

24-Laboratoriya ishi

Nuklein kislotalar tarkibini o'rganish

Kerakli asbob va reaktivlar: vakuum eksikator; ampula, laboratoriya sentrifugasi, sentrifuga probirkasi, «M» tipdagi Leningrad xromatografiya qog'ozi, ultraxemiskop, spektrofotometr, xromatografiya kamerasi, 37°C li termostat, perxlorat kislotaning 56% li yoki 70% li eritmasi, KOH ning 4 M eritmasi, kontsentrlangan HCl, HCl ning 0,1 n eritmasi, DNK preparati, 36% li etil spirni erituvchi sistema-n-butanol-N₂O –kontsentrlangan ammiyak-60:10:0,1.

Dezoksiribonuklein kislotaning nukleotid tarkibini aniqlash uchun avval toza DNK perxlorat kislota ta'sirida gidrolizlanadi, so'ngra gidrolizatdagi nukleotidlar kolonkali, qog'oz xromatografiyasi yoki elektroforetik usullar yordamida ajratiladi va nukleotidlar miqdori spektrofotometrik usulda aniqlanadi.

DNK nukleotid tarkibini qog'oz xromatografiya usulida aniqlash

Ishning bajarilishi. 200-500 mg hayvon to'qimasidan ajratib olingan DNK preparati 2 marta 36% li etil spirtida yuvilgach, vakuum eksikatorida quritiladi. Quritilgan DNK 1-2 tomchi 70% li (yoki 56% li) perxlorat kislota eritmasida namlanadi va kavsharlangan ampulada, qaynab turgan suv hammomida 1 soat (agar 56% li perxlorat kislota ishlatilsa, ikki soat) gidrolizlanadi. Bunday sharoitda DNK erkin asoslargacha gidrolizlanadi. Ampula ochilib, gidrolizat kapilyar yordamida sentrifuga probirkasiga o'tkaziladi. Ampula devori juda oz miqdordagi distillangan suv bilan chayqaladi. Chayindi ham sentrifuga probirkasiga quyiladi. Gidrolizat quyilgan probirkaga avval 2 tomchi 4 M kaliy gidroksid, so'ngra neytrallanguncha tomchilatib 1 M o'yuvchi kaliy eritmasi qo'shiladi. Shundan keyin kapilyar yordamida 1 tomchi kontsentrlangan xlorid kislota tomizib, 10 minut 2000-3000 ayl/min tezlikda sentrifugat keyingi xromatografik analiz uchun ishlatiladi.

DNK gidrolizatini qog'oz xromatografiya usulida analiz qilish

Gidrolizatni tarkibiy qismlarga ajratish uchun ishqoriy muhitli erituvchi sistema: n-butanol-suv-kontsentrlangan ammiak (60:10:0,1 nisbatda) ishlatiladi. Pastga oquvchi xromatografiya uchun «Leningradskaya medlennaya» («M»)

tipidagi qog'ozdan foydalaniladi. «Guvoh» modda sifatida 25-50 nonamol miqdorda nuklein kislotalar tarkibiga kiruvchi purin va pirimidin asoslar tomiziladi. Tekshirilayotgan gidrolizatlar xromatogramмага 0,05-0,1 ml hajmda tomiziladi, bu bitta dog'dagi «guvoh» modda sifatida tomizilgan asoslar miqdoriga to'g'ri keladi. Xromatografik ajralish protsessi 20-40 soat davom etadi. Azotli asoslarning qog'ozdagi lokalizatsiyasi ultraxemiskopda aniqlanadi. Asoslar start chizig'idan boshlab quyidagi tartibda joylashadi: guanin, sitozin, 5-metiltsitozin, adenin, timin. Gidrolizatdagi asoslarni miqdoriy jihatdan aniqlash uchun xromatogrammadagi ultraxemiskop yordamida chegaralangan zonalar qirqib olinib 5 ml 0,1 n HCl eritmasida 37°C da, 12 soat davomida elyutsiya qilinadi. Kontrol sifatida qog'ozning azot asoslari tarqalmagan qismi qirqib olinib, bir xil sharoitda elyutsiya qilinadi. Elyuatlarning optik zichligi spektrofotometrning 1 sm li kyuvetalarida kontrolga qarshi quyidagi jadvalda berilgan to'lqin uzunliklarda aniqlaniladi:

4.2.1. -jadvall

Asoslar	To'lqin uzunligi	Hisoblash uchun koeffitsient
Guanin	250-290	0,714
Adenin	250-290	0,399
Tsitozin	270-290	0,940
5-metiltsitozin	280-300	0,893
Timin	260-290	0,743

Hisoblash uchun 4.2.1. -jadvall asosida optik zichlik ayirmasi, masalan, adenin uchun $D = D_{260} - D_{290}$ topilib, bu miqdorni hisoblash koeffitsientiga ko'paytirilsa, 5 ml elyuatdagi asosning mikromol miqdori kelib chiqadi.

Hayvon to'qimalaridagi DNK miqdorini aniqlash

(Laboratoriya ishi)

Kerakli asbob va reaktivlar: laboratoriya sentrifugasi, suv hammomi, shisha tayoqcha, Keldal kolbasi, 50 ml li o'lchov silindri, darajalangan o'lchov probirkasi, fotoelektrokolorimetr, probirka, shtativ, muz hammomi, NaOH ning 1 n eritmasi,

NaCl ning 20% li sirka kislotadagi to'yingan eritmasi, etil spirt, trixlor sirkaning 5% li eritmasi, konsentrlangan sulfat kislota, 30% li vodorod peroksid, NaOH ning 30% li eritmasi, universal indikator qog'oz, ammoniy molibdatning 5% li eritmasi, gidroksinonning 1% di eritmasi, karbonat sulfat aralashmasi, tarkibida 1 mkg/ml fosfor bor KH_2PO_4 ning standart eritmasi, jigar yoki taloq, perxlorat kislotaning 0,5 n eritmasi, Dishe reaktivi, 0,2 mg/ml konsentratsiyali dezoksiribozaning standart eritmasi.

DNK A.S.Orlov va Ye.I.Orlova usuli bo'yicha miqdoriy jihatdan aniqlanadi. Bu usulning mohiyati shundaki, tekshiriladigan to'qima ishqoriy muhitda gidrolizlangandan keyin, NaCl ning sirka kislotadagi to'yingan eritmasi quyilganda oqsillar cho'kib, eritmada DNK va tarkibida fosfor bor boshqa moddalar qoladi. DNK ni boshqa fosforli birikmalardan spirt yordamida cho'ktirib, ajratib olinadi. To'qimadagi DNK miqdorini, undagi fosfor yoki dezoksiribozaga qarab aniqlash mumkin.

Ishning bajarilishi

1-bosqich. Jigar yoki qora taloqni ishqor ta'sirida gidrolizlash

100 mg to'qima sentrifuga probirkasiga solinib, uning ustiga 1 ml 1 n NaOH eritmasidan quyib, qaynab turgan suv hammomiga 15 minut quyiladi. Vaqti-vaqti bilan probirkadagi aralashma shisha tayoqchya bilan aralashtirib turiladi. Shu vaqt ichida to'qima to'la erib ketadi.

2-bosqich. Oqsillar va DNK ni cho'ktirish

Gidrolizat asta-sekin avvalo xona temperaturasigacha, so'ngra muz yordamida 0°S gacha sovitiladi. Uning ustiga NaCl ning 20% li sirka kislotadagi to'yingan eritmasidan 0,5 ml qo'shib, oqsil cho'ktiriladi. 5 minutdan keyin aralashma 5 minut minutiga 3000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi.

Sentrifuga probirkalaridan biriga 6 ml etil spirt qo'yib, sovitib qo'yiladi. Sovitilgan spirt ustiga sentrifugat (cho'kma ustidagi suyuqlik) qo'yiladi: bu vaqtda DNK cho'kadi, RNK va tarkibida fosfor bor boshqa birikmalar spirtli eritmada qoladi. DNK ni to'laroq cho'ktirish uchun, sentrifugalanganda olingan oqsil cho'kmasini 1 ml 1 n li NaOH da (sovitilgan) eritiladi va tezda NaCl ning 20% li

sirka kislotadagi to'yingan eritmasidan 0,5 mol qo'shib, qaytadan cho'ktiriladi. Aralashma 5 minut, minutiga 5000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi. Sentrifugat birinchi DNK cho'ktirilgan spirli aralashmaga qo'yiladi. Probirkadagi suyuqlik yaxshilab aralashtirilgach, DNK ni to'laroq cho'ktirish uchun muz hammomiga 1 soat qoldiriladi. Bir soatdan keyin probirkadagi aralashma 5 minut yuqori tezlikda-minutiga 5000 marta aylanish tezligida sentrifugalanadi; sentrifugat to'kib tashlanadi. DNK cho'kmasi esa 2 marta 5% li trixlor sirka kislota bilan yuviladi. DNK miqdorini uning tarkibidagi fosfor yoki dezoksiribozaga qarab aniqlash mumkin.

3-bosqich. DNK ni fosfor bo'yicha miqdoriy aniqlash

Ajratib olingan DNK kuydirilganda (minerallashtirish) fosfat erkin holatda ajraladi.

Qaytaruvchi ishtirokida fosfatni ammoniy molibdat bilan reaksiyasida hosil bo'lgan molibden ko'kini kolorimetrik aniqlash mumkin, chunki rangning ravshanlik darajasi fosfor miqdoriga bog'liq bo'ladi. Trixlor sirka kislota bilan yuvilgan DNK batamom Keldal kolbasiga o'tkazilib, ustiga 1,5 ml kontsentrangan sulfat kislota qo'shiladi va tiniq suyuqlik hosil bo'lguncha minerallashtiriladi. DNK ni kuydirishni tezlashtirish uchun 30% li vodorod peroksid qo'shiladi. Minerallashtirish tugagandan keyin Keldal kolbasidagi suyuqlik konussimon kolbaga o'tkazilib, 30% li NaOH eritmasi yordamida (universal indikator bo'yicha) neytrallanadi. So'ngra suyuqlik 50 ml li o'lchov kolbasiga o'tkaziladi va belgi chiziqqacha distillangan suv qo'yib, hajmi 50 ml ga yetkaziladi.

Kolbadan 5 ml suyuqlik olib, 10 ml li darajalarga bo'lingan o'lchov probirkaga quyiladi, unga 5% li ammoniy molibdat eritmasidan 0,5 ml va 1% li gidroksinon eritmasidan 0,5 ml qo'shiladi. 5 minutdan keyin probirkaga 2 ml karbonat-sulfit aralashmasidan qo'shib, suv bilan umumiy hajm 10 ml ga yetkaziladi. 10 minutdan keyin rangli eritmaning optik zichligi fotoelektrokolorimetrda qizil-svetofiltrda (600 nm) aniqlaniladi. Optik zichligi aniqlangach tekshirilayotgan ob'ektdagi fosforning miqlorini kalibrlash egri chizig'i yordamida hisoblab topish mumkin.

Kalibrlar egri chizig'i chizish uchun 1 ml eritmada 1; 2; 3; 4 mkg fosfor bo'ladigan KH_2PO_4 ning standart eritmalar tayyorlanadi. Shu standart eritmalar bilan yuqoridagi rangli reaksiya qilinib, ularning optik zichligi FEK da aniqlanadi. Abtsissa o'qiga standart eritmalarining konsentratsiyasi, ordinata o'qiga optik zichlik (FEK ko'rsatkichi) qo'yiladi.

Tekshirilayotgan ob'ektdan fosforga qarab DNK miqdorini quyidagi formula yordamida hisoblab topish mumkin:

$$x = \frac{a \cdot 50 \cdot 10,1}{5}$$

bu yerda: a-kalibrlash egri chizig'i asosida topilgan fosfor miqdori (mkg); 50-minerallashtirilgan DNK ning umumiy hajmi (ml); 10,1-fosfor miqdorini DNK ga o'tkazish uchun koeffitsient; 5-rangli reaksiya uchun olingan gidrolizat.

4-bosqich. DNK miqdorini dezoksiriboza xos rangli reaksiya asosida aniqlash.

Trixlorosirka kislota bilan yuvilgan DNK cho'kmasiga 0,5 n NaOH eritmasidan 0,5 ml qo'yib, probirka og'zini uzun gaz o'tkazgich shisha naycha o'rnatilgan probirka (havo sovutkichi) bilan berkitib, qaynab turgan suv hammomiga 20 minut quyiladi. Sovutilgan gidrolizatdan 2 ml olib, uning ustiga 4 ml Dishe reaktivi qo'shiladi. Aralashma qaynab turgan suv hammomida 10 minut qizdiriladi, so'ngra sovutiladi. Aralashma barqaror ko'k rangga bo'yaladi. Rangning ravshanlik darajasi FEK da, qizil svetofiltr (600 nm) yordamida aniqlanadi. Zarurat bo'lsa, gidrolizat Dishe reaktivi –suv (2:1 nisbatdagi) bilan suyultiriladi. To'qimadagi DNK miqdori dezoksiriboza asosida tayyorlangan kalibrlash egri chizig'idan foydalanib, hisoblab topiladi.

Dezoksiriboza uchun kalibrlash egri chizig'i quyidagicha chiziladi: avval 1 ml da 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mg dezoeksiriboza bor standart eritmalar seriyasi tayyorlanib, Dishe reaktivi bilan rangli reaksiya qilinadi. Aralashma rangining ravshanlik darajasi FEK da aniqlanib optik zichligi ordinata o'qiga, dezoksiriboza miqdori abtsissa o'qiga qo'yib chiqiladi va grafik chiziladi.

DNK ni hayvon to'qimasidan ajratib olish va tozalash

(Laboratoriya ishi)

Kerakli asbob va reaktivlar: gomogenizator, 37°C li termostat, texnik tarozi, 50 va 500 ml li o'lchov silindrlari, laboratoriya sentrifugasi, 20 va 50 ml li shprits, 50; 200; 500 ml li stakanlar, shisha tayoqcha, tuzli eritma (tarkibi: 0,15M natriy sitrat 0,01 M EDTA), xloroform, izoamil spirt, etil spirt, perxlorat kislotaning 57% li eritmasi, etil efir, NaOH ning 0,5 n eritmasi, KOH ning 1 n va 5 n eritmalari, dodetsilsulfatning 20% li eritmasi, NaCl ning 5 m eritmasi, muskul yoki jigar.

Dezoksiribonuklein kislota (DNK) o'simlik, hayvon va mikroorganizmlar hujayralarida asosan yadroda, juda oz miqdorda, tsitoplazmada oqsil bilan bog'langan holatda bo'ladi. DNK ni ajratib olish uchun, uni oqsildan ajratish, turli biologik membranalardan tozalash zarur. DNK ni hujayradan ajratib olishda (u RNK bilan aralash holatda bo'ladi), avval uni RNK dan tozalab, so'ngra quritiladi.

Ishning bajarilishi

20 g hayvon to'qimasi (jigar, bo'qoq bezi) 100 ml tuz eritmasi bilan shisha gomogenizatorida maydalanadi. Olingan gomogenatga oxirgi kontsentratsiyasi 2% bo'lguncha 20% li dodetsilsulfat (10-12 ml) qo'shiladi va 37°C li termostatga yarim soat qo'yiladi. Hosil bo'lgan yopishqoq eritmaga nukleoproteidlarni dissotsilash uchun oxirgi kontsentratsiyasi 1 M bo'lguncha 5 M NaCl eritmasidan (25-26 ml) qo'shiladi. Gomogenat shliflangan qopqoqli kolbaga o'tqazilib, ustiga 24:1 nisbatdagi xloroform izoamil spirt aralashmasidan 400 ml qo'shib, 10-15 minut yaxshilab, chayqatiladi. Aralashma 50 ml li sentrifuga probirkalariga quyilib, 30 minut 2500 ayl/min tezlikda sentrifugalanadi. Bu vaqtda sentrifugat 3 ta fraktsiyaga bo'linadi: yuqori qavatda nuklein kislotalar, o'rta qavatda oqsillar, eng pastki qavatda-xloroformli fraktsiyada lipidlar va organik erituvchida eriydigan boshqa komponentlar qoladi.

Shpris yordamida yuqoriga fraktsiya so'rib olinadi va uni eritma tiniqlashguncha xloroform-izoamil spirt bilan ishlash 2-3 marta takrorlanadi. Tarkibida nuklein kislota bor suvli qavatlar birlashtirilib, ikki baravar ko'p miqdorda 96% li etil spirt quyilgan stakanga doimo aylanasi ga aralashtirib turgan holatda,

asta-sekin quyiladi. Natijada nuklein kislotalarning oq spiralsimon cho'kmasi hosil bo'ladi. So'ngra spiralsimon DNK shisha tayoqcha yordamida oz miqdorda 70% li etanol quyilgan stakanga o'tkaziladi. Bu operatsiya 2-3 marta takrorlanadi. So'ngra nuklein kislotalar cho'kmasi spirt-efir (1:1) aralashmasi va efir bilan yuvilgach, xona temperaturasida quritish uchun qoldiriladi.

DNK va RNK ajratish uchun 10-15 mg quruq nuklein kislota preparati 5 ml 0,5n NaOH da eritilib, 37°C li termostataga 18 soat qo'yiladi. Eritma sovutiladi va 57% li perxlorat kislota (HClO_4) yordamida neytrallanadi, so'ngra HClO_4 kontsentratsiyasi 2% ga yetkuncha kislota qo'shish davom ettiriladi. Hosil bo'lgan DNK cho'kmasi sovitkichli sentrifugada 10 minut 3000 ayl/min (3000g) tezlikda sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi. Olingan DNK cho'kmasi ikki marta 2% li HClO_4 2 marta 7% li spirt, spirt-efir (1:1) aralashmasi va nihoyat, efir bilan yuviladi. Har safar DNK cho'kmasi sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi, so'ngra DNK cho'kmasi havoda quritiladi.