollik

birligi sifatida 1 mk mol glitseraldegid-3-fosfatni 1 minut davomida fosfodioksiatsetonga aylanishiga oid ko'rsatkich qabul qilinadi. Birlashtirilgan fraksiyalar gelfiltratsiyada foydalanilgan va oldindan ammoniy sulfat bilan to'yintirilgan tris bufer eritmasiga qarshi dializlanadi. Hosil bo'lgan cho'kma oqsil 20 minut davomida 15900 g/min tezlikda sentrifugalanadi.

Kristallizatsiya. Cho'kma tarkibida 3 mM EDTA va 1 mM beta-merkaptotanol bo'lgan 0,05 M tris-HCl (pH – 7,5) da eritilib, bufer eritmaning oqsil konsentratsiyasi 4,25 mg/ml ga yetkaziladi va ammoniy sulfat kukuni qo'shib, uning to'yinish darajasini 3,4 M gacha yetkaziladi. Bunda hosil bo'lgan cho'kma 20 minut davomida 15900 g/min tezlikda sentrifugalab ajratib olinadi va ajratib olingan cho'kma tashlab yuboriladi. Supernatant yana ammoniy sulfat qo'shib konsentratsiyasi 3,5 M ga yetkaziladi va yuqoridagi tartibda yana sentrifugalash o'tkazilib, ajratib olingan cho'kma tashlab yuboriladi. Supernatant yana ammoniy sulfat qo'shib, aralashmadagi uning konsentratsiyasi 3,6-3,7 M ga yetkaziladi va bir kecha sovuq sharoitda qoldiriladi. So'ng sentrifugalsh yo'li bilan cho'kma, ya'ni ferment preparati ajratib olinadi va undan tajribalarda foydalaniladi.

Triozofosfatizomeraza fermentini faolligini aniqlash

Triozofosfatizomeraza fermentini faolligini aniqlash fermentlarning o'zaro bog'langan tizimida olib boriladi va bunda qo'shimcha ferment sifatida glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza fermentidan foydalaniladi. Fermentativ reaksiya uchun substrat vazifasini fosfodioksiatseton bajaradi. Reaksiyani borishini spektrofotometr orqali NADH ni oshishini baholash yo'li bilan qayd qilinadi.

Kerakli reaktivlar:

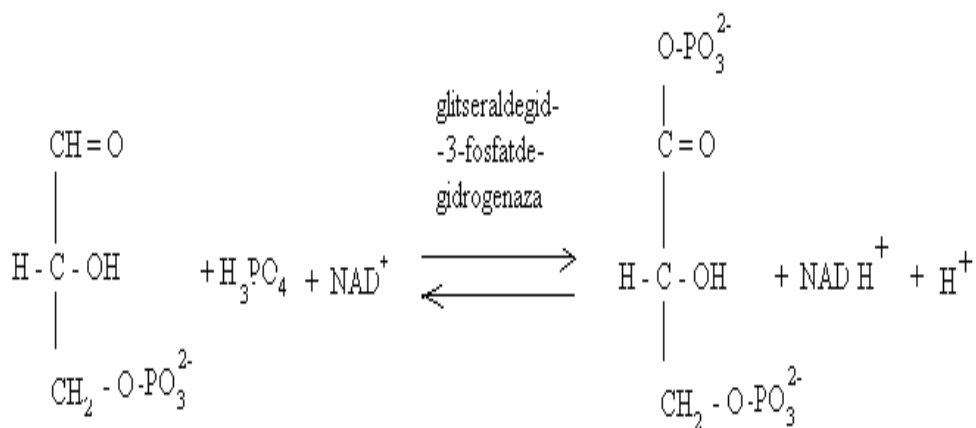
1. 0,02 M trietanolamin-HCl bufer eritmasi, pH – 7,9;
2. Fosfodioksiatseton;
3. NAD;
4. Glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza fermenti kristall suspenziyasini 5 mM EDTA (pH – 7,5) eritmasida oqsil miqdori 3-5 mg/ml konsentratsiyasi bo'lguncha eritib tayyorlangan aralashma.

boʻlgan reaksiya aralashmasi solinadi. Bu aralashma 6,0 mM dioksiatseton, 6,0 mM NAD^+ , 14 mM natriy arsenat, 50-70 mkg glitseraldehid-3-fosfatdehidrogenaza va 20 mM etanolamin buferdan tashkil topadi. Reaksiyani aralashmaga 0,03-0,05 ml triozofosfatizomeraza fermentini qoʻshish bilan boshlanadi. Fermentativ faollikni optik zichlikning 340 nm da oshib borishini kuzatish orqali aniqlanadi. Fermentning nisbiy faolligi hisoblab topiladi. Oqsilning miqdori spektrofotometrik uslubda aniqlanadi (1 ml eritmada 1 mg ferment boʻlganda 280 nm da optik zichlik 1,31 ga teng boʻladi).

6-AMALIY ISH:

Mavzu: D-glitseraldegid-3-fosfatdehidrogenaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

D-glitseraldegid-3-fosfatdehidrogenaza fermenti glitseraldegid-3-fosfatni fosforlanishli oksidlanish reaksiyasini katalizlaydi:



D-glitseraldegid-3-fosfat

1,3-difosfoglitserin kislota

Bu fermentning molekulyar og'irligi 144000 Da ga teng tetramer bo'lib, to'rtta bir xil subbirliklardan tashkil topgan. Har bir subbirlikda katalitik markaz bo'lib, ular o'ziga bittadan NAD ni biriktira olish xususiyatiga ega bo'ladi. Mixaelis konstantasi glitseraldehid-3-fosfat uchun – $0,5 \times 10^{-4}$ M, NAD uchun – $1,0 \times 10^{-4}$ M, H_3PO_4 uchun

– $1,0 \times 10^{-3}$ M ga teng. Ogʻir metal tuzlari ingibitorlovchi omil hisoblanadi. D-glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza fermentini quyon mushagidan ham, xamirtirushdan ham ajratib olish mumkin.

Quyon mushagidan glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza fermentini ajratib olish

Kerakli reaktivlar:

1. 5,0 mM EDTA eritmasi, pH – 7,5;
2. EDTA ishtirokida (1,5 g/litr) qayta kristallangan ammoniy sulfat kukuni;
3. Ammiak.

Barcha eritmalar tarkibida 5,0 mM EDTA boʻlgan bidistillangan suvda tayyorlanadi.

Ekstraksiyalash. Barcha ishlar sovuq sharoitda oʻtkaziladi. Quyonning mushagi goʻsht matdalagichdan oʻtkaziladi. Maydallangan mushakka 1,5 hajm tarkibida 5,0 mM EDTA boʻlgan suv qoʻshiladi va mexanik aralashtirgich yordamida 40 minut aralashtirilib turiladi. Ekstrakt bir soat davomida 2500 g/min tezlikda sentrifugalash orqali ajratib olinadi.

Ammoniy sulfat yordamida “tuzlash”. Ekstraktning hajmi oʻlchanadi va unga oz-ozdan ammoniy sulfat (har 100 ml ga 50,5 g) qoʻshib, 0,7 darajagacha toʻyintiriladi. Hosil boʻlgan choʻkma oldin sentrifugalash yoʻli bilan, keyin esa sentrifugatni filtrlash orqali ajratib tashlanadi. Tiniq filtratni pH koʻrsatkichi aniqlanadi va konsentrlangan ammiak yordamida pH 8,5 ga yetkaziladi. Eritma sovuq xonada bir kecha qoldiriladi. Kelasi kun kristallar hosil boʻladi. Ularni sovuq sharoitda 12000 g/min tezlikda sentrifugalash yoʻli bilan ajratib olinadi.

Qayta kristallizatsiyalash. Choʻkma tarkibida 5,0 mM EDTA (pH – 7,5) boʻlgan eritmada tarkibidagi oqsilning miqdori 15-20 mg/ml konsentratsiyaga ega boʻlgunga qadar eritiladi. Tiniq eritmaga magnitli aralashtirgich bilan aralashtirilib turgan holda 100 ml eritmaga 41,8 g hisobida ammoniy sulfatning quruq kukunidan qoʻshiladi va aralashmaning pH koʻrsatkichi 8,5 ga yetkaziladi. Bunda kristallizatsiya yuz beradi va shu holatda bir kecha qoldiriladi hamda ertasi kuni sentrifugalash yoʻli bilan

cho`kma ajratib olinadi. Shu yo`sinda ajratib olingan ferment preparati ammoniy sulfatning 2,4 M eritmasida kristall suspenziyasi holatida saqlanadi.

Glitseraldegid-3-fosfatdehidrogenaza fermentini faolligini aniqlash

Glitseraldegid-3-fosfatdehidrogenaza fermentini faolligini aniqlash spektrofotometrik uslubda olib boriladi va ish to`g`ri reaksiya natijasida optik zichlikning 340 nm dagi o`zgarishini o`lchash orqali amalga oshiriladi.

Kerakli reaktivlar:

1. 0,1 M glitsinli bufer eritma, pH – 8,9;
2. 0,1 M pirofosfatli bufer eritma, pH – 8,3;
3. NAD;
4. 3-fosfoglitseraldregid yoki fosfotriozalar aralashmasi;
5. Natriy arsenat.

Barcha reaktivlar bidistillangan suvda tayyorlanadi.

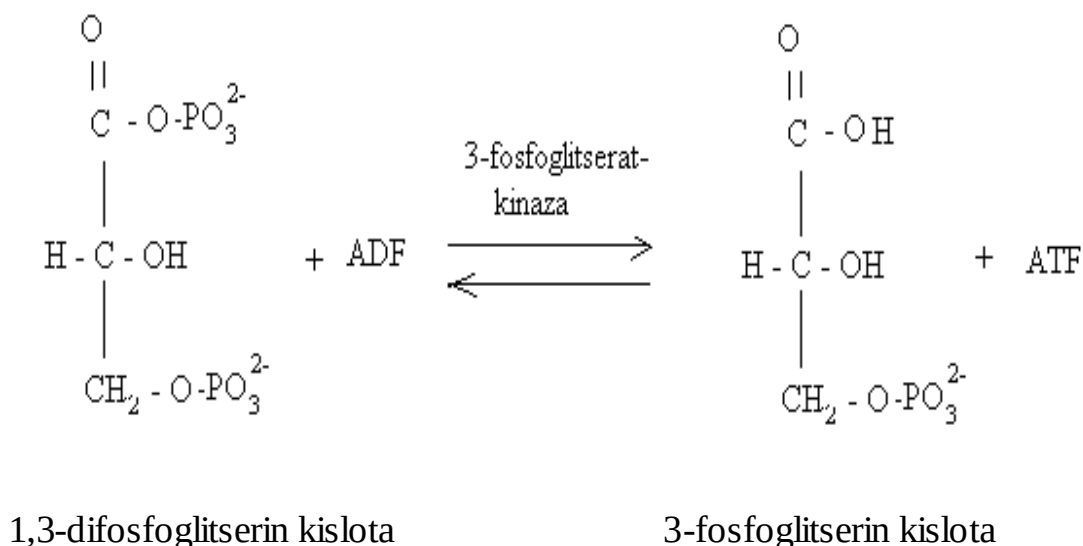
Ish tartibi: Spektrofotometrning kyuvetasiga umumiy hajmi 3 ml bo`lgan reaksion aralashma solinadi. Bu reaksion aralashma pH ko`rsatkichi 8,9 ga teng bo`lgan 1,0 mM fosfoglitseraldegid, 0,5 mM NAD, 5,0 mM natriy arsenat, 0,1 M glitsinli bufer eritmalaridan tashkil topadi. Reaksion aralashmaga tarkibida glitseraldegid-3-fosfatdehidrogenaza fermenti bo`lgan eritmadan 0,03-0,05 ml qo`shish bilan reaksiya boshlanadi. Optik zichlikning 340 nm dan osha borishi 60 sekund davomida qayd qilib boriladi, so`ng fermentning solishtirma faolligi hisoblab topiladi.

Aralashmadagi oqsilning miqdori spektrofotometrik yo`l bilan 280 nm da oqsil bilan bog`langan koenzimning miqdoriga qarab aniqlanadi (1ml ni tarkibida 1 mg oqsil bo`lgan apoenzimning optik zichligi 0,82 ga teng bo`ladi). Fermentning xossalari yuqorida keltirilgan uslublar asosida o`rganiladi.

7-AMALIY ISH:

Mavzu: Fosfoglitsierokinaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash

3-fosfoglitsierokinaza 1,3 – difosfatglitsierin kislotasining 1-o`midagi fosfat kislotaga qoldig`ini ADF ga ko`chirish reaksiyasi natijasida ATF va 3-fosfoglitsierin kislotasi hosil bo`lish reaksiyasini katalizlaydi:



Bu fermentning molekulyar og`irligi 47000 Da, bitta polipeptiddan iborat, tarkibida 420 ta aminokislotaga qoldig`i tutadi. Mixaelis konstantasi ATF uchun – $1,1 \times 10^{-4}$ M, 3-fosfoglitsierin kislotasi uchun – $1,8 \times 10^{-4}$ M, ADF uchun – $2,0 \times 10^{-4}$ M, 1,3-difosfoglitsierin kislotasi uchun – $1,8 \times 10^{-6}$ M, Mg^{2+} uchun – $2,5 \times 10^{-4}$ M ga (fosfat bufer, pH – 6,9, 25 °C) ga teng. Ferment Mg^{2+} ionlari yordamida faollanadi, og`ir metall tuzlari uning faolligini ingibirleydi. Optimum faollik pH ko`rsatkichi 6,0-9,2 chegarasida bo`lganda namoyon bo`ladi.

Quyong mushagidan 3-fosfoglitsieratkinaza fermentini ajratib olish

Kerakli reaktivlar:

1. Tarkibida 0,01 M EDTA bo`lgan 0,4 M natriy fosfat bufer eritmasi, pH – 7,6;
2. EDTA ishtirokida (1,5 g/l) qayta kristallangan ammoniy sulfat kukuni;
3. 0,05 M trietanolaminli bufer eritma, pH – 8,0;
4. Tarkibida 1,0 mM EDTA bo`lgan 0,1 M ammoniy sulfat eritmasi;
5. Sefadeks G-75;

6. DEAE – sefadeks.

Barcha eritmalar bidistillangan suvda tayyorlanadi.

Ekstraksiyalash. Ish sovuq sharoitda olib boriladi. 500 g quyon go'shti go'sht maydalagichdan o'tkaziladi va tarkibida 0,01 M EDTA bo'lgan 0,1 M fosfat bufer eritmasi (pH – 7,6) ning besh karra hajmida suspenziyalanadi. Mexanik aralashtirgich yordamida 3 soat aralashtirilib turiladi, so'ng 22000 g/min tezlikda bir soat sentrifugalanadi.

Ammoniy sulfat yordamida fraksiyalash. Ekstraktga asta-sekin (bir soat davomida) yaxshi maydalangan ammoniy sulfatning kukuni qo'shib boriladi va uning konsentratsiyasi 2,4 M ga yetkaziladi. Bundan keyin suspenziyani mexanik aralashtirgich yordamida 6 soat aralashtirib turiladi. Cho'kma 15000 g/min tezlikda 40 minut sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi va tashlab yuboriladi. Supernatantga ammoniy sulfat qo'shib, uning konsentratsiyasi 3,2 M ga yetkaziladi. Aralashma ikki soat tinch holatda qoldiriladi va cho'kmasi 15000 g/min tezlikda 30 minut sentrifugalash yo'li bilan cho'ktirib olinadi hamda ajratib olingan cho'kmadan keyingi bosqich ishlarda foydalaniladi.

Harorat yordamida ishlov berish. Olingan cho'kmaning 1/4 qismi pH ko'rsatkichi 7,6, tarkibida ammoniy sulfat bo'lgan 0,05 M trietanolaminli bufer eritmada oqsil konsentratsiyasi 40 mg/ml darajaga yetgunicha qo'shib eritiladi va 5 minut davomida 50 °C da inkubatsiyalanadi. So'ng tezda muz solingan idishga qo'yib sovutiladi va bunda denaturatsiyaga uchragan bir qism oqsil 15000 g/min tezlikda 40 minut sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinib, tashlab yuboriladi. Sentrifugatdagi oqsilni ammoniy sulfatni kukunini aralashmadagi konsentratsiyasi 3,2 bo'lgunga qadar yetkazib, sentrifugalash yo'li bilan cho'ktiriladi. Cho'kma tarkibida 0,01 M EDTA bo'lgan suvda eritiladi va xuddi shu eritmaga qarshi dializlanadi. Dializdan so'ng oqsilning aralashma tarkibidagi konsentratsiyasi 50-60 mg/ml bo'lib qoladi. Undan tozalashning keyingi bosqichlarida foydalaniladi.

Gelfiltratsiya. Buning uchun 2x40 sm li kolonka tayyorlanadi. U sefadeks G-75 bilan to'ldirilib tarkibida 1,0 mM EDTA bo'lgan 0,1 M ammoniy sulfat eritmasi bilan muvozanatlanadi. Kolonkaga oqsil eritmasidan 2 ml kiritib, muvozanatlash uchun

foydalanilgan eritma bilan elyutsiyalanadi. Elyuatlarda fermentativ faollik va oqsil miqdori aniqlanadi. Bundan keyin fermentativ faollikni namoyon qilgan fraksiyalar birlashtiriladi. Gelfiltratsiyani yangi olingan oqsil namunasi bilan takrorlash mumkin. So`ng birlashtirilgan elyuatlarga ammoniy sulfat kukuni qo`shib, konsentratsiyasi 3,2 M ga yetkaziladi va sentrifugalab cho`ktiriladi. Cho`kma tarkibida 1,0 mM EDTA bo`lgan 0,01 trietanolaminli (pH – 8,0) bufer eritmada eritiladi va shu buferga qarshi dializlanadi.

DEAE-sefadeksda xromotografiya. DEAE-sefadeks to`ldirilgan kolonka (1,5x40 sm li) tayyorlanadi. Kolonka yuqorida ko`rsatilgan bufer eritma yordamida muvozanatlanadi. Kolonkaga 3 ml da eritilgan 100 mg oqsil kiritiladi va shu bufer eritmani o`zi yordamida elyutsiya o`tkaziladi. Elyuatlar tarkibida oqsilning miqdori va ularning fermentativ faolligi aniqlanadi. Fermentativ faolligi yuqori bo`lgan fraksiyalar birlashtiriladi. Bu aralashmaga ammoniy sulfat tuzi kukuni qo`shib, uning konsentratsiyasi 3,0 M ga, pH ko`rsatkichi esa 6,0 ga tenglashtiriladi. Bunda 90 % oqsil ammorf cho`kma holida cho`kadi.

3-fosfoglitseratkinaza fermentini faolligini aniqlash

3-fosfoglitseratkinaza fermentini faolligini aniqlashda bu ferment glitseraldehid-3-fosfatdehidrogenaza fermenti bilan o`zaro bog`langan tizim ekanligini inobatga olib, qo`shimcha ferment sifatida glitseraldehid-3-fosfatdehidrogenaza fermentidan foydalaniladi. Bu ferment ishtirokida tizimga NADH kiritish evaziga 1,3-difosfoglitserin kislotani 3-fosfoglitseraldehidgacha qaytarilishi sodir bo`ladi. Reaksiya tezligini 340 nm da optik zichlikning kamayishini baholash orqali aniqlash mumkin.

Kerakli reaktivlar:

1. Tarkibida 8,0 mM $MgSO_4$ bo`lgan 0,08 M trietanolaminli bufer eritma, pH - 7,6;
2. NADH;
3. ATF;
4. 3-fosfoglitserin kislota;

5. Gitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza;
6. Yuqoridagi tajribada ajratib olingan kristall suspenziyani tarkibida 5,0 mM EDTA (pH – 7,5) boʻlgan bidistillangan suvda eritilib, konsentratsiyasi 3-5 mg/ml ga yetkazilgan aralashma.

Ish tartibi: Umumiy hajmi 3 ml boʻlgan reaksiyon muhit tarkibida 7,0 mM MgSO_4 ; 0,25 mM NADH; 2,4 mM ATF; 12,0 3-fosfoglitserin kislota va 50 mkg glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza boʻlgan 8,0 mM trietanolaminli bufer eritmadan iborat boʻladi. Reaksiya tarkibida 0,03-0,05 ml 3-fosfoglitseratkinaza boʻlgan eritmani qoʻshish asosida boshlanadi. Reaksiyani 340 nm da optik zichlikning oʻzgarishini kuzatish asosida baholanadi. Fermentning solishtirma faolligi yuqorida keltirilgan uslublar yordamida aniqlanadi, oqsil miqdori esa spektrofotometrik va Louri usullarida aniqlanadi. Fermentning xossalari yuqorida keltirilgan uslublar asosida oʻrganiladi.

Foydalanilgan adabiyotlar ro`yxati

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. -М: Медицина, 1990.
2. Биотехнология. Под ред. А.А.Баева. -М: Наука, 1984.
3. Бохински Р.Современные воззрения в биохимии. -М: Мир, 1987.
4. Диксон Н., Уэбб Э. Ферменты. 3 том. -М: Мир, 1982.
5. Дроздов Н.С., Матеранская Н.П., Практикум по биологической химии. - М: Высшая школа, 1970.
6. Кретович В.А. Введение в энзимологию. -М: Наука, 1986.
7. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к практичским занятиям по биологической химии. -М: Медицина, 1974.
8. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. -М: Мир, 1970.
9. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. -М: Просвещение, 1987.
10. Практикум по биохимии. Под ред. Мешковой Н.П. -М: МГУ, 1979.
11. Туракулов Ё.Х. Биохимия. -Тошкент: Ўзбекистон, 1994.
12. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Леман И. Основы биохимии. Перевод с английского д.х.н. Л.М.Ликодмана под ред. Овчинников Ю.А. -М: Мир, 1981.
13. Қосимов А.К., Қўчқоров Қ. Қ., Муборакова Д. Х. Биохимиядан амалий машғулотлар. Тошкент: Ўқитувчи, 1989.
14. <http://www.nauka.ru>
15. <http://www.wikipedia.ru>
16. <http://www.bioximii.ru>

MUNDARIJA:

Kirish	3
1. FERMENTLARNI O`RGANISH USLUBLARI	5
1-Laboratoriya ishi. Fermentlarni preparativ ajratib olish, tozalash va xossalarini o`rganish.....	6
2-Laboratoriya ishi. Fermentativ reaksiyalar kinetikasi.....	10
3-Laboratoriya ishi. Fermentlarning xossalarini o`rganish.....	16
2. FERMENTLARNI AJRATISH, TOZALASH VA FAOLLIGINI ANIQLASH	27
1-Amaliy ish. Geksokinaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	27
2-Amaliy ish. Glikogenfosforilaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	31
3-Amaliy ish. Glyukozafosfatizomeraza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	35
4-Amaliy ish. Aldolaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash.....	40
5-Amaliy ish. Triozofosfatizomeraza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	42
6-Amaliy ish. D-glitseraldegid-3-fosfatdegidrogenaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	46
7-Amaliy ish. Fosfoglitserokinaza fermentini ajratish, tozalash va faolligini aniqlash	49
Foydalanilgan adabiyotlar ro`yxati	53