

## 23-Laboratoriya ishi

### NUKLEIN KISLOTALAR TARKIBINI O'RGANISH

#### Nuklein kislotalarni (DNK)ni tabiiy manba – paxta chigitidan ajratib olish

**Kerakli asbob va reaktivlar:** chayqatgich apparat, sovitgichli sentrifuga, ajratgich voronka, PH metr LPU-0,1, 100; 200 ml li o'lchov silindrlari, shlifli, qopqoqli kolba, pipetka, hovoncha, probirka, 37°C li termostat, «a» eritma-tarkibida 0,1 M EDTA, 1M dodentsilsulfat (DDS) bor, natriy xloridning 0,15 M eritmasi (PH=7,0), «b» eritma tarkibida 0,1 M EDTA, 2% DDS bor, natriy xloridning 0,15 M eritmasi (PH=6,0), «v» eritma tarkibida 0,1 M EDTA, 5% DDS bor, natriy xloridning 0,15 M eritmasi (PH=8,0), 96% li etanol, 78% li etanol, suvga to'yintirilgan fenol, fenol-xloroformning 1:1 nisbatdagi aralashmasi, NaCl ning 0,15 M va 0,015 M eritmalari, papain (tarkibida 0,005 M EDTA bor 88 mkg/ml eritma, PH=6,5), tripsin (1 mkg/ml, PH=7,2), pronaza (500 mkg/ml, PH=8,0), tripsin (375 mkg/mo); papain (50 mkg/ml), RNK-aza (50 mk/ml), tarkibida 1,5 M natriysitrat bor 0,015 M NaCl eritmasi, tarkibida 0,001 M EDTA bo'lgan natriy atsetatning 3 M eritmasi, propanol.

O'simlik to'qimalaridan DNK ni ajratib olishda tekshiriladigan ob'ektlarni gomogenizatsiyalash, eritmadan nukleoproteinni ekstraksiyalash, olingan preparatni oqsilsizlantirishda qo'llaniladigan usullarni tanlash katta ahamiyatga ega. quyida o'simlik materiallaridan yuqori molekulyar DNK ajratib olishning optimal varianti keltirilgan.

**Ishning bajarilishi.** Suyuq azotda fiksatsiya qilingan 100 g piyozning meristema to'qimasini hovonchada bir xildagi mayin kukun hosil bo'lguncha maydalab, uning ustiga tarkibida 1 ml fenol bo'lgan 100 ml eritma qo'shiladi va yana bir xil massa hosil bo'lguncha maydalanadi. Hosil bo'lgan gomogenat 100 ml fenol bilan chayqatiladi. Tayyor bo'lgan aralashma 0°C da 20 minut 6000 ayl/min (10000 g) tezlikda sentrifugalanadi. Bu vaqt sentrifuga probirkasida 3 ta qavat hosil bo'ladi; probirka tubida fenol, uning o'rtasida oqsil va maydalangan o'simlik to'qimalari, yuqori qismi esa tarkibida DNK bor suvli qavat, o'rta qavat olinib, «a» eritma bilan yuqoridagidek ekstraksiya qilinadi. Bu operatsiya suv qavatida DNK qolmaguncha davom ettiriladi. Shundan keyin o'simlik to'qimasining qoldig'i «b» va «v» eritmalari bilan yuqoridagicha yana ekstraksiya qilinadi. Eritmadagi DNK ma'lum miqdordagi ekstraktga 96% li spirt quyilganda cho'kma hosil bo'lishiga qarab aniqlanadi.

**Oqsilsizlantirish.** Olingan DNK ekstraktini oqsilsizlantirish quyidagicha olib boriladi. Ekstraktga teng miqdorda xloroform-fenol (1:1) aralashmasini quyib, 20 minut chayqatiladi, so'ngra yuqoridagi sharoitda sentrifugalanadi. Sentrifugatning

suvli qavatini ajratib olib, unga ikki hajm 96% li etanol qo'shib, DNK cho'ktiriladi. Cho'kmada fenol va DDS ni yo'qotish uchun 5-7 marta 70% li etanol bilan yuviladi. Cho'kma 0,15 M NaCl da eritilgach, quyidagi usullarning biri yordamida oqsilsizlantiriladi:

1) papain (800 mkg/ml)+0,005 M EDTA (PH=6,5) bilan 37°C da 2 soat davomida inkubatsiya qilish;

2) tripsin (1 mkg/ml) bilan (PH=7,2) 37°C da 1 soat davomida inkubatsiya qilish;

3) pronaza (500 mkg/ml) bilan (PH=8,0) da xona temperaturasida bir sutka davomida inkubatsiya qilish;

4) 1 soat 37°C da tripsin (375 mkg/ml) bilan inkubatsiya qilish, so'ngra yuqoridagidek xloroform-fenol aralashmasi bilan ishlash. Shundan so'ng eritmadan DNK 96% li etil spirt yordamida cho'ktiriladi. Buning uchun aralashmaga 1:2 nisbatda etil spirt qo'shiladi.

5) olingan cho'kma 5-7 marta 70% li etanol bilan yuviladi. DNK cho'kmasi bufer eritmada eritiladi va papain bilan (50 mkg/ml) 37°C da 1 soat inkubatsiya qilinadi.

Eritmadagi DNK 96% li etanolda cho'ktirilgach, 0,15 M natriy xloridda eritiladi.

**RNK va polisaxaridlardan tozalash.** Buning uchun DNK eritmasining PH ko'rsatkichi HCl yordamida 5,0 ga keltiriladi. RNK-aza eritmasidan oz miqdordagi DNK-aza aralashmasini yo'qotish uchun dastlab 10 minut 80°C da qizdiriladi. So'ngra DNK eritmasi RNK-aza bilan (50 mkg/ml) 37°C da 1 soat inkubatsiya qilinadi. Shundan keyin DNK eritmasi yana fenol-xloroform aralashmasi bilan yuqoridagidek ishlanadi va DNK 1:2 hajmdagi etanol bilan cho'ktiriladi. DNK cho'kmasi tarkibida 1,5 mm natriy tsitrat bo'lgan 0,015 M natriy xlorid eritmasida eritiladi va unga tarkibida 0,001M EDTA bo'lgan 3 M (PH=7,0) natriy atsetat (1:10) qo'shiladi. Olingan eritmaga doimo aralashtirib turgan holda tomchilatib 0,5-0,54 hajm izopropanol qo'shiladi. Bu vaqtda faqat DNK cho'kib, RNK parchalanadi va polisaxaridlar eritmada qoladi. DNK cho'kmasi 70% li etanolda 5°C da saqlanadi. Ajratib olingan DNK preparatlarining xossasiga qaraganda pronaza yordamida oqsilsizlantirish eng optimal variant hisoblanadi. 4.1.1.-jadvalda ajratib olingan DNK ning fizik-ximiyaviy xossalari keltirilgan.

4.1.1.-jadval

№	Oqsilsizlantiruvchi agent	Sedimentatsion kinstanta, (S)	Oqsil miqdori, (%)	Giperxrom effekti, (%)
1	Papain	21,2	3,0	24,0
2	Tripsin	26,8	2,1	25,0
3	Pronaza	27,5	0,93	33,3

4	Tripsin i papain	21,7	1,5	24,0
---	------------------	------	-----	------

## **Achitqidan nukleoproteinlarni ajratib olish va gidrolizlash**

(Laboratoriya ishi)

**Kerakli asbob va reaktivlar:** chinni hovoncha, pipetka, laboratoriya sentrifugachi, sentrifuga tarozisi, shisha tayoqcha, 25-30 sm uzunlikdagi shisha nay yoki qaytar sovitgich, gaz gorelka yoki spirt lamp, sentrifuga probirkalari, oddiy ximiyaviy probirkalar, efir (dietil efir), 5% li sirka kislota  $H_2SO_4$  ning 10% li eritmasi, NaOH ning 0,4; 10; 30% li eritmalari,  $CuSO_4$  ning 1; 7% li eritmasi, kontsentrangan ammiak eritmasi, molibden reaktivi, toza qum, quritilgan achitqi.

Nukleoproteinlarning ximiyaviy tarkibini o'rganish uchun qulay ob'ekt achitqi hujayralari hisoblanadi. Quruq achitqi massasi yoki undan ajratib olingan nukleoproteinni sulfat kislota yordamida gidrolizlandda, polipeptidlarga, purin va pirimidin asoslariga uglevod komponentiga va fosfat kislota parchalanadi. Gidroliz mahsulotlarini spetsifik sifat reaksiyalar yordamida aniqlash mumkin.

Polipeptidlar biuret reaksiyasi yordamida aniqlanadi. Purin asoslarini kumush oksidining ammiakli eritmasi, uglevodlarni Trommer yoki Feling reaktivlari, fosfat kislota esa ammoniy molibdat yordamida aniqlash mumkin.

### **Ishning bajarilishi**

#### ***1-bosqich. Achitqidan nukleoproteidlarni ajratib olish***

Chinni hovonchaga 1 g achitqi solib, uning ustiga 1-2 tomchi efir, 4-5 tomchi suv tomiziladi va 0,2-0,4 g qum solinadi, so'ngra 1-2 minut tuyuladi. Shundan so'ng aralashma ustiga o'yuvchi natriyning 0,4% li eritmasidan 4 ml quyib, yana 5 minut tuyuladi. Hovonchadagi massa sentrifuga probirkachiga solinadi, ikkinchi shunday probirkaga suv qo'yib, sentrifuga tarozisida tenglashtiriladi va 10 minut sentrifugalanadi. Sentrifugat pipetka yordamida toza hovonchaga o'tkaziladi va shisha tayoqcha yordamida, aralshtirib turgan holda 5% li sirka kislota eritmasidan 1,5 ml quyiladi. Bunda nukleoproteid cho'kmasi hosil bo'ladi. Hovonchadagi aralashma pipetka yordamida sentrifuga probirkasiga o'tkaziladi va 10 minut

sentrifugalanadi. Sentrifugat to'kib tashlanadi, nukleoprotein cho'kmasi esa gidrolizlanadi.

## ***2-bosqich. Nukleoproteinlarni gidrolizlash***

Probirkaga nukleoprotein cho'kmasi (yoki 100 mg quritilgan achitqi) solinib, ustiga 10% li sulfat kislotasi eritmasidan 4 ml qo'yiladi. Probirka og'zi sovitgich sifatida uzun rezina nay (25-30 sm) o'tkazilgan probka bilan berkitiladi va asbest to'rga qo'yib, kuchsiz alanga yoki elektr plitkasida qizdiriladi. Aralashma bir soat qaynatilgandan keyin qizdirish to'xtatiladi va sovutiladi, so'ngra filtrlanadi. Filtr bilan polipeptidlar, purin asoslariga, riboza va fosfat kislotaga xos quyidagi reaksiyalar qilib ko'riladi:

*a) polipeptidlarga xos Biuret reaksiya.* Probirkaga 5 tomchi gidrolizat olib, unga 10% li o'yuvchi natriy eritmasidan 10 tomchi va 1% li mis (II) sulfat eritmasidan 1 tomchi qo'shib, chayqatiladi. Suyuqlik pushtibinafsha rangga bo'yaladi.

*b) purin asoslariga xos kumush bilan qilinadigan reaksiya.* 10 tomchi gidrolizatdan olib, uni kontsetrlangan amiakning 1 tomchisi bilan neytrallanadi va unga 1% li kumush nitrat eritmasidan 5 tomchi qo'shiladi. 3-4 minutdan keyin purin asoslarining kumushli qoramtir cho'kmasi paydo bo'ladi.

*v) riboza va dezoksiribozaga xos Trommer reaksiyasi.* 5 tomchi gidrolizat olib unga 30% li NaOH eritmasidan 10 tomchi qo'shib, mis (II) gidroksid loyqasi hosil bo'lguncha 7% li mis (II) sulfat eritmasidan tomiziladi. Suyuqlikni aralashtirib, qaynaguncha qizdiriladi. Riboza yoki dezoksiriboza mis (II) oksidini qizil rangli mis (I) oksidiga qaytarganligi uchun qizg'ish loyqa hosil qiladi.

*g) fosfat kislotaga xos molibden bilan qilinadigan reaksiya.* 20 tomchi molibden reaktiviga 2-3 tomchi gidrolizat qo'shib, bir necha minut qizdiriladi. Agar gidrolizatda fosfat kislota bo'lsa, suyuqlik limon sarig'i rangiga kiradi. Sovitilganda sariq kristall cho'kma paydo bo'ladi.