

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА ТАЪЛИМ
ВАЗИРЛИГИ**

ТОШКЕНТ КИМЁ - ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

**«ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ»
ФАКУЛЬТЕТИ**

«БИОТЕХНОЛОГИЯ» КАФЕДРАСИ

**«Биотехнологик изланишларининг
методологик асослари»**

ФАНИДАН ЛАБОРАТОРИЯ МАШҒУЛОТЛАРИ

ТОШКЕНТ – 2017

доцентлар Д.Қ.Максумова, Ш.М.Маматов “Асосий биотехнологик тадқиқот методологияси” фанидан лаборатория машғулоти учун услубий қўлланма. Тошкент,: ТКТИ, 2016. - 32 бет.

Аннотация: “**Битехнологик изланишларнинг методологик асослари**” фанидан амалий машғулоти учун услубий қўлланма 5А320501-Биотехнология (озиқ-овқат, озуқа, кимёвий маҳсулотлар ва қишлоқ хўжалиги учун биопрепаратлар ишлаб чиқариш) мутахассислиги бўйича таҳсил олаётган магистрантларга мўлжалланган.

Тақризчилар:

Ж.Э. Сафаров - Тошкент давлат техника университети, «Қишлоқ хўжалик техникаси ва сервис», кафедраси мудири, т.ф.н.

А.Ж.Чориев - Тошкент кимё-технология институти , «Озиқ-овқат хавфсизлиги», кафедраси мудири, т.ф.н. доцент.

Ушбу маърузалар матни ТКТИ “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” факультети, “Биотехнология кафедраси” йиғилишида муҳокама қилинган ва факультет Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқиш учун тавсия этилган. Баённома № __, “__” 2017 й.

Кафедра мудири,
доцент

Маматов Ш.М.

Ушбу маърузалар матни «Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси» факультети Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва чоп этиш учун тавсия этилган. Баённома № __ “__” 2017йил

Факультет Илмий-услубий Кенгаш раиси,
доцент
О.Қ.

Юнусов

Ушбу маърузалар матни ТКТИ Ўқув-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва чоп этиш учун тавсия этилган. Баённома № __, “__” 2017йил

Институт Ўқув-услубий Кенгаш раиси,
доцент

Муталов Ш.А.

ЛАБОРАТОРИЯ МАШҒУЛОТЛАРИДА АМАЛ ҚИЛИНАДИГАН ЛАБОРАТОРИЯ ҚОНУН ҚОИДАЛАРИ

Талабалар лаборатория ишларини бажаришга техника ва ёнғинга қарши хавфсизлик қоидаларини ўқиб ўзлаштирганлари, ҳамда махсус журналда рўйхатга олинганларидан сўнг қўйиладилар.

Техника ва ёнғинга қарши хавфсизлик қоидалари талабларини бажаришга талабалар шахсан жавобгардирлар. Лабораторияда ишлаганда улар асосий этиборни қуйидаги талаб ва тавсияларга қаратишлари керак: Лаборатория ишларини бажаришни фақат услубий қўлланмалар асосида амалга ошириш керак. Ишни бажаришда талабалар фақат химояловчи устки кийимлари-халатлари бўлсагина қўйиладилар. Кимёвий реактивлар билан ишлаганда уларнинг қўлга тўкилишига йўл қўймаслик, қўлларни кўзларга ва юзга теккизмаслик керак. Кимёвий моддаларни таъмини кўриш ман этилади; моддаларни хидини уларнинг буғларини ёки газларини қўл билан елпиб туриб, ўзига йўналтириб, чуқур нафас олмай хидлаш мумкин. Ишдан сўнг қўлларни тозалаб ювиш керак. Лабораторияда овқатланиш ман этилади. Лабораторияда фақат этикеткали кимёвий идишда турган, номи маълум реактивлардан фойдаланиш керак. Ишқор ва кислоталар, ҳамда бошқа ўювчи ва захарли суюқликлар хажмини фақат ўлчаш цилиндри, автоматик пипетка ёки махсус резинали пипеткаларда ўлчашга рухсат берилади. Суюқлик қуйиладиган, қиздириладиган идишга яқин энгашиб қарашлик ман этилади, чунки суюқликни сачраган томчилари юзга ёки кўзларга тегиши мумкин. Суюқликни зич ёпилган идишда қайнатиш ман қилинади. Ёнгил учувчан моддаларнинг ажралиб чиқиши билан боғлиқ бўлган, кислотали, аммиакли, эритмаларни қайнатиш ва буғлатиш ишлари, диэтил эфири ва бошқа эритувчилар билан ишлаш, таҳлил қилинадиган моддаларни ёндириш ишларини фақат ёқилган актив вентиляция шкафида (тяга остида) бажаришга рухсат берилади. Ёнгил ёнувчан моддалар (диэтил

эфир, ацетон, спирт ва бошқа эритувчилар) билан очик электр иситиш жихозлари яқинида ишлаш ман қилинади. Иссиқ суюқлик солинган колба ва стаканни олиб юрганда ниҳоятда эҳтиёт бўлиш керак. Лабораторияда асосан тик туриб ишлаш керак; фақат ёнғин, сачраш ва портлаш хавфи бўлмаганда ўтириб ишлаш мумкин. Лабораторияда ёлғиз бир киши ишлаши ман этилади. Электр жихозлар билан ишлаганда, шу жихоз билан ишлашнинг барча қоидаларига қатъий амал қилиш керак. Электр тармоғига уланган ускунани қўзғатиш ёки таъмирлаш ман этилади.

Ёқилиб, ишлаб турган жихозларни назоратсиз қолдириш қатъиян ман қилинади. Ўта хавfli ишлар бажарилганда (ёниш, портлаш, иссиқ ва агрессив уюқликларни сачраш хавфи бўлса) органик шишадан ясалган химояловчи тўскич, қўзойнак ёки химояловчи экран тутиш зарур. Газли горелкалар билан ишлаганда, газнинг тўлиқ ёниши ва хонанинг газланмаслигини назорат қилиш зарур. Шиша идишлар билан ишлаганда шишали қисми бўлган қурилма ва жихозларни йиғиш ва ажратишда қуйидаги эҳтиёткорлик чораларига амал қилиш керак. Шиша найчаларни пўкак тикинларга ёки резинали найчаларга ўрнатишдан олдин уларни сувли глицеринга ёки вазелин мойига ботириб олиш керак. Бунда шиша идиш сочиқ билан ўраб ушланиши керак. Шиша колбани тикин билан ёпаётганда колба бўйнининг энг юқори қисмидан, тикинга яқинроқ ушлаш зарур. Бунда колба сочиқ билан ўралган бўлиши керак. Эритувчилар, концентирланган кислоталар ва ишқорлар ҳамда бошқа ўювчи суюқликлар қолдиқларини канализацияга фақат махсус қайта ишлашдан сўнг (нейтраллаш, хайдаш, зарарлантириш) тўкиш мумкин. Агар ёнувчи суюқликлар ёки бошқа моддалар алангаланса, электириситиш жихозларини ўчириб, енгил ёнувчи суюқликлар турган идишларни оловдан узоқроққа олиб, ёнғинни ўчириш чораларини кўриш керак. Лабораторияда тартиб ва тозаликни сақлаш зарур. Иш тугагач электр жихозлар ва электр тармоғи ўчирилиши шарт. Ифлос лаборатория идишлари ювилиб, иш жойи тозаланиб, қўллар совунлаб ювилиб, сув

крани ёпилиши керак. Озиқ-овқат маҳсулотлари ишлаб чиқариш корхоналарида меҳнатни муҳофаза қилиш, хавфсизлик техникасини таъминлаш, назорат қилиш бўйича санитария-гигиена талаб ва меъёрларини қуйидагича амалга оширилади. Озиқ-овқат маҳсулотлари ишлаб чиқариш корхонасининг ҳар бир ишчиси ишлаб чиқаришнинг техника хавфсизлик ва шахсий санитария гигиена қоидаларини яхши билмоғи зарур. Корхонага ишга кираётган ҳар бир ходим техник хавфсизлиги бўйича махсус инструктаждан ўтиши шарт. Мураккаб асбоб-ускуналарга хизмат қилувчилар махсус тайёргарликдан ўтадилар ва шу ускунада ишлаш ҳуқуқини олиш учун имтиҳон топширадилар. Бўлимма ходимларининг техника хавфсизлиги бўйича билимлари мунтазам равишда текширилиб борилади. Озиқ-овқат саноат корхоналари хоналаридаги ҳавонинг санитария томондан тозалигига алоҳида эътибор қаратилиши зарур. Бўлимларда ишчи ва ходимларга мўтадил шароит яратиш учун хоналарнинг ҳавосини сўрувчи вентилятор ёрдамида алмаштириб туриш зарур. Иш хоналарига юбориладиган ҳаво аввал тозаланади ва кейин мўтадиллаштирилади. Ҳаводаги захарли газ ва буғларнинг миқдори вақти-вақти билан назорат қилиб турилади.

Ишни ташкил этишда ёнғин хавфсизлигига алоҳида эътибор қаратиш зарур. Бирламчи ва тайёр маҳсулотлар сақланадиган омборхоналарни жойланиши ва жиҳозланиши ёнғинга қарши қоидалардан келиб чиққан ҳолда амалга оширилиши керак. Ёнғиндан хавфли категорияларга органик эритувчилар, ёқилғи газлари сақланадиган ёки кучли чанг чиқариш билан алоқадор бўлган жараёнлар ўтадиган цехлар киради. Бундай цехлар алоҳида биноларда жойлашиши ёки бошқа цехлардан ёнғин ва портлашдан сақлайдиган деворлар билан ажратилган бўлиши керак.

1-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ
БАЛИҚ МОЙИ ТАРКИБИДАГИ ВИТАМИН А
МИҚДОРНИ
ЮҚОРИ САМАРАЛИ СУЮҚЛИК ХРОМАТОГРАФИЯСИ
УСУЛИДА АНИҚЛАШ

Ишдан мақсад: *Балиқ мойи таркибидаги витамин А миқдорини юқори самарали суюқлик хроматографияси усулида аниқлаш*

Юқори самарали суюқлик хроматографияси

Юқори самарали суюқлик хроматографияси суюқлик хроматографияси усулининг бир кўриниши бўлиб, бунда кўзгалувчан фаза – элюент колонкадаги сорбентдан катта тезликда юқори босим остида ўтади. Усул юқори ва куйи молекулали иссиқликка чидамсиз моддаларни ажратиб олишга, уларнинг чинлигини ва миқдорини аниқлашга имкон беради.

Ҳозирги замон хроматографиялари куйидаги қисмлардан ташкил топган: юқори самарали колонка, дозатор, юқори босимли насос, ёзув қурилмали детектор, микропротсессор (расм 31). Хроматографлар, шунингдек намуналарни автоматик равишда колонкага юбориш, режа асосида хроматографиялаш муҳитини ушлаб туриш, ажратиш жараёнининг қулай шароитини автоматик танлаб бериш, таҳлил қилинаётган аралашма таркибидаги моддаларнинг чинлиги ва миқдорини аниқлаб берувчи мосламалар билан таъминланган.

Юқори босимли насос (200-500 атмгача) элюентни берилган доимий тезликда колонкага етказиб беради. Баъзида микроколони хроматографларда нисбатан паст босимли насослар қўлланилади (1-20 атмгача). Хроматографик колонкалар зангламайдиган пўлат (ёкишиша)дан тайёрланган бўлиб, узунлиги 10-25 см, ички диаметри 0,3-

0,8 см (кўпинча 0,4-0,5 см) га тенг. Колонкалар диаметри 5-10 мкм бўлган думалоқ ёки нотекис шаклдаги адсорбент билан юқори босимда суспензион усул ёрдамида тўлдирилади. Суспензион усул билан тўлдирилганда сорбент колонкада бир текис бўлиб зич жойлашади. Микроколоники хроматографларда колоникиларнинг узунлиги ва ички диаметри кичик бўлади (0,1-0,2 см ва ундан ҳам кичик).

Юқори самарали суюқлик хроматографиясида қўлланиладиган адсорбент заррачалари юқори босим остида парчаланмаслиги керак. Зич жойлашган кичик диаметрли (5-10 мкм) адсорбент билан тўлдирилган колоникилар аралашмаларни юқори самарали хроматографик тақсимлаш хусусиятига эга. Хроматографиялаш жараёни кетаётган вақтда колоники харорати $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ аниқликда ушлаб турилади. Хроматографик тақсимланиш кўпинча 20-25⁰ да олиб борилади.

Юқори самарали суюқлик хроматографиясида кўпинча рефрактометрик ёки флюориметрик, тўлқин узунлиги ўзгарувчан (190-900нм) ёки ўзгармайдиган (кўпинча 254 нм) спектрофотометрик, шунингдек, аланга-ионланиш, электро-кимёвий, масс-спектрометрик ва бошқа детекторлар ишлатилади.

Адсорбент сифатида кўпинча гидроксил гуруҳлар билан қопланган силикагел, турли функционал гуруҳлар билан ишланган силикагел, алюминий оксиди, полимерлар, амалиётда эса тайёр колоникилар ишлатилади. Силикагел билан тўлдирилган колоникилар билан ишлашда элюент сифатида углеводородлар, баъзида эса турли эритувчилар ёки спирт билан аралаштирилган углеводородлардан фойдаланилади.

Гидрофоб гуруҳлар билан қопланган силикагел билан тўлдирилган колоникиларни ювишда эса таркибида қуйи спиртлар ёки атсетонитрил бўлган сувли эритмалар ишлатилади. Баъзида эритувчилар икки марта тозаланган бўлиши керак. Туз, кислота ва асос кўринишидаги органик бирикмаларни ажратишда жуфт-ион хроматографик

усулдан фойдаланилади. Бунда гидрофоб гуруҳлар билан қопланган силикагел адсорбенти, анион ёки катион таркибида гидрофоб гуруҳ сақловчи ионли бирикмалар қўшилган сув-спиртли ёки сув-атсетонитрилли элюентлар ишлатилади.

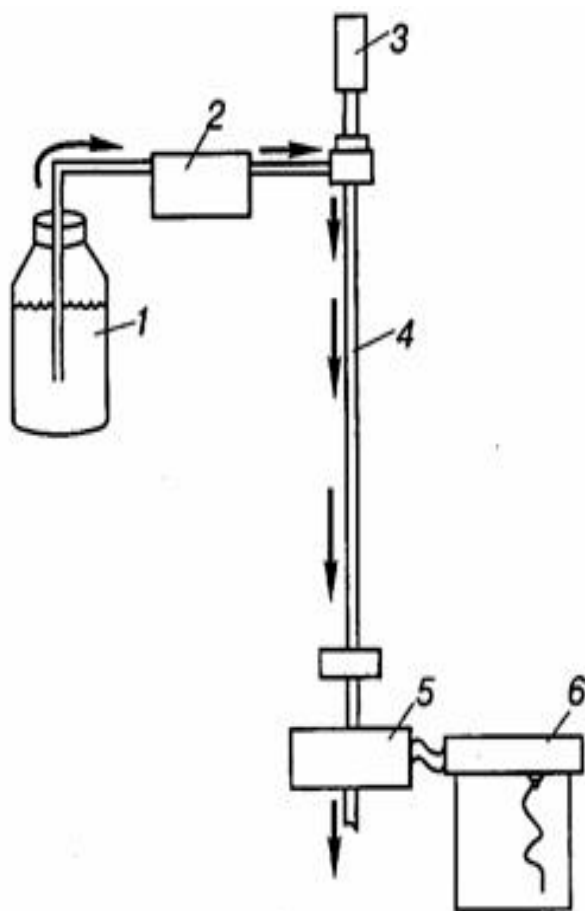
Органик тузилишга эга бўлган анион ва катионларни ион-алмашилиш суюқлик хроматографияси ёрдамида ажратилади. Адсорбентлар сулфо-, карбоксил- ёки аминогуруҳлар билан қопланган бўлиши керак. Элюент сифатида маълум рН муҳитга ва ион кучига эга бўлган сувли буфер эритмалар ишлатилади.

Метал катионлари билан комплекс ҳосил қилувчи моддаларни ажратишда лиганд алмашилиш хроматографияси усулидан фойдаланилади. Таксимланиш ёки моддаларнинг ажралиши текшириладиган бирикмаларнинг координатсион боғлар ҳосил қилиш хусусиятлари ўртасидаги фарққа асосланган бўлиб, кўинча аминокислоталарнинг изомерлари таҳлил қилинади. Адсорбентлар метал ионлари ва ажралаётган модда билан комплекс бирикмалар ҳосил қилувчи гуруҳлар билан қопланган бўлади.

Моддаларнинг ажралиш даражаси хроматограммадаги икки кўшни чўққиларнинг баландликлари ўртасидаги масофа ва хроматографик чизманинг кенглиги бўйича аниқланади. Чўққилар баландлиги ўртасидаги масофа аниқланувчи моддага нисбатан адсорбентнинг селективлигига, кенглиги эса адсорбентнинг жойлашишига ва элюентнинг қуюқлик даражасига боғлиқ. Юқори самарали колонка адсорбентнинг селективлиги кичик бўлса ҳам моддаларни ажратиб бериш хусусиятига эга.

Моддалар миқдорини аниқлашда хроматограмма мутлақ калибрлаш ёки ички стандартлар (газ хроматографияси усули каби) усуллари ёрдамида таҳлил қилинади. Ёт моддалар хроматограммадаги чўққиларни солиштириш бўйича аниқланади. Бир хил муҳитда модданинг колонкадан чиқиш вақти бир хил ва доимий бўлади ва бу хусусиятдан

аниқланувчи бирикманинг чинлигини аниқлашда фойдаланилади. Миқдорий таҳлилда чўққилар юзалари ҳисобланади, чунки чўққи юзаси модданинг миқдорига тўғри муносиб.



1-расм. Юқори самарали суюқлик хроматографиянинг тузилиш чизмаси

1 - кўзгалувчан фаза солинган идиш, 2 - насос, 3 - текширилувчи намунани киритиш жойи, 4 - хроматографиялаш колонкаси, 5 - детектор

Балиқ мойи таркибидаги витамин А миқдорини юқори самарали суюқлик хроматографияси усулида аниқлаш

Аниқланувчи эритмани тайёрлаш:

0,7 г балиқ мойи (аниқ тортма) 25 мл ҳажмли ўлчов колбасида гександа эритилади ва белгисигача гексан билан етказилади. Тайёрланган эритма хроматографик колонкага юборишдан олдин центрифугаланади.

Стандарт эритмани тайёрлаш:

0,035 г ёки 0,021 г (аниқ тортма) фаоллиги 1 ёки 1,7 млн-МЕ/г бўлган ретинол палмитатнинг мойли эритмаси ҳажми 100 мл бўлган ўлчов колбасига солинади, гександа эритилади ва белгисигача

етказилади. Тайёрланган эритмадан 2 мл олиб, ҳажми 50 мл бўлган ўлчов колбасига солинади ва гексан билан белгисигача етказилади. Эритма хроматографик колонкага юборишдан олдин центрифугаланади. Эритмани қоронғи, ҳарорати 0⁰Сдан ошмаган жойда 5 кун давомида сақлаш мумкин.

Хроматографиялаш шароитлари:

Силасорб-600 (заррача катталиги 5 мкм) сорбент билан тўлдирилган 120x2 мм ли колонка. Қўзалувчан фаза: гексан-диетил эфири (99,8:1,2). Оқим тезлиги - 200 мкл/мин. Колонка ҳарорати - ҳона ҳарорати. Детектор - УБ-спектрофотометр, 326 нм.

Аниқланувчи ва стандарт эритмалар ҳажми - 10 мкл дан. Хроматографиялаш камида 3 марта қайтарилади. Битта таҳлил учун элюент ҳажми - 2000 мкл. Ретинол палмитатнинг ушланиш вақти: 1,3-сис-изомер - 580 мкл (2,9 минут), транс-изомер (тўлик) - 710 мкл (3,5 минут).

Аниқлаш тартиби:

Хроматограф юқорида келтирилган шароитда тайёрланади. Намуналар колонкага юборилади ва ретинол палмитатнинг чўққилари бўйича системаларни ишлатиш мумкинлиги ҳақидаги 1 ва 2 мезонлар ҳисобланади.

Балиқ мойи таркибидаги А витамин хроматограммадаги 2 та чўққи ретинол палмитатнинг 1,3-сис ва транс изомерларининг ушланиш вақти бўйича аниқланади.

А витамин миқдори (X) 1 г препаратга нисбатан МЕ да қуйидаги формула бўйича ҳисобланади:

$$X = \frac{S_i \cdot C_s \cdot 25}{S_s \cdot m}$$

бунда:

C_s -аниқланаётган эритмадаги ретинол эфирлари чўққилари юзаларининг йиғиндиси;

C_c -стандарт эритмадаги ретинол эфирлари чўққилари юзаларининг йиғиндиси

C_c -стандарт эритмадаги А витаминининг МЕ/мл даги концентратсияси m -балиқ мойининг g лардаги аниқ оғирлиги

25 - суюлтириш ҳажми, мл

Балиқ мойи таркибидаги А витамининг миқдори 350-1000 МЕ/ g бўлиши керак.

2-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ

ГЕНОТИП ОРҚАЛИ ТУРНИ АНИҚЛАШ

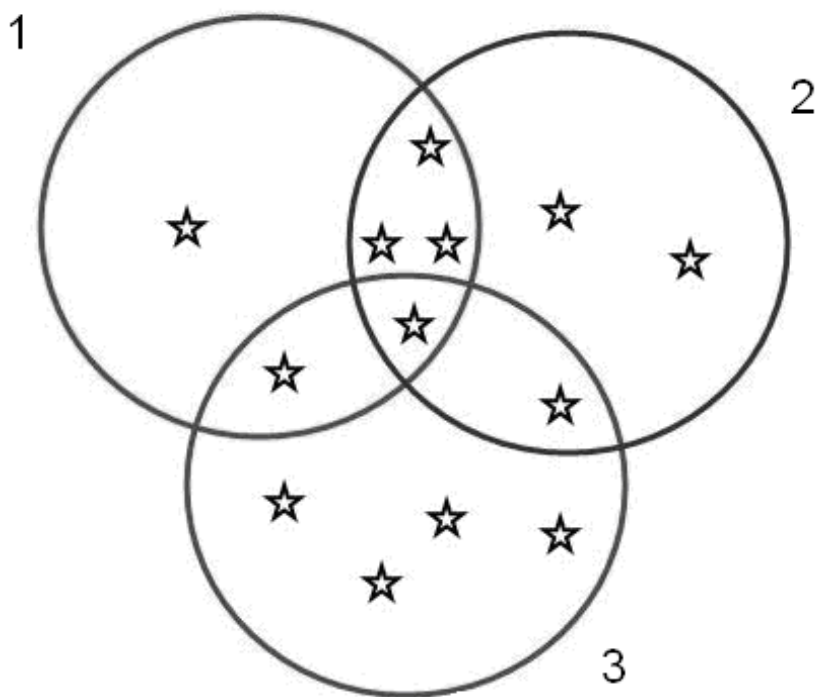
Ишдан мақсад: *STR қисқа тандем қайтарилишлар ўзгарувчан узунлик участкалари асосида генотиплаш жараёнини амалга оширишни ўрганиш ва ДНК намуналари билан ПЗР (полимераза занжир реакцияси) ни ўтказиш, гель-электрофарез ёрдамида ПЗР махсулотлари тахлили*

Ҳозирги кунда инсонни ишончли равишда идентификация қилиш усули молекуляр-биологик ДНК (ДНА профил) нусха олиш усули хисобланади. У ДНК намунаси генотипини аниқлайди ва индивидум тегишли ёки тегишли эмаслигин белгилаб беради. Ушбу усул суд экспертизасида қўлланилади. Маълумки, инсон ДНК си 3 миллиард п.о га эга, шундан 99,5% инсонлар учун умумий ҳисобланади. Қолган 0,5 % эса турличадир. Ва айнан мана шу полиморф участка идентификация жараёнида, шунингдек, суд экспертизасида ва умумий эътироф қилинган қоидалар бўйича хромосома (локуслар)нинг турли участкаларда жойлашган ДНК нинг кодланмайдиган кетма-кетлиги қўлланилади. Суд экспертизаси учун қисқа терминал қайтарилишлар –СТР сақловчи ДНК нинг кодланмайдиган кетма-кетлиги қўлланилади. СТР (шорт тандем репеатс) инглиз тилидан олинган бўлиб, қисқа терминал қайтарилишлар деган маънони англатади. СТР ўзида ДНК нинг кетма кетлигини акс эттиради (2, 3, 4, баъзида эса 6, 8 нуклеотлар), улар эса ўз навбатида кўп мартта 5ʼ→3ʼ йўналишда қайтарилиб туради. 1-расмда реал ҳолатда генотиплаш учун қўлланиладиган ТН01 номи билан маълум бўлган локус кўрсатилган, унинг ДНК си [ТСАТ] 4 та қайтарилишларга эга.

..СССТСАТТСАТТСАТТСАТТСА..

1-расм. ТН01 локуснинг нуклеотид кетма-кетлиги.

Бунинг учун ТН01 СТР локуснинг бир-биридан қайтарилишлар миқдори жиҳатдан ажралиб турувчи [ТСАТ] бутун дунёда инсонлардан топилган 20дан ортиқ альтернатив шакллари (аллелей), мавжуддир. Бироқ хар бир инсонда фақатгина иккита ота ва онадан ўтган аллел мавжуддир. ДНК- нусха олиш учун ўрганилаётган ДНК намуна ПЦР ёдамида амплификация қилинади. Бунда специфик праймерлардан фойдаланилади. Локуснинг иккала томонидан комплементар кетма-кетлик бўлиб, иккита оригинал аллелдан миллионга нусха олиш мумкин. Бу нусхалар, шунингдек ДНК намуна худди шундай миқдордаги СТР кетма-кетликка эгадир ва гель-электрофорез ёрдамида ўлчами бўйича бўлинади. Олинган чизиқлар тўплами индивидуум учун индивидуал характеристика ҳисобланади. Искриминация учун бир локус етарли эмас. У 1000 та одамнинг фарқини аниқлаб беради, икки локус эса 10000 орлиғида. Доимий амалиётда 3-5 локус бўйича генотиплашнинг натижаларидан фойдаланилади. 2-расмда бирданига уч локус (ТХ01 гтб-3, ДЗС1358 гт16-17 и ФГА гт21-23) бўйича генотиплашни қўллаш билан 13 та маълум шахс (юлдузча билан белгиланган)дан фақатгина бир донани идентификация қилиш мумкин.



2-расм. Генотиплашда қўлланилган локуслар миқдорининг ошиши индивидуумнинг идентификациясини ошириш эҳтимолларини кучайтиради. -1 – ТХ01 генотип 6-3; 2 – Д3С135 8 генотип 16–17; 3 – ФГ генотип 21-23

Қуйидаги лаборатория ишида қуйидаги операциялар амалга оширилиши назарда тутилган:

1. Маълум жуфт праймер ДНК намунаси билан ПЗР ўтказиш;
2. Гель–электрофарез ёрдамида олинган ДНК ни молекуляр массаси бўйича бўлиш;
3. Стандарт ДНК тўплами ёрдамида олинган ДНК ўлчамларини аниқлаш.

Материал ва асбоб-ускуналар:

Тахлилларни олиб бориш учун Сриме Ссене Инвестигатор ПСР Басисс™ Кит Саталог #166-2600ЕДУ (БиоРад) реагентлар тўплами

5 та ДНК намунаси;

ПЗР олиб бориш учун Мастер мих аралашмаси;

БХП007 локус бўйича генотиплаш учун праймерлар тўплами;

Маркерли аллелли ДНК тўплами;

Гель учун Оранже Г бўёғи;

Пластик посудалар тўплами: эппендорф (1,5 мл) пробиркалари, ПЗР учун пробиркалар, автоматик пипеткалар комплекти, штативлар, сув хаммони, 5417P (Еппендорф, США) модели микроцентрифуга, термоциклер МЖ МиниСйслер («Био-Рад») ("Био-Рад", США);

Гель-электрофорез олиб бориш учун ускуна ва реактивлар;

а) ДНК намуналари билан ПЗР (полимераза занжир реакцияси) ни ўтказиш

ПЗР ни ўтказиш ва генетик материал билан ишлаганда қуйидаги талабларга жавоб бериш керак:

1. Барча иш қўлқопларда, махсус кийим (халат) ва кўзойнакда амалга оширилади.
2. Лабораторияда ейиш, ичиш ва чекиш мумкин эмас.
3. Ишни бажаришдан олдин ва кейин қўлларни яхшилаб ювиш керак.
4. Стандарт бўлмаган барча ҳодисаларни ўқитувчига тезкорлик билан етказиш керак.

Ишни бажариш тартиби:

1. 5 та пробиркани ПЗР учун белгилаш керак. X, A, B, B, G
2. Пробиркага ДНК ва Мастер мих аралашмасини 1-жадвал бўйича солиб чиқиш керак, бунда ҳар бир намуна тайёрлашда пробирканинг қўшимча бурунчаси билан филтрдан ўтказилади ва пробирка оғзи тикин билан беркитилади.

1-жадвал

Номланиши	ДНК-матрица	Мастер мих + праймерлар
X+талабанинг исми	20 мкл	X-ДНК 20 мкл
A+талабанинг исми	20 мкл	A-ДНК 20 мкл
B+талабанинг исми	20 мкл	B-ДНК 20 мкл

В+талабанинг исми	20 мкл	В-ДНК 20 мкл
Г+талабанинг исми	20 мкл	Г-ДНК 20 мкл

Пробиркаларни термоциклёрга жойлаштирилади ва ускунани берилган дастур бўйича ёқиш керак:

2-жадвал

Қадам	Функция	Ҳарорат	Айланишлар давомийлиги	Айланишлар сони
Бошланғич денатурация	Денатурация	94°C	2 мин	1
Амплификация	Денатурация	94°C	30 сек	35
	Қиздириб юмшатиш	52°C	30 сек	35
	Узайиш	72°C	1 мин	
Охириги узайиш	Узайиш	72°C	10 мин	
Сақлаш	Сақлаш	4°C	аниқланмаган	1

б) Гель-электрофорез ёрдамида ПЗР махсулотлари тахлили

Ишни бажариш тартиби:

1. Йўриқнома бўйича гель-электрофорез учун аппаратни тайёрлаш
2. ПЗР дан сўнг пробиркалар центрифуга қилинади (пульс-режим).
3. Ҳар бир пробиркага қўшимча бурунчадан фойдаланиб 10 мкл Оранже Г ранг берувчи аралашма қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади.
4. Гелнинг чуқурчасига 20 мкл намунадан қуйидаги тартибда жойлаштирилади.

Чуқурча рақами	Намуна
1	Стандартлар йиғмаси мол. масса
2	Х
3	А
4	Б
5	В
6	Г

5. Электрофорез 100В кучланишда агарозали гелда 30 минут давомида амалга оширилади.

6. Гелни бўйлаб ва олинган намунани таҳлил қилиш.

Саволлар

1. ДНК-таҳлил учун қандай намуналар яроқли ҳисобланади ?
2. Нима учун биз ПЗРдан фойдаланамиз?
3. Аллел ва локус орасида қандай фарқ бор?
4. Нима учун ДНК- синфланиш учун геном участкаларининг кодланмаган ДНК си ишлатилади.
5. Мастер мих нима ва унинг ҳар бир компоненти учун керак?
6. ПЗРнинг қандай босқичлари мавжуд ва уларнинг ҳар бирида нима содир бўлади?
7. Гель-электрофорез ўтказилгандан сўнг материалнинг кўриниш ҳосил қилиш (визуализация) қандай содир бўлади?

3-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ

ПОТЕНЦИОМЕТРИК ТИТРЛАШ ОРҚАЛИ ФЕНАЗЕПАМ МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

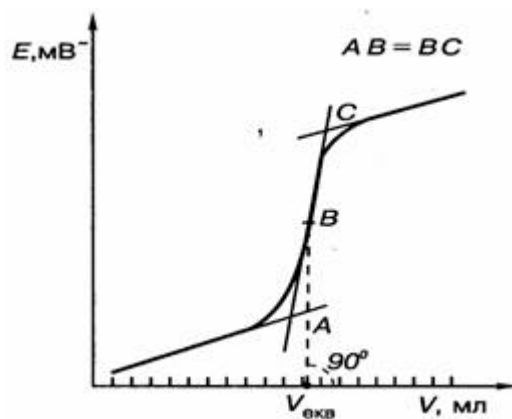
Ишдан мақсад: *Потенциометрик титрлаш орқали феназепам миқдорини аниқлаш*

Потенциометрик титрлаш усули

Потенциометрик титрлаш - нейтраллаш, чўкма ва комплекс ҳосил қилиш, оксидланиш - қайтарилиш ва бошқа усуллар ёрдамида бажариладиган миқдорий таҳлилда эквивалент нуқтани аниқлаш учун қўлланилади. Рангли ва лойқа эритмаларини титрлаш учун ҳам ушбу усулдан фойдаланиш мумкин. Бу усулда титрлаш жараёндаги алоҳида танланган электрод жуфтлигида ҳосил бўладиган электр юритувчи кучини (ЭЮК) ўлчаш орқали титрантни эквивалент ҳажми аниқланади.

Электрод жуфтлиги таққослаш электроди ва индикатор электроддан иборат. Индикатор электрод потенциали титрлаш жараёнида фаол қатнашувчи ёки ҳосил бўлувчи ионлар концентратсияси билан боғлиқ бўлиб, таққослаш электродининг потенциали доимий қийматини сақлаб қолади. Титрланганда электрод жуфтлиги одатда текширилувчи эритмага туширилади.

Таққослаш электродидан диффундирланаётган ионлар титрлаш жараёнига тўсқинлик қилса, таққослаш электроди ва текширилувчи эритма электролитик кўприк орқали туташтирилади. Ушбу электролитик кўприк ионлари тўсқинлик қилмайдиган электролит эритмаси билан тўлдирилган П -шаклдаги найча кўринишда бўлади (расм 9).



1-расм. Потенциометрик титрлаш усулида эквивалент нустани анишлаш

Сувсиз шароитда потенциометрик титрлаш усулида электролитик кўприк ёки таққослаш электроди калий ёки литий хлоридни тегишли сувсиз эритувчидаги эритмалари билан тўлдирилади.

Таҳлил давомида титрланган эритмани бюреткадан бир хил миқдорда аралаштириб турилган ҳолда қўшилади. Эквивалент нуқтага яқинлашганда титрантни 0,1 мл ёки 0,05 мл дан қўшилиб, ҳар гал эЮК ўлчанади.

Индикаторли электрод ва таққослаш электроди орасидаги потенциаллар фарқидан пайдо бўладиган эЮК юқори омли потенциометр ёрдамида (пХ- метр билан) ўлчанади. Эквивалент нуқтага яқинлашган сари эЮК қиймати кескин ўзгариб, эЮК ўзгариши () титрловчи миқдорининг ўзгаришига (ΔV) нисбатини мутлоқ қиймати бу нуқтада максимал бўлади.

Титрлаш натижасини графикда ифодалаб, ҳосил бўлган эгри чизиқ ёрдамида эквивалент нуқтани ҳисоблаш йўли

билан $\frac{\Delta E}{\Delta V}$ ва $\Delta \left(\frac{\Delta E}{\Delta V} \right)$ максимал қийматини аниқлаш мумкин.

ХИ Давлат фармакомеясидаги «Потенциометрик титрлаш» умумий мақоласида потенциометрик титрлаш эгри чизиғи, титрантнинг эквивалент миқдорини ҳисоблаш намунаси, турли усулларда титрлашда электрод тизимини танлаш жадвали келтирилган. Кислотали - асосли

титрлашда - шиша электрод, чўктириш усули қўлланганда - кумуш электроди қўлланади. Оксидланиш - қайтарилиш реакциясига асосланган усулларда платинали индикатор электрод қўлланади.

***Потенциометрик титрлаш орқали
феназепам миқдорини аниқлаш***

0,3 г феназепам (аниқ тортма) 20 мл хлороформда эритилади, 20 мл. сирка ангидриди қўшилади ва 0,1 мол/л перхлорат кислотаси эритмаси билан потенциометрик усулда титрланади. Индикатор электроди сифатида шиша электрод қўлланади. Бир вақтнинг ўзида назорат тажрибаси ўтказилади. 1 мл 0,1мол/л перхлорат кислота эритмаси 0,03496 г феназепамга мос келади (препаратнинг миқдори 99,0 % дан кам бўлмаслиги керак).

***Ампитсиллиннинг 250 - 500мг желатинли капсуласи
миқдорий таҳлили***

Реактивлар:

суюлтирилган натрий гидроксид эритмаси (42 г/л)

перхлорат кислотанинг 1 мол/л (сувли) эритмасини тайёрлаш учун (8,6 мл 70% перхлорат кислотаси 100 мл ўлчов колбасида белгисигача сув билан етказилади)

атсетат буфери эритмаси (рН 4,8)

формаמיד - таҳлил учун тоза намунаси

0,05 мол/л симоб перхлорат эритмаси

Аниқлаш тартиби:

0,1000 г (аниқ тортма) сувсиз ампитсиллинга мос келадиган майдаланган кукун титрлаш колбасига ўтказилиб, суюлтирилган натрий гидроксид эритмасидан қўшилади ва 10 минут давомида электромагнит аралаштиргич ёрдамида аралаштирилади. Сўнгра перхлорат кислотанинг 4,6 мл эритмаси, 20мл буфер эритмаси, 5мл формаמיד эритмаси

кўшилади ва симоб перхлорат эритмаси билан 0,6 мл/мин. тезликда (платинали ва каломел электродлари иштирокида) потенциометрик графикда букилишгача (α - чиқим) титрланади.

1 мл 0,05 мол/л симоб перхлорат эритмаси 0,01747г сувсиз ампитсиллинга мос келади.

Ампитсиллиннинг фоиз миқдори (A) қўйидаги формула бўйича ҳисобланади:

$$A = \frac{\alpha \cdot 0,01747 \cdot 100}{n}$$

бунда:

α - 0,05 мол/л симоб перхлорат эритмасининг титрлаш учун кетган мл миқдори.

n - намуна ојирлиги, г

Сувсиз ампитсиллиннинг битта желатина капсуладаги миқдори қуйидаги формула бўйича ҳисобланади:

$$P = (A - B) \cdot \frac{m}{d}$$

d - сувсиз ампитсиллиннинг кўрсатилган грамм миқдори, г

A - ампитсиллиннинг фоиз миқдори

B - парчаланиш маҳсулотларининг фоиз миқдори

m - бир желатина капсуланинг ўртача оғирлиги, г

Парчаланиш маҳсулотларини аниқлаш

Реактивлар:

формамид-тахлил учун тоза намунаси

атсетат буфер эритмаси (рН 4.8)

0,05 мол/л симоб перхлорат эритмаси

Аниқлаш тартиби:

0,5г (аниқ тортма) сувсиз ампитсиллинга мос келадиган майдаланган кукун тортиб олиниб титрлаш колбасига утказилади, сўнгра

10 мл формаид ва 10мл сув қўшилади. Аралашма 10 минут давомида ултратовуш ҳаммомида тортма эриб кетгунича чайқатилади. Кейин 20 мл буфер эритмаси қўшилади ва симоб перхлорат эритмаси билан сувсиз ампитсиллин миқдорини аниқлашдаги каби титрланади (б -чиқим).

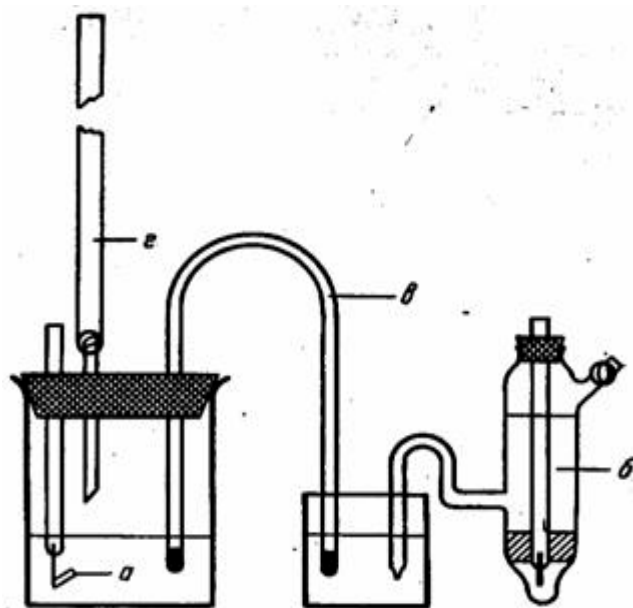
Парчаланиш маҳсулотларининг фоиз миқдори қўйидаги формула буйича аниқланади:

$$B = \frac{b \cdot 0,01747 \cdot 100}{n}$$

Бунда,

б- титрлаш учун сарфланган 0,05 мол/л симоб перхлорат эритмаси миқдори

n - ампитсиллин кукунининг аниқ тортмаси, г.



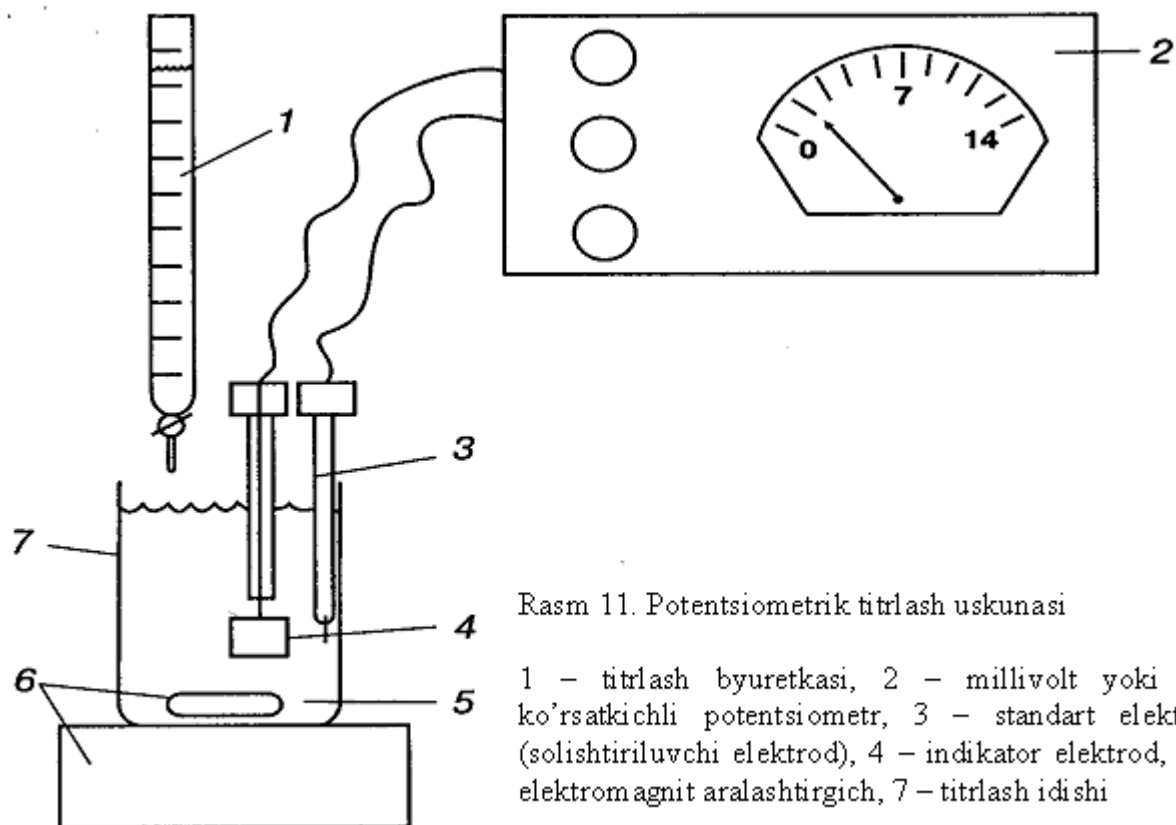
2-расм . Потенциометрик титрлашда электродларнинг жойлашиш чизмаси

а - индикатор электрод,

б - солиштирилувчи электрод,

в - электролитик кўприк,

Г - титрлаш бюреткаси



4-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ
ГАЗ-СУЮҚЛИК БИОРЕАКТОРИДА ФАЗАЛАРАРО ЮЗАНИ
АНИҚЛАШ

Ишдан мақсад: Пленкали ва аралаштиргичли аппаратларда фазалараро юза, газ пуфакчаларининг диаметри ва газ миқдорини аниқлаш

Материал ва асбоб-ускуналар:

турбина аралаштиргичли биореактор БиоФло110;
плёнкали биореакторнинг трубали насадкаси;
аппаратдаги газ-суюқлик аралашмасини йиғувчи ва суюқлик даражасини йиғувчи система;
термометр Бескманн (0,01 °С аниқликдаги);
рақамли фотоаппарат.

Ишни бажариш тартиби:

1. Биореакторларда газ миқдорини аниқлаш.
2. Фотоаппарат ёрдамида культурадаги пуфакчалар диаметрини аниқлаш.
3. Солиштирма фазалараро юзани ҳисоблаш.
4. Тахлиллар олиб бориш ва хулоса чиқариш.

Фазалараро юза катталиги биореактордаги массаалмасини параметрларини баҳолаш имконини беради ва юза масса бериш коэффицентидан ҳажмли масса бериш коэффицентига ўтишни амалга оширади.

Агар газ-суюқлик аралашмаси тўлдирилган V_p ҳажмда ўртача d_p диаметрли n газ пуфакчалари мавжуд бўлса, у ҳолда уларнинг юзаси қуйидагича бўлади:

$\Phi = \pi d_p^2 n$, ҳажми эса $V_g = \pi d_p^3 n / 6$, бундан қуйидаги формулага эга бўламиз,

$$V_{\Gamma} = \Phi \delta \Pi / 6.$$

Охирги формуланинг чап ва ўнг томонини V_{Γ} га бўлсак, қуйидагига эга бўламиз:

$$\phi = V_{\Gamma} / V_{\Gamma} = \Phi \delta / V_{\Gamma}.$$

Бундан фаза контактининг солиштирма фазалараро юзаси (1 м^3 аралашмадаги газ пуфакчалари юзаси)

$$a = \frac{F}{V_{\Gamma}} = \frac{6\phi}{d_n},$$

бунда,

a – контактнинг фазалараро солиштирма юзаси, $\text{м}^2/\text{м}^3$;

ϕ – газ миқдорига газосодержание.

Суюқлик ҳажмидаги газ миқдори одатда қуйидагича аниқланади:

$$\phi = (V_{\Gamma} - V_{\text{ж}}) / V_{\Gamma},$$

бунда,

V_{Γ} – биореактордаги газ-суюқлик аралашмаси ҳажми, м^3 ;

$V_{\text{ж}}$ – биореактордаги суюқлик ҳажми, м^3 .

Газ пуфакчалари юзасининг ўртача диаметри

$$d_n = \sqrt{\frac{\sum n_i d_i^2}{\sum n_i}},$$

H – пуфакчалар миқдори, дона ;

δ – пуфакчаларнинг диаметри, м.

Лаборатория аралаштиргичли биореакторларида газ сақлаш миқдори қуйидаги тенгликдан топилди:

$$\varphi = K \left(\frac{\rho \mu}{\sigma^{0,8}} \right)^{0,25} \left(\frac{N(1-\phi)}{V} \right)^n u_z^m \left(\frac{H}{D} \right)^c$$

Парракли аралаштиргич учун

$H(1-\phi)/B \leq 10$ (кВт/м³) : $K = 0,8$; $n = 0,5$;

$m = 0,62$; $c = 0$.

Турбинали аралаштиргич учун $H(1-\phi)/B \leq 10$: $K = 0,65$; $n = 0,5$;

$m = 0,6$; $c = -0,65$, при $H(1-\phi)/B > 10$: $K = 0,17$; $n = 0,1$; $m = 0,2$; $c = -0,65$.

Кўрилаётган аппаратларда пуфакчаларнинг ўртача юза диаметри

$(1-\phi)/B < 10$ да парракли биореакторларда 5–6 мм, турбинали аралаштиргичда эса 3–4 мм ни ташкил этади.

$$d_n = 0,8 \left[\frac{\sigma^{0,6}}{(N/V)^{0,4} \rho^{0,2}} \right]$$

Фазалараро солиштирма юза қуйидагича аниқланади:

$$a = 1,44 \left[\frac{\left(\frac{N}{V} \right)^{0,4} \rho^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \right] \left(\frac{u_z}{u_n} \right)^{0,5}$$

бунда,

ϕ – газ миқдори;

H – аралаштириш учун сарфланаётган қувват, Вт;

B – биореакторнинг ишчи ҳажми, м³;

X – аппаратдаги суюқлик даражаси, м;

D – аппарат корпусининг ички диаметри, м;

u_T – ҳавонинг ўртача сарфланиш тезлиги, м/с;

ρ – суспензия зичлиги, кг/м³;

μ – суспензия қовушқоқлигининг динамик коэффиценти, Па*с;

σ – суюқлик юзасининг сирт таранглиги, Н/м.

Саволлар

1. Биореакторларни масштаблашда фазалараро юзанинг кўрсатмалари нимадан иборат?
2. Газ миқдорини аниқлашнинг қандай усулларини биласиз?
3. Аралаштиргичли биореакторлада гидродинамик параметрларни аниқлаш учун қандай ҳисобий боғлиқликлардан фойдаланилади?

5-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ

ДЎЛАНА ГУЛЛАРИ ТАРКИБИДАГИ ГИПЕРОЗИДНИНГ ЧИНЛИГИ ВА МИҚДОРНИ ИЮПҚА ҚАТЛАМ ХРОМАТОГРАФИЯСИ УСУЛИДА АНИҚЛАШ

Ишдан мақсад: *Дўлана гуллари таркибидаги гиперозиднинг чинлиги ва миқдорини юпқа қатлам хроматография усулида аниқлаш*

Юпқа қатлам хроматографияси

Юпқа қатлам хроматография усули юқори сезгирликка эга бўлган универсал усул бўлиб, ҳозирги вақтда оддийлиги, тез бажарилиши, иқтисодий жиҳатдан афзаллиги туфайли фарматсевтика амалиётида кўп фойдаланилмоқда. Усул сорбент билан қопланган шиша, фолга, пленка юзасида капилляр кучлар таъсирида моддаларнинг ҳаракатланиши натижасида бир-биридан ажралишига асосланган.

ЮҚХ усулидан моддаларнинг чинлиги, тозаллиги ва миқдорини аниқлашда кенг фойдаланилади.

Мазкур усулда кўзгалувчан фаза сифатида кўпинча сув ва баъзида бошқа эритувчилар ёки уларнинг аралашмалари ишлатилади. Кўзгалувчан фаза кўзгалмас фаза (юпқа қатламли сорбент)га томизилган аралашмани ўзида эритади ва уларни турли тезликда ҳар хил масофадаги ўринларда тақсимланишига олиб келади.

Юпқа қатлам хроматографияси усулида эритувчилар аралашмасини шундай танлаш керакки, бунда хроматограммада бирикмалар симметрик жойлашиб, R_f қиймати 0,5 га яқин бўлиши керак. ЮҚХда кўзгалмас қаттиқ фаза - сорбент сифатида махсус «хроматография учун» тайёрланган силикагел, алюминий оксиди, КСМ маркали силикагел, силикагел билан алюминий оксиди аралашмаси,

селлюлоза, кизелгур, полиамид ишлатилади. Сорбент танлашда аниқланувчи модда функционал гуруҳларининг хусусияти ва сони ҳам аҳамиятга эга.

ЮҚХ усули - сорбент маҳкамланган ва маҳкамланмаган пластинкаларда олиб борилади. Сорбент қатламини маҳкамлаш учун $5\pm 20\%$ гача боғловчи модда қўшилади. Боғловчи моддаларнинг ажралиш жараёнига таъсир этмаслиги керак. Шундай боғловчиларга гипс, крахмал, агар-агар киради.

Сорбенти маҳкамланган юпка қатламли пластинка тайёрлаш учун 5 г КСМ маркали силикагел, 0,2 г калсий сульфат ва 12 мл сувдан иборат аралашма чинни хавончада шиша таёқча билан бир хил куюқликда бўлгунича аралаштирилади. Тайёрланган аралашмани ўлчамлари 13x18 (14x16; 8x15) см келадиган шиша пластинка устига куйиб махсус мослама ёрдамида қатлам қалинлиги бир текис бўлгунича (250-500мкг) текисланади. Кейинчалик пластинка горизонтал ҳолатда қуритиш шкафида 120°C ҳароратда 1 соат давомида қуритилади. Пластинкалар сувсиз калсий хлорид солинган эксикаторларда сақланади.

Хроматографик камера сифатида оғзи ойна ёки ишлов берилган қоқоқ билан ёпилган таги ясси шиша идишлар (кристаллизаторлар, эксикатор ва х.к.) ишлатилади. Камера сатҳини 5-7 мм га қўзғалувчан фаза - эритувчилар аралашмаси солинади. Камерани тўйинтириш мақсадида унинг деворига эритувчи билан шимдирилган филтр қоғоз жойлаштирилади.

Намунани юборишдан аввал пластинка чеккасидан 1,5-2 см масофада ўткир қалам ёки игна билан доғларнинг бошланғич - старт чизиғи белгиланади. Пластинканинг қарама-қарши чеккасида намунанинг номи ёзилади. Намуна микропипетка ёки микрошпритс ёрдамида томизилади. Сифат таҳлилини ўтказишда капиллярдан фойдаланилади. Намуна старт чизиғига диаметри 3-4 мм бўлган доғ кўринишида томизилади. Намуна пластинканинг пастки қисмидан 1,5-2 см юқорида,

ён тарафидан эса 2 см масофада томизилиши керак. Агар пластинкага бир неча намуналар томизилиши керак бўлса, улар орасидаги масофа 2 см дан кам бўлмаслиги керак. Хроматографиялаш услуби 3 хил бўлади.

1. Юқорига кўтарилувчи хроматографияда пластинка вертикал ҳолатда жойлаштирилади, эритувчилар аралашмаси пастдан юқорига қараб ҳаракатланади.
2. Пастга қараб ҳаракатланувчи хроматографиялашда эритувчи алоҳида идишга солиниб, камеранинг юқори қисмига жойлаштирилади. Эритувчи филтр қоғоз ёрдамида берилади, яъни хроматография қоғозининг бир учи эритувчига солинса, иккинчи учи камеранинг пастки қисмига туширилади.
3. Айланали хроматографиялашда эритувчи солинган Петри идишида диаметри 2 мм катталиқда тирқиш бўлади. Аниқланувчи модда қоғозга томизилади. Тирқишга филтр қоғоз ўрнатилади ва эритувчига солинади.

Хроматограммада ҳосил бўлган доғлар 2 хил усулда очилади: кимёвий ва физикавий.

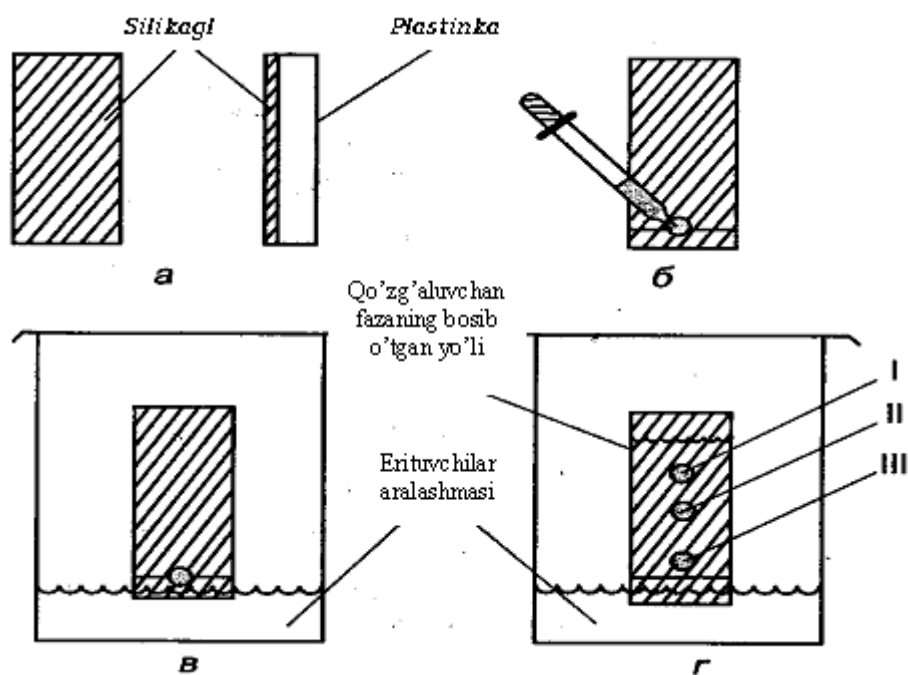
Кимёвий усул. Пластинкалар реактивлар билан пуркалади (пуркагич ёрдамида) ва рангли доғлар ҳосил бўлади. Пластинкалардаги доғларни ёднинг буғлари билан ишлаш ёрдамида ҳам аниқлаш мумкин.

Физик усул. Баъзи моддалар ўз таркибида хромофор гуруҳларни сақлагани учун УБ-нурда товланади (флюорессенсияланади). Агар моддалар товланмайдиган бўлса, унда сорбент тайёрланаётганда флюорессен индикатори ёки ЗнС қўшилади. Баъзида, масалан радиоактив модда доғларини аниқлашда, сорбент қатламидан эритувчи учиб кетганидан кейин унга фотосезгир пленка ёки қоғоз ёпиштирилади, маълум вақт ўтгандан кейин пленка ёки қоғозда радиоактив моддаларнинг қора доғи ҳосил бўлади.

ЮҚХ усулида сифат таҳлилини ўтказишда стандарт моддалардан ёки модданинг R_f қийматидан фойдаланилади. Дори моддалар таркибидаги ёт бирикмаларни аниқлашда бўлиши мумкин бўлган ёт моддаларнинг нусхаларидан (гувоҳ) фойдаланилади.

ЮҚХ усулида миқдорий таҳлил олиб боришда аниқланувчи модда пластинкага аниқ миқдорда томизилади. Пластинка хроматографияланади, доғлар ўрни белгиланади ва эритувчилар ёрдамида сорбент эритилиб, таркибидаги модда миқдори кимёвий (ҳажмий) ёки физикавий (СФ, ФЕК) усуллар ёрдамида аниқланади (расм 25).

Баъзида моддалар миқдорини хроматографиялашда ҳосил бўлган доғлар юзасини ҳисоблаш (денситометрия) орқали ҳам аниқланади.



1-расм . Сорбентнинг юпқа қатламида бажариладиган хроматография чизмаси:

- а – силикагел қатлами билан қопланган пластинка,
- б – пластинкага эритмани томизиш,
- в – пластинканинг хроматографиялаш камерасидаги ҳолати,
- г – моддаларнинг хроматография жараёнида ажралиши

***Дўлана гуллари таркибидаги гиперозиднинг чинлиги ва миқдорини
юпқа қатлам хроматографияси усулида аниқлаш***

Чинлигини аниқлаш

0,5 г майдаланган хом ашё 15 минут 5 мл 95% спиртда қайнатилади. Аралашма совитилганидан кейин ажратма декантатсияланади ва «Силуфол» пластинкасига (15x15 см) микропипетка ёрдамида 0,05 мл эритма 1 см узунликда чизиксимон кўринишда томизилади, ёнига нуқта шаклида 0,005 мл 0,1% ли гиперозиднинг Давлат стандарт намунаси (ДСН) эритмасидан томизилади. Пластинка қуритилади (5 минут) ва хлороформ-метил спирти (8:2) солинган камерага жойлаштирилади. Хроматографиялаш юқорига йўналган усулда олиб борилади. Эритувчилар аралашмаси пластинканинг юқорисига етганида пластинка камерадан олинади, 2 минут ҳавода қуритилади ва УБ-лампа остида ($\lambda=300$ нм) кўрилади. Гиперозид ДСН доғининг баландлигида тўқ-жигар рангдаги чизик ҳолида доғ бўлиши керак. Кейин пластинкага алюминий хлориднинг 5% ли спиртли эритмасидан пуркалади ва 2-3 минут қуритиш ускунасида $100-105^{\circ}\text{C}$ да қиздирилади. Бунда доғ УБ-нурда кўрилганда сариқ-яшил бўлиб товланувчи тўқ сариқ рангга бўялади.

Миқдорини аниқлаш

3 мм катталиқда майдаланган 2 г (аниқ тортма) ўсимлик хом ашёси 250 мл ҳажмли оғзи маҳкам беркиладиган (шлифли) колбага солиниб, устига 100 мл 95% спирт солиб $\pm 0,01\text{г}$ аниқликда тортилади. Колбанинг оғзига вертикал совитгич ўрнатилиб, сув ҳаммомида 1 соат давомида қиздирилади. Ҳаво ҳароратигача совитилиб, колбанинг оғирлиги аввалгисига (биринчи)сига етгунига қадар 95% ли спирт кўшилади. Колбадаги аралашма диаметри 7 см, 0,5 см қалинликдаги намланган пахта солинган воронка орқали сузилади (филтрланади). Биринчи 30 мл филтрат ташлаб юборилади, кейинги 50 мл эса таги

юмалок, оғзи яхши ёпиладиган (шлифли) 100 мл ҳажмли колбага солиниб, 2-3 мл эритма қолғунига қадар роторли буғлатгичда буғлатилади. Колбадаги қолдиқ 10 мл ли ўлчов колбасига ўтказилади ва белгисигача 95% спирт билан етказилади, аралаштирилади ва аморф чўкма чўкиши учун тиндириб қўйилади. «Силуфол» (15x15 см) пластинканинг старт чизиғига (четидан 1,5 см ичида) чўкма устидаги суюқликдан 0,08 мл 5 см узунликда чизиксимон кўринишда томизилади. Ёнига 0,08 мл 0,1% гиперозиднинг ДСН эритмасидан томизилади. Пластинка қурилади ва хлороформ-метил спирти (8:2) солинган камерага жойлаштирилади. Эритувчилар аралашмаси пластинканинг четига етганида, пластинка камерадан олинади, қурилади ва иккинчи марта қайта хроматографияланади.

Пластинка УБ-нури оқимида кўрилиб, гиперозиднинг текширилаётган эритма ва стандарт намунадаги доғлар ўрни белгиланади. Белгиланган доғлар ва шу доғлар катталигидаги пластинканинг бўш қисми майдалаб кесилади (назорат тажриба учун). Пластинканинг кесилган бўлакчалари 50 мл оғзи маҳкам беркитиладиган колбаларга солинади, устига 10 мл дан диоксан-сув (1:1) аралашмасидан қуйиб, оғзи маҳкам беркитилиб, 1 соат давомида чайқатилади.

Колбалардаги аралашма пробиркаларга ўтказилади ва 1000 айл/мин тезликда 5 минут давомида центрифугаланади. Олинган элюатларнинг оптик зичлиги спектрофотометрда назорат тажрибасининг элюатига нисбатан, қалинлиги 10 мм бўлган кюветаларда, $\lambda=364$ нм да ўлчанади.

Гиперозиднинг қуруқ хомашёга нисбатан миқдори фоизларда қуйидаги формула ёрдамида ҳисобалнади:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 4000}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

бунда,

D - текширилаётган модда элюатининг оптик зичлиги

D_0 - гиперозид ДСН элюатининг оптик зичлиги

m_0 - гиперозид ДСН аниқ оғирлиги, г

m - хом ашёнинг аниқ оғирлиги, г

W - хом ашёнинг намлиги, %

Гиперозид Давлат стандарт намунаси эритмасини тайёрлаш:

Тахминан 0,05г (аниқ тортма) гиперозид ДСН ($100-105^{\circ}\text{C}$ да доимий оғирликкача қуритилган) 100 мл оғзи маҳкам беркитиладиган колбага солиниб, 40 мл 95% ли спирт қўшилади ва вертикал совитгичга улаб, кристаллар тўлиқ эриб кетгунига қадар сув ҳаммомида киздирилади. Эритма совитилганидан кейин 50 мл ҳажмли ўлчов колбасига ўтказилади, белгисигача 95% ли спирт билан етказилади ва аралаштирилади.

5% алюминий хлориднинг спиртли эритмасини тайёрлаш

5 г алюминий хлорид 100 мл ли ўлчов колбасида 40 мл 95% ли спиртда эритилиб, белгисигача 95% ли спирт билан етказилади ва аралаштирилади.

6-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ

ПЛАЗМИД ДНК СИНИ АЖРАТИШ ВА ТОЗАЛАШ УСУЛЛАРИ

Ҳозирги вақтда плазмид ДНКсини олишнинг кўпгина услублари мавжуд. Барча услублар муолажаларида асосий 3 та жараён амалга оширилади:

1. Бактериал хужайрларни ўстириш (иложи борича плазмид ДНКси амплификациясини кучайтириш),

2. Бактериал хужайралар лизиси

3. Плазмид ДНКсини тозалаш.

Плазмид ДНКсини ажратиш ва тозалашнинг барча услублари хромосома ва плазмид ДНКларининг физик-кимёвий хусусиятларининг фарқига асосланган. Иккинчидан плазмидлар хужайралардан ковалент ёпиқ шаклда ҳам ажратилиши мумкин, бунда хромосома ДНКси ажратиш жараёнида бир занжирли бўлақларга бўлиниб кетади. Бу ДНК бўлақлари одатда катта молекуляр оғирликка эга бўлиб, улар ажратиш жараёнида денатурацияга учраган оксиллар ва хужайра қобиқлари билан бирга чўкмага тушади, плазмид ДНКси эса суюқлик қисмида қолади (тиник хужайра лизатида). Агар хужайралар лизиси хромосома ДНКсини танлаб денатурация қилувчи шароитда олиб борилса плазмид ДНКсининг кўп миқдорда чиқиши таъминланади. Бунинг учун бактериал хужайраларга ишқор ва иссиқлик билан ишлов берилади. Сўнг денатурацияланиш маҳсулотлар дифференциал центрифугалаш усули ёрдамида чўктирилади. Бир қанча услублар орқали хужайра лизатини тиниклаштириб, сўнг керакли миқдорда плазмид ДНКсининг тоза препаратлари олишди ва уларни трансформациялаш ва рестрикциялаш тажрибаларида ишлатиш мумкин.

Ген муҳандислиги мақсадлари учун юқори тозалikka эга плазмид ДНКси керак. Бунинг учун плазмид ДНКсини препарати этидиум бромидли СсСлнинг зичлиги градиентида ультрацентрифугаланади. Этидиум бромид ДНКга ўрнашиб олиб, цезий хлорид зичлиги

градиентиди ДНКнииг сузиш зичлигини камайтиради. Этидий бромадиднинг ДНК билан боғланиши ДНКнинг қайси шаклдалигига боғлиқ ДНКнинг тўғри шакли молекулалари кўп миқдордаги, ковалент ёпиқ шакллари эса камроқ миқдордаги этидий бромидид билан бирикади. Шунинг учун этидий бромидидли СсСл градиентиди ДНКнинг тўғри шакли ва очик халқали шакллариинг сузиш зичлиги камаяди, аксинча эса халқали ковалент ёпиқ ДНК молекулалари зичлиги кам миқдорда ўзгаради. Шундай қилиб, этидий бромидидли СсСл градиентиди ультрацентрифугалаш ДНК молекулаларини шаклига қараб ажралишига олиб келади ва шу билан плазмида ДНКсининг тозаллигини таъминлайди.

Ишдан мақсад: Бактериялардан ишқор ёрдамида плазмид ДНКсини ажратиш. (Бирнбойм-Долининг модификацияланган услуби.)

Материал ва асбоб ускуналар: Е. соли бактерияси клони, ЛВ озукка муҳити, И-эритма (50 мМ сахароза, 25 мМ трис НС1, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА), ИИ-эритма (0,2 и NaOH, 1 % СДС), 5 М калий ацетат рН 4,8 (60 мл 5 М калий ацетат тайёрлаш учун 11,5 мл сирка кислотаси, 28,5 мл дистияланган сув), 1мл 96 %-ли этил спирги, ТЕ-буфери музлатгич, стол центрифугаси, 4 та эппендорф пробиркалари, стерилл шиша таёкча, парафильм, фильтр қоғози, .1 мл-ли автомат пипетка.

Ишни бажариш тартиби:

1. Танланган колонияни микробиологик сиртмоқ ёрдамида 3 мл ЛВ озукка муҳити ва антибиотикли пробиркага солинади ва кеча давомида 37⁰С температурада ўстирилади. Бу тунги культура дейилади).
2. 1,5 мл тунгид культурани эппендорф пробиркасига солинади ва стол центрифугасида 15дақиқага . 1000 айл/мин айланттирилади.

3. Чўкмага 100 мкл (микролитр) И - эритма солинади ва аралаштириладн.
4. Тезда 200 мкл ИИ-эритма солинади ва 5 дақиқа яхшилаб аралаштирилганидан сўнг муз. хаммомида 15 диқиқа сақланади. Бунда суспензиянинг ранги оқариб шилимшиқ холига келиши керак.
5. Устига совитилган 150 мкл 3 М натрий ацетат (рН 4,8-5,0) солинади ва яхшилаб аралаштирилади; бунда оқ чўкма туша бошлайди (оксил ва хромосома ДНКси). 5 дақиқа 5000 айл/дақ центрифугаланади.
6. Чўкма стерил шиша таёқча ёрдамида олиб ташланади ва суюқ қисмига 1 мл 96 % ли этил спирти солинади ва плазмид ДНКси чўкмага яхши тушишиучун совитгичга қўйилади.
7. 2 соатдан сўнг 3 мин давомида 3000 айл/дақ. центрифугалади. Чўкма хона хароратида қуритилиб. 150 мкл ТЕ буферида эритилади ва плазмид ДНКси электрофорез ёрдамида текширилади.

7-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ

ЎСИМЛИК ХУЖАЙРАСИДАН ДНК ВА РНК АЖРАТИШ.

Ишдан мақсад: Ўсимлик хужайрасидан ДНК ва РНК ажратиш

Материал ва асбоб-ускуналар: 4 гр 14-кунлик ғўза барглари, хавонча, центрифуга, центрифуга стаканлари, 2 та колба, 2 та стакан, шиша таёқча, рефрактометр, диализ қоғози, магнитли аралаштиргич, спектрофотометр, музлатгич.

Буфер эритмалар ва реактивлар:

Буфер Г: 0,2 М трис-ҲСл, рН 8,5; 0,2 М сахароза; 30 мМ магний ацетат; 60 мМ КСл. Эритмалар автоклавда стерилланиб суюқ ҳолда ёки -20⁰С да музлатиб сақланади. Ишлатишдан олдин 1% гача поливинилпириolidон ва 0,31% гача 2-меркаптоэтанол қўшилади.

Хлороформ: изоамил спирти (24:1), сувда тўйинтирилган фенол, 3 М натрий ацетат, 0,1М калий ацетат.

Ишни бажариш тартиби:

1. 4 г барг ҳавончада сую азот ёрдамида кукун ҳолига келгунча майдаланади.
2. Кукунни 50 мл буфер В билан бирга колбага солинади, 20 дақиқа давомида аралаштириб турилади.
3. 30 мл фенол қўшилади ва яна аралаштирилади (30 дақ.)
4. К-23 центрифугасида 10⁰ Сда 5000 айл./дақ тезликда 1 соат айлантрилади.
5. Устки қисми тоза колбага олиниб тенг миқдорда фенол-хлороформ аралашмаси солиниб, 10 дақиқа аралаштирилади.
6. 30 мин. 10⁰ да 5000 айл./дақ тезликда центрифугаланади.

7. Устки қисмини олиб тенг миқдорда хлороформ кўшилиб, 10 дақиқа аралаштирилади ва яна центрифугалаш йўли билан фазаларга бўлинади.
8. Суюқ қисми, 2 миқдор этил спирти солинган стаканга аста секинлик билан аралаштирилиб музлатгичга кўйилади. «Медуза» ҳосил бўлгандан сўнг таёкчага ўраб олиниб 10 мл ДНК эритувчи (TE) буферидида стаканда эритилади.
9. ДНК эритмасига этидий бромид 02 мг/мл ва 1,55 г/мл цезий хлор солинади (синиш кўрсаткичи 1,3860).
10. Суюқлик центрифуга пробиркаларига солинади тенглаштириб оғзи маҳкамлангандан сўнг 20 соат 50000 айл./дақ. тезликда (15⁰С) центрифугаланади.
11. УФ нурлари остида ДНК шприц ёрдамида тортиб олинади.
12. ДНКни этидий бромидиддан изоамил спиртида 5 марта экстракция қилиб тозаланади.
13. Цезий хлордан TE буферидан 4⁰С да 24 соат агнитли аралаштиргичда буферни бир неча марта алмаштириб диализ қилиш йўли билан тозаланади.
14. ДНК миқдорини спектрофотометрда 260 нм тўлқин узунлигида кварцли кювета ўлчанади.

В буфери:

0,2 М NaCl

0,05 И ХСл

0,01 М ЭДТА

0,01 М ДДТ

0,2% СДС

Фенол, 0,1 М NaCl; 0,1 М трис–ХСл, pH 8,0; 0,01 М ЭДТА билан тўйинтирилади

Хлороформ: изоамил спирти (24:1)

TE-буфери: 10 mM трис–ХСл, pH 8,0, 1 mM ЭДТА

4,5 г цезий хлориднинг TE буферда эритмаси.

Этидий бромид эритмаси 10 мг/мл.

Диализ учун буфер: 10 мМ трис рН 8,0, 1 мМ ЭДТА

Ўсимлик хужайрасидан РНК ажратиш.

Материал ва асбоб-ускуналар: 5 г барг, суюқ азот, хавонча, 2 та 250 мл колба, 100 мл стакан, 1 м дока, стол центрифугаси, центрифуга пробиркалари, магнитли аралаштиргич, резина нокчага уланган пипетка, музлатгич, муз хаммоми, спектрофотометр.

1. 5 г ўсимлик материали суюқ азот ёрдамида музлатилади ва хавончада кукун ҳолига келтирилади ва 250 мл-ли таги юмалоқ колбага солинади.
2. 50 мл буфер Г солинади ва тез аралаштириб, 4 қават докадан ўтказилади. 8000 айл/дақ. Тезликда 10 дақиқа -4°C центрифугаланади.
3. Устки суюқ қисмини олиб 1/20 ҳажми 10% ли СДС (охирги концентрацияси 0,5%) солинади.
4. Тенг миқдорда сув билан тўйинтирилган фенол, тенг миқдорда хлороформ: изоамил спирти аралашмаси (24:1) солинади ва магнитли аралаштиргичлида 20 дақиқа хона ҳароратида аралаштирилади. Сўнг центрифуга пробиркаларига солиб стол центрифугасида 2500 г –да 10 дақиқа давомида центрифугаланади. Денатурацияга учраган оксиллар органик суюқлик ва сув қаватлари ўртасида интерфаза ҳосил қилади.
5. Устки суюқ қисми ва интерфаза резина нокчага уланган пипетка ёрдамида 250 мл колбага тортиб олинади ва тенг миқдорда хлороформ солиб 10 дақ. давомида аралаштирилади.
6. Центрифугаланиб фазаларга ажратилади ва устки суюқ қисми тоза 100 мл-ли стаканга олиниб, 1/20 ҳажм 3 М натрий ацетат ва 2 ҳажм этанол солиб 20°C ҳароратда кеча давомида нуклеин кислоталар чўктирилади.
7. Центрифугаланиб, чўкма -4°C да икки марта 1-2 мл рН 6, 0,3 М натрий ацетат билан ювилади (этанол ва ДНК дан тозалаш учун)

8. Чўкма икки марта таркибида 0,1 М калий ацетат бўлган 80%ли этанол билан ювилади ва шу эритмада -20°C да сақланади. РНКнинг миқдорини чўкмани олдиндан қуритиб, дистилланган сувда эритиб спектрофотометрда аниқлаш мумкин. Олинган эритманинг оптик зичлигини 260 нм ($103_{260}\text{к}40 \text{ мкг/мл}^2$) ўлчанади. Препаратнинг тозалигини баҳолаш учун Уф нурларининг ютилиши спектри ўлчанади: тоза РНК учун - 03_{260} : $03_{260}\text{к}2,0$ бўлиши керак.

8-ЛАБОРАТОРИЯ ИШИ
ҚАЙНАТИШ УСУЛИ ЁРДАМИДА ПРЕПАРАТИВ ПЛАЗМИД
ДНК СИНИ АЖРАТИШ

Ишдан мақсад - Қайнатиш усули ёрдамида агробактериялар *Ti* ва *Ki* плазмид ДНКларини ажратиш.

Материал ва асбоб ускуналар: 4 та студентга 400 мл тунги рTi плазмидли Агробастриум тумефасинес С58 ва рRи плазмидли Агробастриум ризогенес культураси.

2 та талабага: 10 мл СТЕТ буфери; 0,9 мл ТЕС-буфери; 50 мл-ли колба; 1 мл лизоцим эритмаси (20мг/мл); секундомер, 1 мл-ли автомат пипеткалар.

Гуруҳга: 0,65 г. агароза, 0,5 л электрофорез буфери, 12-21В "Бекман" центрифугаси, 18-80 М "Бекман" ультрацентрифугаси, -20⁰ С ҳароратли музлатгич камера ёки -18⁰ С ҳароратли музлатгич, 100⁰ С ҳароратли сув ҳаммоми, муз ҳаммоми, электрофорез аппарати, доимий ток манбаи, хе-мископ.

Штамм ва озуқа муҳитлар: Агробастриум тумефасинес С58 ва Агробастриум ризогенес Rи A₄ штаммлари, биомасса ўстириш учун (агарли) Хоттиклер ёки ЛВ бульони.

Ишни бажариш тартиби: Бу тажрибани бажариш учун талабалар иккитадан бирлашади. Ҳар бир жуфт битта штаммдан ДНК ажратади. Бир кун ўстирилган культура (400 мл) 3000 айлана/дақ. тезликда 30 дақиқа центрифугаланади. Ҳар бир культура чўкмаси 10 мл СТЕТ - буферида суспендирланади ва 50 мл-ли Эрленмейер колбасига солинади. Суспензияга 1 мл лизоцимининг сувдаги эритмаси (20 мг/мл) қўшилади ва тез аралаштириб аралашма иситгичга қўйилади. Биринчи қайнаш

аломатлари кўриниши билан колбани, 40 секундга қайнаб турган сув ҳаммомига жойланади, сўнг олиб тезлик билан муз ҳаммомига 5 дақиқага қўйилади. Ҳосил бўлган ёпишқоқ (шилимшиқ) лизатни центрифуга пробиркаларига тенг миқдорда солиниб 25000 айл/дақ. тезликда 4⁰С да 30 дақиқа центрифугаланиб, хромосома ДНКси ва денатурацияланган оксиллардан тозаланади. Сўнг тиниқ суюқлик шиша центрифуга пробиркаларига солинади ва 10 мг/мл миқдордаги РНКаза билан хона хароратида 1 соат инкубацияланади. Суюқликка тенг миқдорда изопропанол қўшиб, музлатгичга -20⁰С га 1 соат қўйилади. Сўнг 3000 айл/дақ, тезликда 20 дақиқа центрифугаланади. Чўкма ҳавода қуритилади ва 0,9 мл ТЕС -буферига эритилади. Шу эритмадан 20 мкл олиб агарозали гелда электрофорез қўйилади ва плазмиднинг борлиги текширилади.

ДНК эритмасига 1г цезий хлорид солиб, эритилади ва -4⁰С да сақланади.

Агробактериялар учун озуқа муҳити.

ЙЕВ (трансформация учун)

Гўшт экстракти -5 г,

Ачитқи экстракти -1 г,

Пептон -5 г,

Сахароза -5 г,

МгСО₄-1 М-2 мл

Ҳ₂О рН-7,2- 1 л

ТЙ (Ти -плазмид ажратиш учун)

Ачитқи экстракти- 3 г,

Триптон -5 г,

Ҳ₂О рН - 7,2-1 л,

РМ (Ти-плазмид ажратиш учун)

Пептон - 0,4 %,

МгСл₂-2 мМ,

рН 7,2

И. Агробактерий Ти-плазмид ДНКсини ажратиш усуллари.

(Т.С.Сурриер, Е.В.Настер. Аннал. Виочем, р 76,431-441,1976)

1. 12-14 соат давомида 5×10^8 - 2×10^9 хуж/мл зичлигигача ўстирилган 1 л культура.
2. Центрифуга ёрдамида чўктириб, икки марта ТЕ-буферида ювилади, -60°C да музлатиб қўйиши ҳам мумкин (ацетон ва куруқ муз).
3. Проназа В (олдиндан бошқа қолдиқ ферментларнинг фаоллигини инактивация қилиш учун 37°C га 2 соат қўйилган) охирги миқдори 500 мкг/мл ва СДС -1% 200 мл ТЕ-буферида қўшилади ва 37°C да 40-45 дақиқа давомида инкубацияланади 2 дақиқа давомида чайқатиб аралаштирилади.
4. Лизат рНи 12,1-12,3 гача етгунича 3 Н-НаОХ қўшилади ва 10 дақиқа давомида аралаштирилади.
5. рНи 8,5-9,0 бўлиши учун, 2 М рН 7,0 бўлган трисдан фойдаланилади.
6. Лизатга 200 мл 3 % НаСл билан тўйинтирилган фенол солинади ва 5 дақиқа чайқатиб аралаштирилади (бир занжирли ДНКни йўқотиш учун).
7. Сувли фазани ажратиб. тенг миқдорда хлороформ-изоамил спиртида экстракция қилинади (24:1) (фенолни йўқотиш мақсадида).
8. Сувли фазани ажратиб, 10% ли ПЭГ-600 билан кечасига 4°C да қолдириб ДНК чўктирилади.
9. 7000 айл/дақ тезликда 10 дақиқа центрифугаланиб ПЭГ чўктирилади.
10. Чўкма ТЕС-буфери билан яхшилаб пипеткаланади ва 4°C да 2 соат қолдирилади.
11. ПЭГдан тозалаш учун 10 дақиқа 18000 айл/дақ. тезликда ёки 1 соат 7000 айл/дақ. тезликда центрифугаланади. Этидий бромидид қўшиб 30000 айл./дақ. тезликда 60 соат давомида центрифугаланади.

Услубни модификациялаш.

(Коекман эт. ал., Пласмид 4,184-195, 1980)

1. Чайқатиб, аралаштириш босқичи бекор қилинади.
2. Лизат нейтраллангандан сўнг 1М NaCl эритмасида 4⁰С хароратда 4 соат инкубация қилинади.
3. Хромосома-мембрана комплекс 5000 айл./дақ. тезликда чўктирилади.
4. Суюқ қисмига 120 ПЭГ солинади, 4⁰С да кеча давомида инкубация қилинади.
5. СsCl дан сўнг, бромид этидий 20 ССС билан тўйинтирилган изоамил спиртида экстракция қилиб, диализланади ва 0,5 М ли NaCl билан тўйинтирилган фенол билан экстракция қилинади, фенолдан тозалаш учун хлороформ билан аралаштирилиб центрифугаланади ва ДНК этанолда чўктирилади.

Ти-плазмид ДНКсини олиш. (Ж.Ден.Мисробиол., 113,229-242,1979. Сассе эт ал. Идентифисатион анд чарактеризатион оф ларге пласмидс ин Рҳизобиум мелилоти усинг агаросе гел элестропҳоресис).

1. Бактериялар 50 мл озуқа муҳитида ўстирилади (қандсиз). Экспоненциал фаза охирида чўктирилади.
2. Охириги миқдори 1М гача NaCl солинади ва 30 дақиқа чайқатиб, аралаштирилади.
3. ТЕ-буфер (0,05 М трис, 0,02 М ЭДТА, рН 8,0) билан ювилади. ТЕ-буфери (100 мг бактерия 0,5 мл буферда) да эзилади.
4. 0,5 мл суспензияга (суюқликка) 9,5 мл лизис қилувчи буфер (ТЕ-буфер 1% СДС, рН12 45 мл NaOH) солинади ва чайқатгичда 100 айл./дақ. тезликда аралаштирилади.
5. 20-25 дақиқа 34⁰С хароратда инкубация қилинади.

6. Магнитли аралаштиргичда 2 дақиқа 100 айл./дақ тезликда аралаштирилиб, сууюқликнииг рН 8,5-9,0 гача 0,6 мл рН 7,0 бўлгаи трис-буфер қўшиш орқали камайтиради.
7. Лизатга 3 % гача NaCl солинади ва 30.дақ. инкубация қилиниб, 3% NaCl ва сувда тўйинтирилган фенол солинади.
8. Иккала фаза магнит аралаштиргичда 300 айл./дақ тезликда 10 сек, сўнг 100 ай/дақ тезликда 2 дақ. аралаштирилади.
9. 10 дақ 5000г-да центрифугаланади ва устки фаза йиғиб олинади.
10. Сууюқликка 0,3 М гача Na ацетат ва 2 ҳажм совуқ этанол қўшиб, кеча давомида ДНК чўктирилади.
11. -10⁰Сда 12000г 20 дақ. центрифугаланиб ДНК чўктирилади.
12. Чўкма 100 мкл ТЕС-буфери (0,05 М Трис, 0,005 М ЭДТА, 0,05М NaCl, рН 8,0) да эритилади ва -20⁰Сда сақланади ёки NaCl билан тозаланади.

Фойдаланилган адабиётлар.

1. Т.С.Сурриер э.В.Настер. Аннал. Биочем. П 76,431-441, 1976.
2. Коекман эт. ал., Пласмид 4,184-195, 1980
3. Ж.Ден.Мисробиол., 113,229-242,1979. Сассе эт ал. Идентифисатион анд чарактеризатион оф ларге пласмидс ин Рхизобиум мелилоти усинг агаросе гел элестропхоресис
4. Клонирование ДНК. Методы. Москва, Мир 1988
1. Большой практикум по биотехнологии : учеб. пособие / Т. Г. Волова, И. В. Кожевников, Л. А. Франк [и др.]. – Красноярск : Краснояр. гос. ун-т, 2005. – 128 с.
2. Винаров, А. Ю. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза / А. Ю. Винаров, Л. С. Гордеев, А. А. Кухаренко, В. И. Панфилов ; под ред. В. А. Быкова. – М. : ДеЛи Принт, 2005. – 278 с.
3. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во СО РАН. – 1999. – 252 с.
4. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. – Новосибирск : Наука, 2003.
5. Войнов, Н. А. Пленочные биореакторы / Н. А. Войнов, Е. В. Сугак, Н. А. Николаев, С. М. Воронин. – Красноярск : Изд-во «Боргес», 2001. – 252 с.
6. Войнов, Н. А. Пленочные трубчатые газо-жидкостные реакторы / Н. А. Войнов, Н. А. Николаев. – Казань : Отечество, 2007. – 271 с.
7. Высоцкий, Е. С. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных / Е. С. Высоцкий, С. В. Маркова, Л. А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – С. 40, 404–417.
8. Гладков, Е. А. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжелым металлам. Оценка комплексной фитотоксичности тяжелых металлов и получение растений, обладающих комплексной

устойчивостью // Биотехнология / Е. А. Гладков, О. В. Гладкова. – 2007. – № 1. – С. 81–85.

9. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

10. Другов, Ю. С. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды, почвы и биосред / Ю. С. Другов, И. Г. Зенкевич, А. А. Родин. – М. : Бином, 2005. – 752 с. —

11. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии / под ред. Т. А. Егоровой, С. М. Клуновой, Е. А. Живухиной. – М. : Академия, 2003. – 208 с.

12. Жимулев, И. В. Общая и молекулярная генетика : учеб. пособие / И. В. Жимулев. – 3-е изд. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство. – 2006. – 479 с.

13. Зобова, Н. В. Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя / Н. В. Зобова, Е. Н. Коньшева. – Новосибирск : СО Россельхозакадемия, 2007. – 124 с.

14. Использование биотехнологических методов в генетико-селекционных исследованиях плодовых и ягодных культур / Н. И. Савельев, В. М. Тюленев, Н. В. Солоновых [и др.]. // Сельскохозяйственная биология, 2003. – № 30. – С. 51–63.

15. Квеситадзе, Г. И. Введение в биотехнологию / Г. И. Квеситадзе, А. М. Безбородов / РАН. Ин-т биохимии им. А. Н. Баха. – М. : Наука, 2002. – 283 с.

16. Клонирование ДНК (методы) / под ред. Д. Гловера. – М. : Мир, 1988.

17. Максимов, Г. В. Теоретические и практические аспекты использования биотехнологии и геномной инженерии / Г. В. Максимов. – М. : Вузовская книга, 2004.

18. Минкевич, И. Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов / И. Г. Минкевич. – Москва – Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика» ; институт компьютерных исследований, 2005. – 352 с.

19. Отто, М. Современные методы аналитической химии / М. Отто. – М. : Техносфера, 2003. – Т. 1. – 412 с.
20. Отто, М. Современные методы аналитической химии / М. Отто. – М. : Техносфера, 2003. – Т. 2. – 281 с.
21. Очерки экологической биофизики / под ред. Т. Г. Воловой. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2003.
22. Першина, Л. А. Основные методы культивирования ин витро в биотехнологии растений : учеб. пособие / Л. А. Першина. – 2-е изд., перераб. И доп. – Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2005. – 142 с.
23. Репин, С. В. Медицинская клеточная биология / С. В. Репин, Г. Т. Сухих. – М., 1998.
24. Сазыкин, Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Академия, 2006. – 256 с.
25. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / под ред. В. С. Шевелухи. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
26. Современные проблемы и методы биотехнологии : учеб. пособие / Н. А. Войнов и [др.]. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – с. – (Современные проблемы и методы биотехнологии : УМКД № 1323-2008 / рук. творч. колл. лектива Т. Г. Волова).
27. Сычев, С. Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколоночных хроматографах серии Миллихром : учеб. пособие / С. Н. Сычев, К. С. Сычев, В. А. Гаврилина. – Орел, 2002. – 258 с.
28. Суриков, В. Т. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Образование ионов / В. Т. Суриков. – Екатеринбург : УрО РАН, 2006. – 276 с.
29. Торчилин, В. П. Имобилизованные ферменты в медицине / В. П. Торчилин. – М. : ВНИИЦ, 1998. – 198 с.
30. Трансгенные растения для фармакологии / Е. Б. Рукавцова, Я. И. Бурьянов, Н. Я. Шульга, В. А. Быков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – № 2. – С. 3–12.

31. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – 399 с.
32. Боехм Р. Биопродустион оф тхерапеутис протеинс ин тхе 21ст сентурй анд тхе роле оф плантс анд плант селлс ас продустион платформс. Анн. НЙ Асад. Сси, 2002, В.1102(1), П.121-134.

