

12-Laboratoriya ishi

To'qima va biologik suyuqliklardan oqsillarni ajratish usullari

(Laboratoriya ishi)

To'qimadan oqsillarni ajratib olish uchun ushbu to'qima hujayralari bir-biridan ajratiladi va ularning membranalari buziladi. Bunday maqsadga erishish uchun gomogenizatsiyalash (to'qimani maydalash), ultratovush ta'siri, vaqti-vaqti bilan muzlatish kabi usullardan foydalaniladi. So'ngra oqsillar eritmaga o'tkaziladi – ekstraksiyalanadi. Buning uchun ajratilayotgan oqsilning tabiatiga qarab bufer eritma va organik erituvchilar ishlatiladi. To'qima turli oqsil aralashmalarini tutgani uchun keyingi bosqichda oqsillarning har qaysisi alohida ajratiladi (fraksiyalanadi). Bunda zamonaviy ultrasentrifugalash, elektroforez, xromatografiya va immunobiologiya usullaridan foydalaniladi.

Miofibrillar – qisqaruvchi elementlar mushak hujayralari uchun xos birikmalardir. Ular miozin va aktin kabi qisqaruvchi oqsillari, tropomiozin va troponin kabi boshqaruvchi oqsillardan iborat. Miofibrill oqsillar suvda erimiydi, ammo bu oqsillarni 0,5 mol/l tuz eritmasi yordamida mushak to'qimasidan ajratib olish mumkin. Sarkoplazmaning (mushak hujayra gialoplazmasi) ko'pchilik oqsillari suvda yoki kuchsiz (0,05 mol/l) tuz eritmasida eriydi.

Bu fraksiya tarkibida mushak oqsillaridan tashqari boshqa a'zolarida uchraydigan oqsillar ham bo'ladi. Mushak to'qimalariga 5% li kaliy xlorid (KCl) eritmasi ta'sir ettirilganda miofibrill va sarkoplazma oqsillari ajraladi.

Tekshiriluvchi material: maydalangan mushak to'qimasi, 2g.

Reaktivlar: kaliy xloridning 5% li eritmasi, natriy gidroksidning 0,1 mol/l eritmasi, uchxlor sirka kislota (UXSK) ning 10% li eritmasi.

Kerakli anjomlar: sentrifuga tarozisi, sentrifuga probirkalari, chinni hovoncha, shisha qum, oddiy probirka va shtativlar, shisha tayoqcha, pipetka, byuretk, filtr qog'oz, doka va voronkalar.

Bajariladigan ish tartibi. 2 g mushak to'qimasini qaychi bilan maydalab, hujayralarini parchalash uchun chinni hovonchaga solinadi. Uning ustiga 2 ml 5% li kaliy xlorid eritmasi va shisha qum solib ishqalanadi. So'ng yana 3 ml kaliy xlorid

eritmasi solinadi-da, besh daqiqa ishqalash davom ettiriladi. Uning ustiga yana bir marta avvalgi eritmada 5 ml qo'shiladida yana besh daqiqa ishqalanadi. Shunda aralashma bir xil holatga keladi (bu aralashma ekstrakt deyiladi).

Olingan aralashma (ekstrakt) ikkita sentrifuga probirkasiga solinadi, shisha qum esa hovonchada qoladi. Probirkalar sentrifuga tarozisida pipetka orqali 5% li kaliy xlorid eritmasi qo'shish orqali bir xil og'irlikka keltiriladi. Gomogenat daqiqasiga 4000 marta aylanadigan sentrifugada 15 daqiqa aylantiriladi. Bunda hujayra bo'lakchalari, parchalangan hujayralar, biriktiruvchi to'qima tolalari cho'kmaga tushadi. Cho'kma ustidagi suyuqlik toza probirkaga olinadi.

Olingan ekstrakt bilan oqsilga xos rangli reaksiyalar o'tkaziladi va Louri yoki Biuret usullari yordamida oqsil miqdori aniqlanadi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Mushak to'qimalari oqsillarini ekstraktsiyalanish shartlarini qisqacha yozing, rangli reaksiyalar nomini va nima aniqlanganini hamda topilgan oqsil miqdorini daftaringizga yozing.

Sut oqsili – kazeinni ajratish

(Laboratoriya ishi)

Sut tarkibida albumin, globulin va murakkab oqsil – fosfoproteidlar vakili bo'lgan kazein bor. Kazein sut oqsillarining 80% ini tashkil qiladi. Kazein nordon xossaga ega bo'lib, uning izoelektrik nuqtasi $\text{PH}=6,7$ atrofida. Kazein kalsiy tuzlari bilan birikkan bo'lib, erigan holatda bo'ladi. Sut achiganda yoki u nordonlashtirilganda (kislota qo'shilganda) kazein ipir-ipir cho'kmaga tushadi.

Tekshiriluvchi material: sut.

Reaktivlar: xlorid kislotaning 1% li eritmasi, distillangan suv, natriy gidroksidning 10% li eritmasi, nitrat kislotaning konsentrlangan eritmasi, molibden reaktivi, mis (II) –sulfatning (CuSO_4) 1% li eritmasi.

Kerakli anjomlar: 50 ml sig'imli kimyoviy stakan, 50 ml sig'imli silindrlar, shisha tayoqcha, voronka, filtr qog'ozlar.

Bajariladigan ish tartibi. 50 ml sig'imli kimyoviy stakanga 3 ml sut va 7 ml distillangan suv solinadi. Suyuqliklar aralashtirilib, ustiga 10-15 tomchi 1% li xlorid

kislota eritmasi qo'shiladi. Kislota juda ehtiyotkorlik bilan tomchilab solinadi, chunki xlorid kislotaning ortiqcha miqdori kazein cho'kmasini eritib yuboradi. 3-5 daqiqa o'tgandan keyin ipir-ipir cho'kma hosil bo'ladi.

Xlorid kislotadan holi bo'lish uchun stakanga 10 ml distillangan suv solib, 5 daqiqa qoldiriladi. So'ngra cho'kma ustidagi suyuqlik osoyishtalik bilan olib tashlanadi. Cho'kmaga yana bir marta distillangan suv solib, xlorid kislotaning ortiqcha qismi olib tashlanadi. Probirkadagi suyuqlik asta-sekin aralashtiriladi va 5 daqiqa o'tgach aralashma qog'oz filtdan o'tkaziladi.

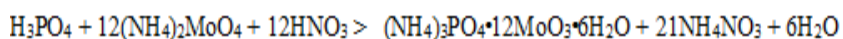
Kazein tarkibida fosfor borligiga ishonch hosil qilish uchun kazein ishqoriy muhitda parchalanadi (gidrolizlanadi), gidrolizat tarkibidagi fosfor molibden reaktivi yordamida aniqlanadi. Buning uchun filtdagi cho'kma qaytar muzlatgichli keng probirkaga olinadi va unga 6 ml 10% li natriy gidroksid eritmasi solinadi. Probirka qum hammomida bir soat davomida qizdiriladi. Suyuqlik sovutilgandan so'ng konsentrlangan nitrat kislota (20-30 tomchi) bilan lakmus bo'yicha kuchsiz nordon muhitgacha neytrallanadi. Neytrallash jarayonida oqsillarning chala parchalangan yuqori molekulali mahsuloti cho'kmaga tushadi.

Eritma tindirilgandan so'ng filtrlanadi. So'ngra suyuqlikdan olib oqsilga xos Biuret va fosfor kislotaga xos molibden reaksiyasi o'tkaziladi:

a) 5 tomchi gidrolizatga 1-2 tomchi natriy gidroksidning 10% li eritmasidan va 2 tomchi mis (II) sulfat tuzining 1% li eritmasidan solinadi. Hosil bo'lgan binafsha rang oqsil borligini isbotlaydi.

b) 10 tomchi molibden reaktivga 5 tomchi gidrolizat solib, bir necha daqiqa qaynatiladi. Eritma och sariq rangga bo'yaladi. Aralashma sovutilgach sariq rangli kompleks birikma cho'kmaga tushadi. Bu fosfor kislota borligini isbotlaydi.

Ushbu reaksiya tenglamasi quyidagicha:



Sigir sutidan kaziyni ajratish

(Laboratoriya ishi)

Ishning umumiy izohi. Sutning pH ini kazeinning izoelektrik nuqtasigacha (4,5-4,7) yetkazib, kazein cho'ktiriladi va organik erituvchilar bilan yog'sizlantiriladi.

Jihozlar va reaktivlar. 0,5 l o'lchagich stakan, sentrifuga (vakum filtrlagiya qurilmasi), pH – metr, suvchiz sirka kislota etil spirti (100 ml), efir (100 ml) pH 8,5 ga teng bo'lgan 50 mm natriy karbonat bufer eritmasi sut (300 ml).

Ishning borishi. Bu usul oqsillarning izoelektrik nuqtasidagi eruvchanligining juda kam bo'lishiga asoslangan. Oqsillar kontsentrangan eritmalaridan o'z izoelektrik nuqtalarida cho'kmagan tushadilar. 300 ml sutni aralashtirib turilgan holda 0,5 m CH_3COOH qo'shib (tomchilab) achitiladi. Bunda pH (pH – metr yordamida tekshirib turiladi) 4,5 ga yetkaziladi va achitilgan sut cho'kma hosil qilishligi uchun 1 soat sovuqxonada qoldiriladi. pH – ning 4,5 dan kamaymasligiga xarakat qilish kerak, chunki PH ko'rsatgichi kislotaliroq bo'lsa kazein erib ketadi. Kazein cho'kmasi sentrifugalani yoki filtrlanib ajratiladi.

Kazein cho'kmasiga teng hajmda spirt qo'shib aralashtiriladi va spirt filtrlanib (sentrifuga yordamida) ajratiladi. Ushbu jarayon yana bir marotaba qaytariladi.

Spirt bilan suvchizlantirilgan kazein cho'kmasidan yog'ini ajratish uchun uch marotaba 50 ml dan efir bilan ishlanadi. Tamoman yog'sizlantirilgan kazein havoda quritiladi va pH 8,5 ga teng bo'lgan 100-150 ml 50 mm natriy karbonat eritmasida eritiladi. Kazein eritmasi sentrifugalash yoki filtrlash bilan tindiriladi. Eritma tiniq bo'lishi kerak. Kazein, yuqorida yozilganidek tindirish uchun ikkinchi marotaba cho'ktiriladi. Qayta cho'ktirilgan kazein filtr qog'ozlari orasida siqiladi va quritiladi, iloji boricha quritish oldidan spirt va efir bilan ishlovni qaytarish kerak.

Qurilgan kazein tortiladi va unumi tajribaga olingan sut miqdoriga nisbatan aniqlanadi.

Olingan natijalarni rasmiylashtirish. Kazein oqsili ajratilishining qisqacha shartini, gidrolizat bilan o'tkazilgan rangli reaksiyalarning asoslanishini va uning natijasini daftaringizga yozing.