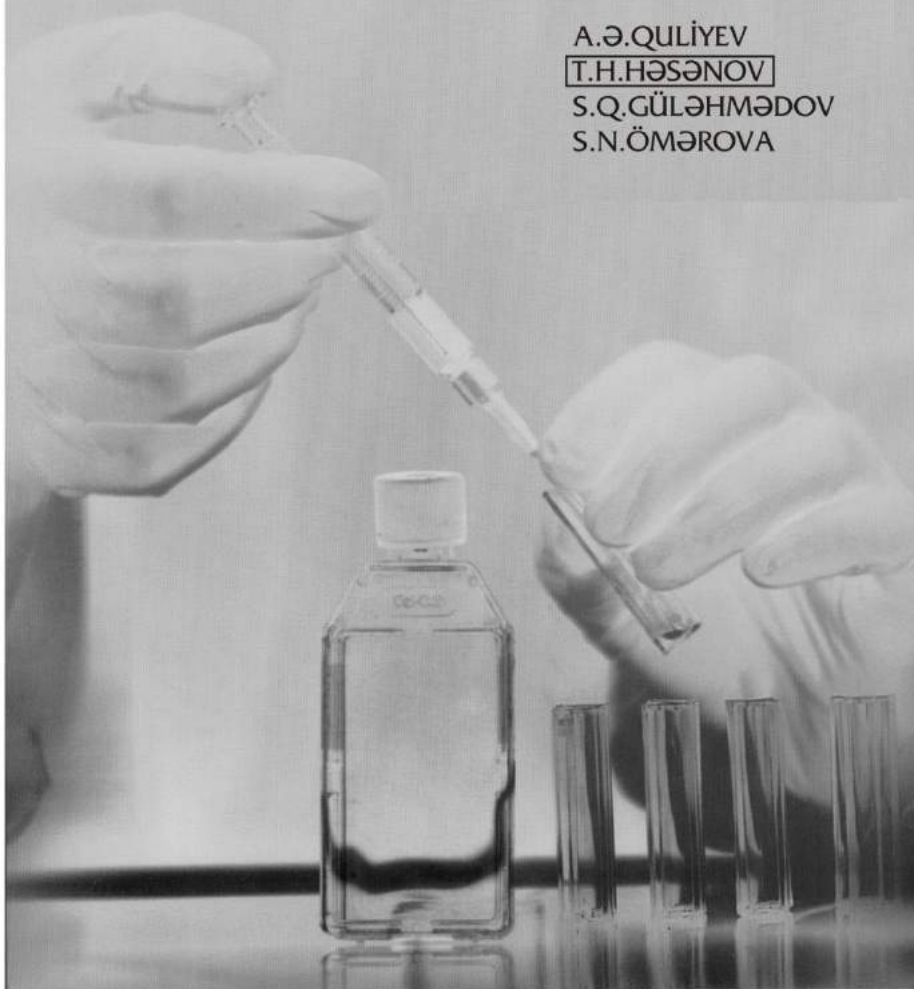


BİOKİMYA VƏ İMMUNOLOGİYADAN PRAKTİKUM

A.Ə.QULİYEV
T.H.HƏSƏNOV
S.Q.GÜLƏHMƏDOV
S.N.ÖMƏROVA



AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI TƏHSİL NAZİRLİYİ

BAKİ DÖVLƏT UNİVERSİTETİ

A.Ə.QULİYEV T.H.HƏSƏNOV
S.Q.GÜLƏHMƏDOV S.N.ÖMƏROVA

BİOKİMYA VƏ İMMUNOLOGİYADAN
PRAKTİKUM

Azərbaycan Respublikası Təhsil Nazirliyi
tərəfindən tövsiyə edilmişdir

BAKİ - 2005

MÜQƏDDİMƏ

Diqqətinizə çatdırdığımız praktikum Bakı Dövlət Universitetinin Biologiya fakültəsində təhsil alan tələbələr üçün nəzərdə tutulmuşdur. Kitabın ilk nəşri 1976-cı ilə, ikinci nəşri isə 1990-cı ilə təsadüf edir. Əvvəlki nəşrlərin hər ikisi kiril əlifbası ilə nəşr olunmuşdur. Lakin latın əlifbasına keçidlə bağlı kitabın yenidən nəşr olunması nəzərdə tutulmuş və bununla əlaqədar kitabda yeni əlavələr və düzəlişlər edilməsinə imkan yaranmışdır. Ona görə də ilk dəfə olaraq azərbaycan dilində immunologiyadan əsas laboratoriya məşğələlərini əhatə edən mövzular da kitaba daxil edilmişdir.

Praktikumun I hissəsində öz əksini tapmış laboratoriya məşğələlərinin əksər hissəsi keyfiyyət analizi xarakteri daşıyır və müxtəlif maddələrin, onların tərkibinə daxil olan funksional qrupların aşkar edilməsinə, fiziki, kimyəvi xassələrinin müəyyən olunmasına həsr olunmuşdur.

Proqramda olan ardıcılığa uyğun olaraq əvvəlcə «Zülallar və amin turşuları» bölməsi şərh edilmiş, onlar üçün keyfiyyət reaksiyaları, miqdarı analitik üsullar işıqlandırılmışdır. Əvvəlki nəşrlərdə olan və artıq hesab etdiyimiz bəzi məlumatlar ixtisar edilmiş və müvafiq düzəlişlər aparılmışdır.

I bölmədə nəzərdə tutulan, vəsfi və keyfiyyət xarakterli, fiziki-kimyəvi göstəriciləri səciyyələndirən işlər dəyişilmədən saxlanılmışdır. Xüsusi yanaşma tələb edən reaktiv və məhlulların hazırlanması haqqında məlumatlar «Əlavələr» bölməsində öz əksini tapmışdır.

Karbohidratlar bölməsində müəyyən yerdəyişmələr aparılmış və müvafiq düzəlişlər edilmişdir. IV və V bölmələr müvafiq olaraq, lipidlərə və vitaminlərə həsr edilmişdir. Fermentlərin əsasən zülal təbiətli olmasını nəzərə alaraq, onlarla bağlı işlər II bölməyə - zülallar və amin turşuları bölməsindən sonraya keçirilmişdir.

II hissə immunologiyadan laboratoriya işlərinə həsr edilmişdir. Burada VI, VII və VIII bölmələrə müvafiq olaraq heyvanlarla işləmək üçün təcrübələr, modellər, immunoferment analizi və nəhayət immunoqlobulinlərin ayrılması və analizi üçün lazım olan müasir metodlar-elektroforez, xromatoqrafiya, immunoblotinq geniş şərh edilmişdir.

İstər I, istərsə də II hissənin hər bölməsində verilən bilikləri möhkəmləndirmək məqsədi ilə bölmələrin sonunda suallar bloku verilmişdir. Kitabda verilən materiallara aydınlıq gətirmək üçün oraya çoxlu sayda cədvəl və sxemlər, həmçinin şəkillər salınmışdır.

Praktikumdan digər tibbi və bioloji profilli tədris ocaqlarında təhsil alan tələbələr, eksperimental-biokimyəvi, tibbi tədqiqat müəssisələrinin əməkdaşları da istifadə edə bilərlər.

Kitabın tərtibatı və mövzuların şərhinə aid oxucuların tənqidi fikirləri bizim üçün qiymətli olduğu üçün onlara əvvəlcədən minnətdarıq.

Müəlliflər

I HISSƏ: BİOKİMYA

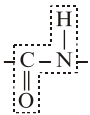
I BÖLMƏ

ZÜLALLAR VƏ AMİN TURŞULARI

Proteinlər adlanan sadə zülalların element tərkibi C, N, O, H, S; mürəkkəb proteidlərinki isə, prostetik qrupun kimyəvi təbiətindən asılı olaraq, əlavə digər kimyəvi elementlərdən ibarətdir. Prostetik qrupu nəzərə almasaq zülallar 17 amin turşusu, 1 imin turşusu (prolin), 2 amid-asparagin və qlütamin amin turşularınının qalıqlarından ibarətdir.

Şərti olaraq sayca 20 amin turşusu - standart amin turşuları adlanır. Başqa terminlə, onlara proteinogen amin turşuları da deyilir. Zülalların biosintezi prosesində həmin amin turşularını kodlaşdıran DNT tripletləri mövcuddur. Bəzi zülal tiplərində 20 amin turşusunun törəməsi olan qeyri-standard - məsələn 4-hidroksiprolin, 5-hidroksilizin, N-metillizin, γ -karboksiqlütamin turşusu kimi amin turşuları da mövcuddur. Bunlardan əlavə təbiətdə bəzi məlumatlara görə sayı artıq 400-ü keçmiş qeyri-proteinogen törəmə xarakteri daşıyan, tripletli olmayan amin turşusu müşahidə edilmişdir ki, onlar zülalların tərkibinə daxil olmurlar.

Zülalların tərkibinə daxil olan amin turşuları, bir-biri ilə



(peptid) əlaqəsi ilə birləşirlər. Zülal molekullarının quruluş

səviyyəsindən asılı olaraq polipeptid zəncirləri digər - -S-S- (disulfid) hidrogen, efir, spirt və s. tipli əlaqələr vasitəsilə də birləşir. Zülalı təşkil edən amin turşularının keyfiyyət və kəmiyyət tərkibi, onların tərkibinə daxil olan yan radikallar, prostetik qruplara məxsus digər kimyəvi qruplar, zülal qlobulası səthinin yüklənmə, və nativlik dərəcələri və digər fiziki-kimyəvi amillərdən asılı olaraq istifadə olunan kimyəvi maddələrlə müxtəlif rənglər əmələ gəlir. Həmin rənglərə, əmələ gələn kompleks maddələrə, çöküntü alındığı halda onun xarakterinə əsasən, təcrübədə işlədilən zülal haqda, onun qrupları haqda müvafiq nəticə çıxarmaq mümkündür. Keyfiyyət analizinin mahiyyəti də elə deyilənlərdən ibarətdir.

Amin turşuları - karbon zəncirlərində hidrogen atomlarından birinin amin qrupu ilə (-NH_2) əvəz olunmuş karbon turşularının törəmələridir. Təbii amin turşularının əksəriyyətində amin qrupu karboksilə (-COOH) nisbətən α - vəziyyətdədir. Amin turşularının tərkibinə imin (-NH), 2 amin, imidazol, quanidin kimi azotu olan qruplar, sulfhidril (-SH) və kükürd də daxil olur (1-ci cədvələ bax).

Canlı orqanizmlərdə müşahidə edilən, öyrənilmiş 200-ə yaxın, zülalların tərkibinə daxil olmayan, lakin maddələr mübadiləsində mühüm rol oynayan amin turşuları - tripletləri olmayan qeyri proteinogen turşularla yanaşı öyrənilməkdə olan digər turşular da məlumdur.

Proteinogen amin turşuları amin və karboksil olaraq, iki funksional qrupa malikdirlər. Bir və iki əsaslı mono, diamin və s. qrupların sayına əsaslanan təsnifat

növünün ədəbiyyatlarda ən çox rast gəldiyini nəzərə alaraq, biz aşağıda amin turşularının radikallara əsasən təsnifatını veririk. Bundan başqa amin turşularının ümumi olan bir cəhəti - amin və karboksil qruplarının eyni karbon atomu ilə birləşdiyini; yan zəncirlərin quruluşu, elektrik yükü və həll olma dərəcəsinin isə müxtəlifliyini nəzərə almaqla həmin təsnifatı veririk. Amin turşularının quruluşu ionlaşmış şəkildə göstərilmişdir.

Maddələr mübadiləsində mühüm rol oynayan, lakin zülalın tərkibinə daxil olmayan amin turşularından koferment A-nın, karnozinin və anserinin bir hissəsini təşkil edən, həm də sərbəst rast gələn β -alanin (β -aminopropion t); sidik cövhəri, alkaloidlər, antibiotik qramisidinin biosintezində iştirak edən L-ornitin, (α,δ -diaminovalerian t); sidik cövhərinin biosintezi zamanı əmələ gələn aralıq məhsul kimi məlum olan, həmçinin sərbəst rast gələn, qarpız şirəsinin amin turşusu L-sitrullin (α -amino- δ -karbamidovalerian t); bitkilərdə, meməliyələrin sinir toxumasında, bəzi suda - quruda yaşayan heyvanlarda, quşlarda tapılmış γ -aminoyağ turşusu

Cədvəl 1

Proteinogen amin turşuları

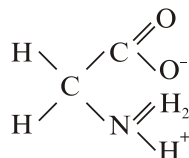
No	Bir hərifli latınca işarə	Üç hərifli latınca işarə	Trivial və kimyəvi adları	Quruluşu
1	2	3	4	5
Qeyri-polyar (hidrofob) radikallı (R)				
1	A	Ala	Alanin, α -amino-propion turşusu (t)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \rightarrow \text{R}$
2	V	Val	Valin, α -amino-izovalerian t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
3	L	Leu	Leysin, α -aminoizokapron t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$

4	I	Ile	İzoleysin, α -amino- β -etil- β -metil-propion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
5	P	Pro	Prolin, pirrolidin- α -karbon t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$
6	M	Met	Metionin, α -amino- γ -metiltioyağ t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
7	F	Phe	Fenilalanin, α -amino- β -fenil-propion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
8	W	Trp	Triptofan, α -amino - β -indolilpropion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{NH} \end{array}$
Mənfi yüklü polyar R				
9	D	Asp	Asparagin turşusu, α -aminokəhrəba t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
10	E	Glu	Qlutamin turşusu, α -aminoqlutar t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
Yüklənməmiş polyar R				

11	G	Gly	Qlisin, (-qlisin) - α -aminosirkə t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
12	S	Ser	Serin, α -amino- β -oksipropion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OH} \end{array}$
13	T	Thr	Treonin, α -amino- β -oksiyağ t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
14	S	Cys	Sistein, α -amino- β -merkaptopropion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
15	Y	Tyr	Tirozin, α -amino- β -hidroksifenilpropion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
16	N	Asn	Asparagin, α -amino-kəhrəba turşusunun monoamidi	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} = \text{O} \end{array}$
17	Q	Gln	Qlutamin, α -amino-qlutar turşusunun monoamidi	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} = \text{O} \end{array}$
Müsbət yüklənmiş polyar R				

18	K	Lys	Lizin, α, ε - diaminokapron t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
19	R	Arg	Arginin, α -amino- δ -guanidil - β -valerian t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
20	H	His	Histidin, α -amino- β -imidazolpropion t.	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{NH} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH} - \text{NH}^+ \end{array}$

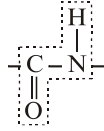
və digər amin turşuları da təsvir edəcəyimiz keyfiyyət reaksiyalarında müşahidə edilə bilərlər. Amin turşularında iki funksional qrup - karboksil ($-\text{COOH}$) və amin qrupunun ($-\text{NH}_2$) mövcud olması, onların kimyəvi xassələrini müəyyən edir. Su məhlullarında karboksil qrupunun protonu amin qrupuna keçir və amin turşusu qlisin misalında aşağıdakı şəkildə yazıla bilər:



Orqanizmdə həll olmuş halda olan amin turşuları daxilən elə şəkildə ionlaşmışlar ki, eyni molekulda həm amin, həm də karboksil qrupu ionları mövcud olur və molekul bu halda elektroneytraldır. Laboratoriya işlərini yerinə yetirərkən nəzərdə tutmaq lazımdır ki, turşu mühitdə amin turşusu özünü qələvi, qələvi mühitdə isə əksinə, turşu kimi aparır. Çünki birinci halda karboksil qrupunun dissosiasiyası baş verə bilmir və molekul kationa çevrilir. Başqa sözlə müsbət yüklənir. İkinci halda amin qrupu dissosiasiyaya edə bilmir, anion əmələ gəlir və amin turşusu mənfi yüklənir.

Beləliklə, kimyəvi nöqteyi nəzərdən amin turşuları amfoter elektrolitlərdir.

Amin turşularının zülal molekulunda bir-biri ilə birləşməsi nəticəsində əmələ



gələn peptid əlaqələrinin xüsusi xarakter daşdığını hələ 1888-ci ildə A.Y.Danilevski qeyd etmişdi. Belə ki, C və N-u birləşdirən kimyəvi əlaqə adi əlaqələrdən fərqli olaraq özünü ikiqat rabitə kimi aparır və qismən qısdır. Onu müşahidə etmək üçün tətbiq olunan biuret reaksiyası aşağıda təsvir olunacaq. Qismən az sayda amin turşuları qalıqlarından təşkil olunmuş peptidlər adlanan polimerləri, daha uzun polipeptidləri və müvafiq konformasiyaya malik sadə və mürəkkəb zülalları müşahidə etmək üçün çoxsaylı keyfiyyət reaksiyaları mövcuddur ki, dediyimiz kimi onların tətbiqi nəticəsində müşahidə olunan molekul haqqında müəyyən məlumat əldə etmək mümkündür. Nəzərdə tutmaq lazımdır ki, istər sadə peptidlər, istərsə də protein və proteidlər mövcud olduqları mühitdən asılı olaraq (məsələn, mühitin pH-ı) mənfə və ya müsbət yüklənə bilirlər. Zülalların müxtəlif dərəcədə həll olması, hidratasiya dərəcəsinin dəyişməsi, ona təsir göstərən başqa amillər keyfiyyət reaksiyalarının xarakteri, əmələ gələn rənglərin intensivliyi və s. üçün mühüm şərtlərdir.

Beləliklə, aşağıda təsvir edəcəyimiz hər bir iş, amin turşuları və zülallar haqda müəyyən məlumat əldə etmək üçün bu və ya digər dərəcədə əhəmiyyətlidir.

RƏNGLİ REAKSIYALAR

Amin turşuları və zülalların ümumi kimyəvi xassələri təkçə funksional qruplardan yox, müvafiq reaksiyaya daxil ola bilən radikallardan da asılıdır. Elə ona görə, radikalın xarakterinə görə də məhluldakı amin turşusu haqda məlumat əldə etmək mümkündür. Əvvəlcə funksional qruplardan biri α -amin qrupunun müşahidə edilməsinə baxaq.

İŞ 1

α - AMIN QRUPUNUN AŞKAR EDİLMƏSİ

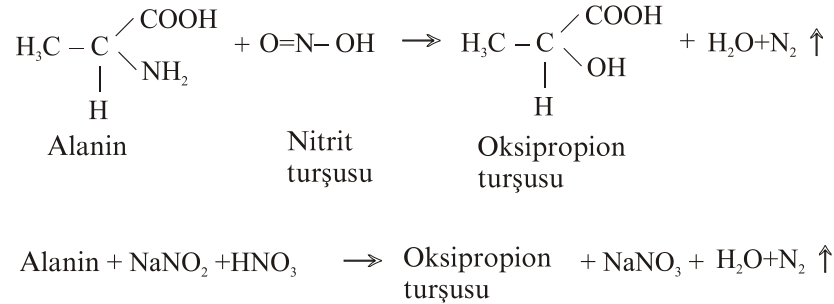
Reaktivlər:

1. 1%-li alanin və ya suda asan həll olan digər amin turşusu - 1 q amin turşusu 99 ml distillə suyunda həll edilir
2. Qatı nitrat turşusu (HNO_3)
3. 3%-li Natrium nitrit (NaNO_2) - məhlul davamsız olduğundan iş günü 3 q duz, 97 ml su hesabından hazırlanır

İşin gedişi

2 sınaq şüşəsindən birinə 3-4 ml amin turşusu məhlulu, digərinə eyni miqdarda distillə suyu tökülür. Sonra hər iki sınaq şüşəsinə 1 ml qatı nitrat turşusu əlavə edilir. Amin turşusu olan sınaq şüşəsində intensiv şəkildə qabarcıqlar əmələ gələrək ayrılırlar. Bu təcrübədə α -vəziyyətdəki amin qrupu bilavasitə təcrübə zamanı əmələ gələn nitrit turşusu ilə reaksiyaya daxil olur. Təmiz nitrit turşusu təcrübədə ona görə

istifadə olunmur ki, o sərbəst halda davamsızdır. Güclü turşu (bizim halda qatı nitrat turşusu) və nitrit turşusunun natrium duzu qarışığında nitrit turşusu əmələ gəlir və amin turşusu ilə reaksiyaya daxil olur.



Beləliklə nitrit turşusunun parçalanması zamanı ayrılan azot qazı mühidə α-amin qrupunun olduğunu göstərir.

İŞ 2

FORMOLTITRLƏMƏ

Amin turşusunun tərkibinə daxil olan digər funksional qrup - karboksilin mövcud olduğunu bu reaksiya vasitəsilə müəyyən etmək olar.

Reaktivlər:

1. 5%-li alanin və ya qlisin məhlulu
2. Fenolftaleinin etanolda 0,5%-li məhlulu (100 mq fenolftalein 20 ml spirtdə həll edilir)
3. 0,4%-li NaOH (400 mq NaOH 99,6 ml distillə suyunda həll edilir)
4. Formol qarışığı (əlavələr bölməsi 1)

İşin gedişi

Mikrokimyəvi sınaq şüşəsinə 5 damla amin turşusu məhlulu götürüb üzərinə 1 damla fenolftalein və zəif çəhrayı rəng alınana qədər NaOH əlavə edirik (adətən 1-2 damla kifayət edir). Sonra sınaq şüşəsinə 5 damla formol qarışığı töküüb qarışdırırıq. Bu zaman formaldehid amin qrupunu özünə birləşdirir və məhlulun reaksiyası turşuluğa doğru dəyişir və nəticədə fenolftalein rəngini itirir.

3. 5%-li mis-2-sulfat (CuSO_4). Göy rəngli hiqroskopik CuSO_4 tərkibinə 5 su molekulu daxil olduğunu nəzərə alsaq CuSO_4 -ü - çini qabda qızdırmaqla onu ağ kristala çevirmək və 5 q quru CuSO_4 - 95 mq suda həll etməklə dəqiq 5%-li məhlul almaq olar.

4. Ninhidrinin etanolda 0,2%-li məhlulu (200 ml kristallik ninhidrin 125 ml 96%-li etanolda həll edilir).

İşin gedişi

a) Sınaq şüşəsində götürülmüş 3 damla mis-sulfat üzərinə həmin miqdarda 5%-li qlisin tökdükdə göy rəngli xelat əmələ gəlir. Mis sulfat məhlulu da göy olduğundan digər sınaq şüşəsinə 3 damla su və 3 damla mis-sulfat töküb birinci sınaq şüşəsindəki rənglə müqayisə etmək olar.

b) Sınaq şüşəsinə 2 damla 0,1%-li qlisin, 2 damla mis sulfat töküb onu çalxaladıqdan sonra, üzərinə 2 damla ninhidrin məhlulu əlavə edib qızdırdıqda xelatın göy rəngi alınır.

c) Ayrıca götürülmüş 2 damla 0,1%-li qlisin məhluluna yalnız 2 damla ninhidrin əlavə edib qızdırdıqda intensiv göy rəng alınır (bax iş 4).

İŞ 4

NINHIDRİNLƏ REAKSIYA

Bu reaksiya vasitəsilə α -amin turşularını müşahidə etmək olar. Bu reaksiya α -amin turşuları və zülal üçün daha seçicidir. Amin turşuları və zülallar ninhidrinlə göy və ya bənövşəyi məhsullar əmələ gətirirlər. Karbohidrogen radikallarının xarakterindən asılı olaraq çəhrayı, mavi, sarı, göy-bənövşəyi rənglər də əmələ gələ bilər. Turşuların bəzi amin və amidləri də bu reaksiyanı verə bilər. Ona görə reaksiya spesifik deyil.

Reaktivlər:

1. Ninhidrinin 0,2%-li spirtli məhlulu (iş 3-ə bax)

2. Ninhidrinin asetonda 0,1%-li məhlulu - 100 mq kristallik ninhidrin 127 ml asetonda həll edilir

3. 1%-li yumurta zülalı (əlavələr bölməsi, 2)

4. 1%-li bitki zülalı (əlavələr bölməsi, 3)

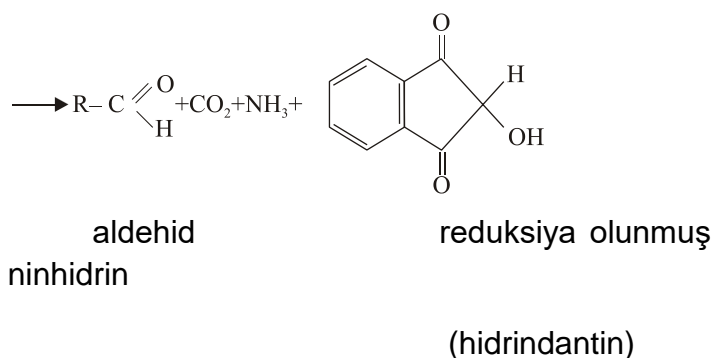
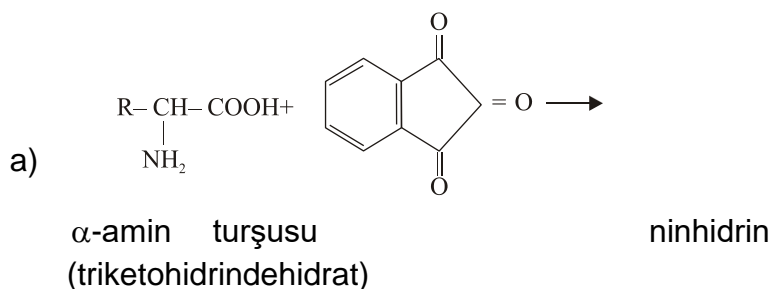
5. 0,1%-li amin turşuları məhlulları - 100 mq amin turşusu 100 ml distillə suyunda həll edilir

İşin gedişi

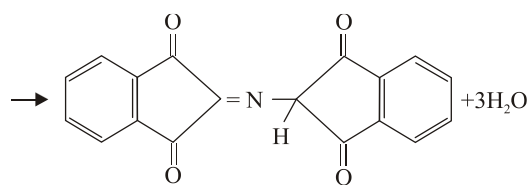
Yumurta, bitki zülalı və amin turşuları məhlullarının sayı qədər sınaq şüşəsinin hər birinə 4 ml müvafiq məhlul götürüb zülal məhlulları olan iki sınaq şüşəsinin hər birinə 1 ml, amin turşuları olan sınaq şüşələrinə isə 0,5 ml ninhidrinin spirtli məhlulunu əlavə edirik. Sınaq şüşələri qaynayan su hamamına və ya termostata (115°C) yerləşdirilir. 10

dəqiqədən sonra sınaq şüşələrini soyudub əmələ gələn rəngləri müqayisə etməli. Eyni təcrübəni bu dəfə ninhidrinin asetonda məhlulu ilə təkrar etməli.

Təcrübə zamanı aşağıdakı proseslər gedir.



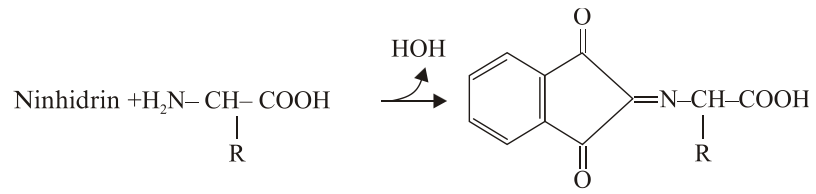
b) Reduksiya olunmuş ninhidrin oksidləşmiş ninhidrin və amonyakla kondensə reaksiyasına daxil olaraq bənövşəyi-göy və ya Rueman fır-fırı əmələ gətirir. Bu rəng bənövşəyi-göy mureksid tipli birləşmə də adlanır.



Rueman -göy-bənövşəyisi

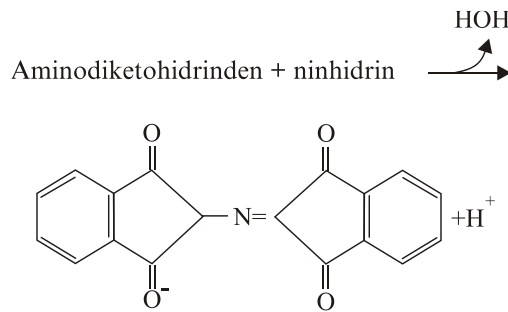
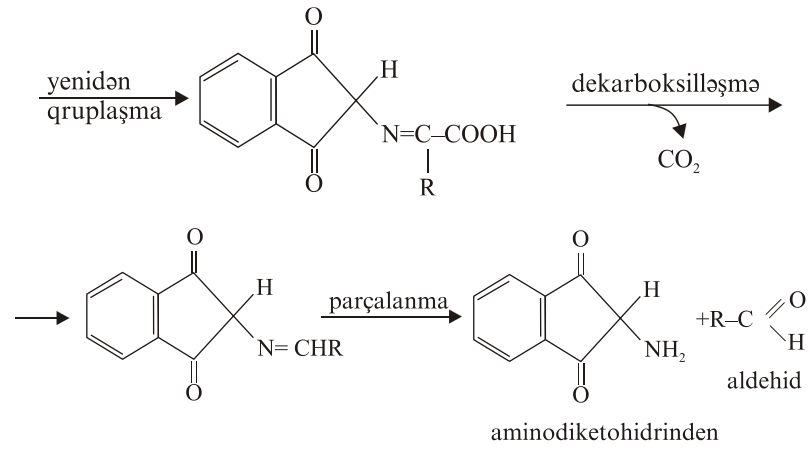
Tədqiq olunan məhlulda α -amin qrupunun qatılığı əmələ gələn rəngin intensivliyi ilə düz mütənasibdir.

Əslində proses aralıq məhsulların əmələ gəlməsilə gedir.



α - amin turşusu

Şiffov əsası



Rueman - göy-bənövşəyisi

İŞ 5

BIURET REAKSIYASI

Bu reaksiya onu ilk dəfə təklif edən Piotrovskinin də adını daşıyır. Reaksiya peptid əlaqələrini müşahidə etmək üçündür, həssasdır, lakin spesifik deyil. Çünki amin turşuları və zülalla əlaqəsi olmayan lakin tərkibinə peptid əlaqəsi

daxil olan qeyri üzvi birləşmə - Biuret $(\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}_2\text{H})$,

oksami $(\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}-\text{N}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\diagup \diagdown}})$ də bu reaksiyanı verir.

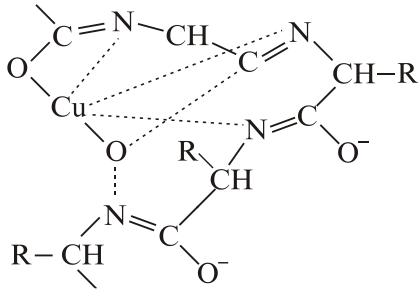
Elə ona görə, bu nümunə Biuret adlandırılmışdır. Təmiz amin turşuları adətən reaksiyanı vermirlər. Histidin, serin, treonin, asparagin istisna təşkil edir. Qələvi mühitdə mis duzlarının iştirakı ilə qızdırma şəraitində aparılan biuret reaksiyasında müvafiq rəng alınması üçün həmin amin turşularının qatı məhlulları tələb olunur. Rəng alınması üçün tədqiq olunan maddədə ən azı iki peptid əlaqəsi olmalıdır.

Adi kimyəvi əlaqədən qismən qısa $(-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}-\text{N}-)$ peptid olan

əlaqəsinin biuretdə sayı iki, oksamidə 3-dür. Məsələ burasındadır ki, peptid əlaqəsi olan birləşmə və polimerlərdə əsas zəncirin $\text{C}_{2\alpha}$ atomları peptid əlaqəsinə nisbətən bir (sis) və ya iki müxtəlif tərəfə (trans) yönələ bilər. Elə buradan da sis və trans izomerlər əmələ gəlir. C-N əlaqəsinin qismən qısa (1,37 nm) olması, tipik trans vəziyyətin 40% özünü ikiqat rabitə kimi aparması¹ həmin əlaqə ətrafında fırlanmanı da çətinləşdirir və həm sis, həm də trans izomerlərin davamlılığını artırır. Bu nöqtəyi-nəzərdən mühitdə peptid əlaqəsinin miqdarı, başqa sözlə peptid zəncirinin uzunluğu və reaksiya mühitindən asılı olaraq rənglərin intensivliyi və rənglərin özü müxtəlif ola bilər (cəhrayı, bənövşəyi, qırmızı-bənövşəyi). Yuxarıda göstərilən şəraitdə (qələvi mühit, temperatur, mis ionları) aparılan təcrübədə mühitə rəng verən peptid və zülalların peptid əlaqəsi və mis ionlarının iştirakı ilə əmələ gələn mis-natrium kompleks birləşmələrdir (iş 3-ə bax).

Mislə kompleks
əmələ gətirmiş
polipeptid zəncirinin
fraqmenti

¹ 1 və ikiqat əlaqənin yaşama müddətinin nisbəti (6:4) peptid əlaqəsinin 60% 1 qat, 40% ikiqat olması deməkdir



Əslində bu fraqment liqand quruluşdur və 2 sayılı işdə gördüyümüz mis xelatını xatırladır. Kompleksin əmələ gəlməsində peptid rabitələri olan maddə, mis sulfat və natrium qələvisi iştirak edir.

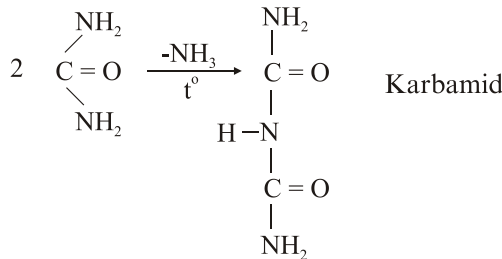
Reaktivlər:

1. 1%-li mis-2-sulfat (CuSO_4) - CuSO_4 -un tərkibində 5 molekul su olduğunu nəzərə alsaq 1%-li məhlulu dəqiq hazırlamaq üçün 1,56 qr. göy rəngli $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tərəzidə çəkib, onu çini qabda qaz üzərində qızdırmaqla qurudub, ondan 1 q çəkib 99 ml distillə suyunda həll etmək lazımdır.

2. 10%-li NaOH - 10 q qələvi 90 ml suda həll edilir
3. 1%-li qlisin
4. 1%-li yumurta zülalı (əlavələr 2)
5. 1%-li bitki zülalı (əlavələr 3)
6. Kristallik sidik cövhəri $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ - karbamid

İşin gedişi

Çini qaba və ya oda davamlı sınaq şüşəsinə 0,5-1 q kristallik sidik cövhəri götürüb onu alovla qızdırmaqla əritmək və bərkliyənə qədər gözləmək lazımdır. Bu zaman 2 molekul karbamid-biuret əmələ gətirir



Əriyib bərkimiş karbamid kristalını soyudub onu tam həll etməli. Distillə suyunun miqdarı təxminən 10-15 ml olacaq.

Sonra 4 ədəd sınaq şüşəsinə ardıcıl olaraq eyni miqdarda (3-4 ml) qlisin, yumurta zülalı, bitki zülalı və biuret məhlullarını tökdükdən sonra, şüşələrə 3 ml 10%-li natrium

hidroksid və 1 ml mis-sulfat məhlullarını əlavə etdikdə əmələ gələn rəngləri müqayisə etməli və dəftərdə qeyd etməli. Birinci sınaq şüşəsində (qlisin) rəng əmələ gəlmir.

AYRI-AYRI AMIN TURŞULARI VƏ ONLARIN DAXIL

OLDUĞU ZÜLALLAR ÜÇÜN SƏCİYYƏVI KEYFİYYƏT REAKSIYALARI

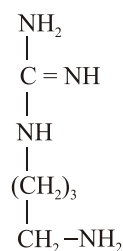
İstər sərbəst, istərsə də zülalın tərkibinə daxil olduqda bəzi spesifik xassələrə malik olan bir qrup amin turşuları həmin xassələrə əsasən müşahidə edilə bilər. Bu reaksiyaların bir qisminə rəngli məhsullar alınır, digərləri müvafiq amin turşusuna qarşı yüksək dərəcədə həssasdırlar. Bu xassələrə əsasən bir qrup amin turşusunun cüzi miqdarını belə həm sərbəst halda, həm də mürəkkəb maddələrin tərkibində müşahidə etmək mümkün olur.

İŞ 6

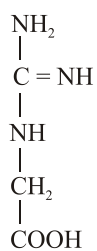
ARGININ ÜÇÜN SAKAQUÇI REAKSIYASI

Tərkibində quanidin qrupu olan birləşmələr qələvi, hipobromat və α -naftolun iştirakı ilə qırmızı rəngə boyanır. Argininin tərkibində quanidin qrupu olduğundan həmin amin turşusu üçün reaksiya spesifik ola bilər. Aqmatin, metil-quanidin, quanidinsirkə turşusu (qlikosiamin) kimi quanidin qruplu maddələr Sakaquçi reaksiyasını versə də zülalın tərkibində bu birləşmələr yoxdur.

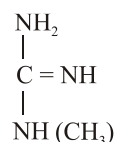
Reaksiya zamanı qırmızı rəngin əmələ gəlməsi oksidləşmiş argininlə α -naftolun kondensə məhsulunun törəməsi ilə əlaqədardır. Hipobromat burada oksidləşdirici rolunu oynayır.



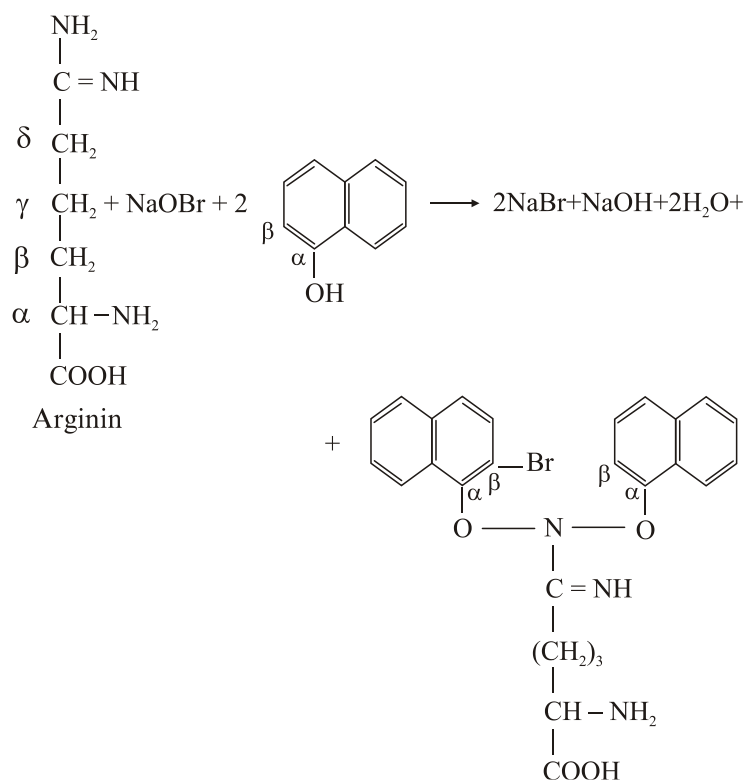
Aqmatin



Qlikosiamin



Metil quanidin



oksidləşmiş argininin α -naftolla kondensə məhsulu

Reaktivlər:

1. 10%-li NaOH məhlulu
2. α -naftolun 0,1%-li spirtli məhlulu
3. 1%-li zülal
4. 2%-li natrium hipobromid (əlavələr 4)

İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə 5 damla 1%-li yumurta zülalı, 5 damla 10% NaOH və 3 damla α -naftolun 0,1%-li spirtde məhlulunu götürüb üzərinə damla-damla 2%-li natrium hipobromid əlavə etdikdə, məhlul qırmızı rəngə boyanır. Məhlulda ammonyak və həddən çox hipobromid olduqda yaxşı nəticə alınmır.

İŞ 7

TƏRKİBINƏ KÜKÜRD (S) DAXİL OLAN AMİN

TURŞULARININ MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

Zülalların əksəriyyətinin tərkibində kükürlü amin turşularına (sistein, iki sisteinin əmələ gətirdiyi sistin və metionin) rast gəlinir. Xüsusilə birinci iki amin turşusu uzun müddət qələvi mühitdə qaynadıldıqda kükürd (S) atomunu hidrogen sulfid (H₂S) şəklində itirir. Bu maddə isə öz növbəsində qələvi ilə reaksiyaya girərək müşahidə edilə bilən sulfidləri əmələ gətirir. Sulfidləri müşahidə etmək üçün Fol, Makkarti və Sallivan reaksiyaları tətbiq olunur.

Fol reaksiyası - Kükürdü zəif birləşmiş sistein və sistini müşahidə etmək üçündür.

Reaktivlər:

1. Fol reaktivi (əlavələr 5)
2. 0,1-0,4%-li sistein
3. 1%-li yumurta zülalı
4. 50%-li NaOH
5. 1%-li jelatin (əlavələr 6)
6. 1%-li bitki zülalı (əlavələr 3)

İşin gedişi

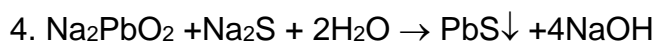
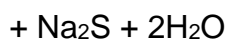
4 ədəd sınaq şüşəsinə sistein, yumurta zülalı, jelatin və bitki zülalı məhlullarından növbə ilə 3-4 ml götürüb hər sınaq şüşəsinə 1,5-2 ml 50%-li qələvi əlavə edib 5 dəqiqə qaynatmaq lazımdır.

Məhlulu soyudub sınaq şüşələrinə 2 ml fol reaktivi əlavə edilir. Bu zaman qəhvəyi və ya qara rəngli çöküntü alınır.

Bu zaman aşağıdakı proses gedir.

1. $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} + 2\text{NaOH} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COONa} + \text{Pb}(\text{OH})_2$
2. $\text{Pb}(\text{OH})_2 + \text{NaOH-in artıq miqdarı} \rightarrow \text{Na}_2\text{PbO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH-in artıq miqdarı}$
3. $\text{HS-CH}_2\text{-CH-COON} + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{HO-CH}_2\text{-CH-COOH} +$





4 sınaq şüşəsindəki çöküntülərin rəng intensivliyi, yoxlanılan məhlullarda kükürdün miqdarından asılıdır. Jelatin olan sınaq şüşəsində nəticənin alınmaması onun bioloji dəyərli zülal olmadığını (bütün 20 amin turşusu, o cümlədən kükürlü turşu burada yoxdur) göstərir.

Makkarti və Sullivan reaksiyaları. Kükürd molekulu möhkəm birləşmiş metionin amin turşusunu müşahidə etmək üçündür.

Reaktivlər:

1. 10%-li natrium nitroprusid
2. Xlorid və fosfat turşularının 9:1 nisbətində qarışığı (əlavələr 7)
3. 0,1%-li metionin

İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə 3 ml metionin məhlulu və 2 ml 10%-li NaOH götürüb qarışdırdıqdan sonra oraya təzə hazırlanmış natrium nitroprusidin 1 ml məhlulunu əlavə edib temperaturu 40°C olan su hamamına yerləşdiririk. 10-15 dəqiqədən sonra sınaq şüşəsinə buzlu suya yerləşdiririk və ya çox soyuduruq. Sınaq şüşəsinə 10-15 ml xlorid və fosfor turşusunun qarışığını əlavə edib ehtiyatla qızdırırıq. Məhlulu şüşə çubuqla qarışdırıb soyuq su altında yenə 10-15 dəqiqə soyutduqda tədricən parlaq qırmızı-bənövşəyi rəng əmələ gəlir.

İŞ 8

QLISININ MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

(Simmerman reaksiyası)

Spesifik reaksiyalar sırasına daxildir. Sərbəst qlisin və tərkibinə qlisin daxil olan qarışıqlar, zülallarda qlisini müşahidə etmək üçündür. Qələvi mühitdə orto-ftal dialdehid qlisinlə parlaq yaşıl rəng əmələ gətirir. Reaksiya pH-ı 8,0 olan mühitdə yaxşı alınır.

Reaktivlər:

1. 0,01-0,1%-li qlisin (10-100 mq amin turşusu 100 ml suda həll edilir)
2. 1%-li yumurta zülalı
3. 1%-li bitki zülalı

4. 10%-li NaOH

5. Orto-ftal dialdehidinin suda məhlulu (~ 0,7%) - 1q orto-ftaldialdehid 150 ml suda həll edilir

6. 1%-li jelatin

İşin gedişi

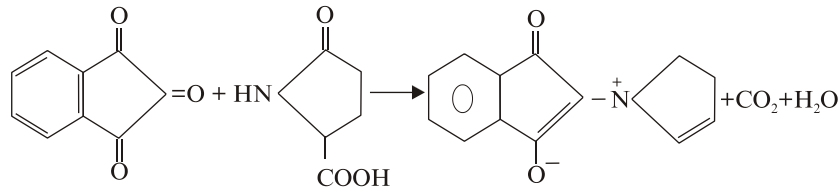
4 ədəd sınaq şüşəsinə növbə ilə qlisin, zülal, bitki zülalı və jelatin məhlullarından müqayisəli nəticə çıxartmaq üçün eyni miqdar (3-4 ml) götürüb hər sınaq şüşəsinə damla-damla qələvi məhlulunu pH-8,0 olana qədər əlavə edirik. Bunun üçün universal indikator kağızın hər sınaq şüşəsində kiçik parçası məhlula batırılmalıdır. Mühit pH-nın 8,0 olması indikator kağızının şkalası ilə müqayisə edilir. Sonra hər sınaq şüşəsinə 0,2 ml o-ftal dialdehidi əlavə edildikdə, müxtəlif intensivlikli yaşıl rəng alınır. Bir qədər sonra yaşıl çöküntü əmələ gəlir.

İŞ 9

PROLININ MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

İki mühüm reagent-ninhidrin və izatin vasitəsilə prolinlə xarakter rənglər əmələ gəldiyindən həmin reagentlər geniş tətbiq olunur.

Ninhidrinlə prolin aşağıdakı şəkildə parlaq-sarı rəngli kondensə məhsulu əmələ gətirir.

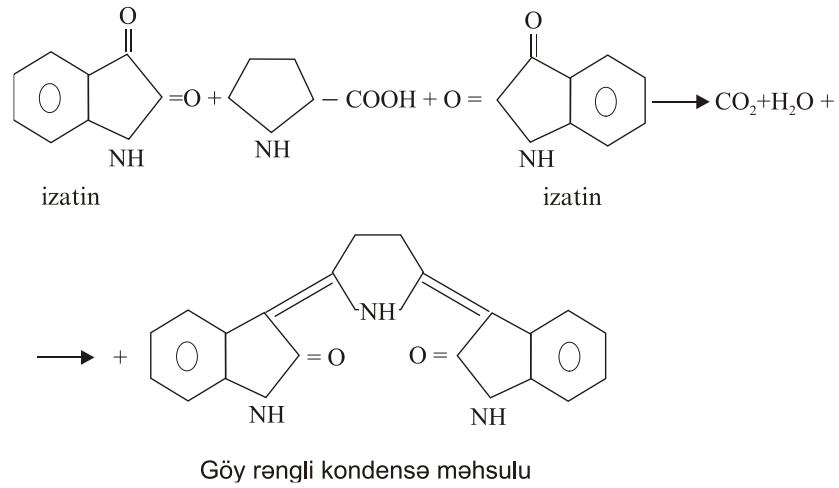


ninhidrin

prolin

sarı kondensə məhsulu

Prolin amin turşusu müvafiq mühitdə izatinlə - digər - göy rəngli kondensə məhsulunun əmələ gəlməsinə səbəb olur. Güman olunduğuna görə proses aşağıdakı şəkildə gedir:



Reaktivlər:

1. 0,1%-li prolin
2. Buzlu sirkə turşusunda 0,1%-li prolin
3. Ninhidrinin asetonda 0,1%-li məhlulu - 100 ml kristallik ninhidrin 127 ml asetonda həll edilir
4. İzatinin 0,3%-li buzlu sirkə turşusunda məhlulu - 300 mq izatin soyuducu şkaf şəraitində 100 ml buzlu sirkə turşusunda həll edilir

İşin gedişi

a) Ninhidrinlə reaksiya

Sınaq şüşəsinə 3 ml prolin və bir neçə damla ninhidrinin asetonda məhlulunu götürüb qarışdırır və temperaturu 60-70°C olan su hamamına 5 dəqiqə müddətinə yerləşdirilir. Tədricən parlaq-sarı rəng aydınlaşır.

b) İzatinlə reaksiya

Sınaq şüşəsinə soyuducu şkaf şəraitində 1-2 ml izatinin buzlu sirkə turşusunda məhlulunu qarışdırdıqda dərhal göy rəng əmələ gəlir.

Digər sınaq şüşəsində prolinin sulu məhlulu ilə təcrübəni aparmalı.

İŞ 10

TRİPTOFANIN MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

Triptofan aldehid qrupu olan bəzi birləşmələrlə müvafiq şəraitdə müxtəlif rənglər əmələ gətirir. Əmələ gələn məhsul bənövşəyi, qırmızı-bənövşəyi rəngdə ola bilər. Aldehid qrupu olan birləşmələrdən qlüksil turşusu, formaldehid, oksimetilfurfurol dan

istifadə etmək olar. Bütün hallarda sərbəst və ya zülal tərkibində olan triptofanı müşahidə etmək üçün aparılan nümunədə qatı sulfat turşusu, digər bir halda xlorid turşusu iştirak edir. Triptofanı aşkar etmək üçün tətbiq olunan reaksiyalar, onları təklif edən müəlliflərin adını daşıyır.

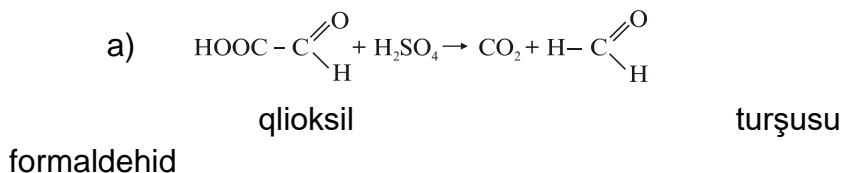
Reaktivlər:

1. 0,1%-li triptofan
2. 1%-li və durulaşdırılmamış yumurta zülalı məhlulları
3. Bitki zülalı məhlulu
4. Qatı sulfat turşusu və ya qatı xlorid turşusu
5. Buzlu sirkə turşusu
6. 1%-li formaldehid (əlavələr 8)
7. 5%-li fruktoza (5q fruktoza 95 ml suda həll edilir)
8. Qlioksil turşusu preparatı (əlavələr 9)
9. 1%-li mis sulfat (iş 3-ə bax)
10. 10%-li saxaroza

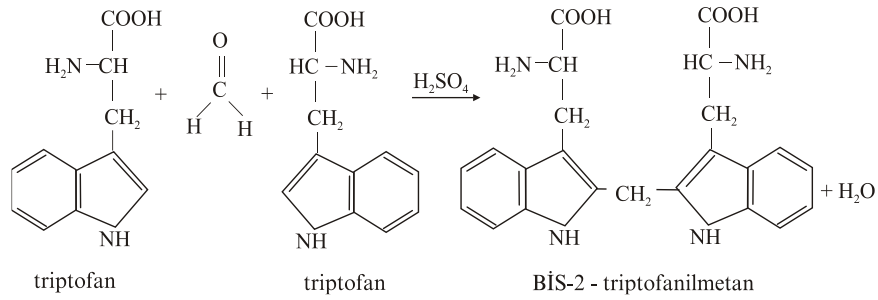
İşin gedişi

A. Adamkeviç reaksiyası

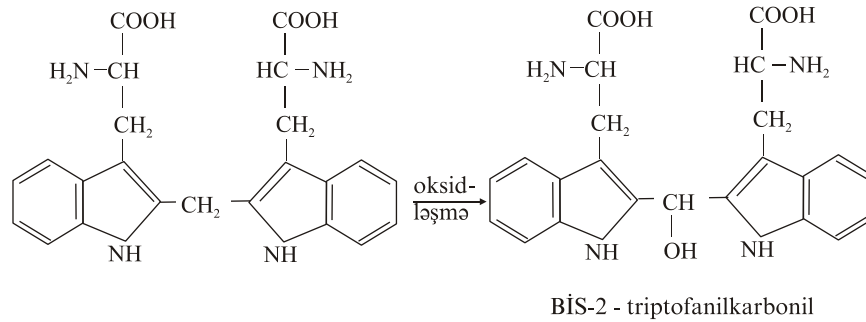
Sınaq şüşəsinə bir neçə damla durulaşdırılmamış yumurta zülalı, 2 ml buzlu sirkə turşusu götürüldükdə çöküntü alınır. Sınaq şüşəsinə azacıq qızdırmaqla çöküntü həll edilir. Sınaq şüşəsi soyudulur. Sonra onu maili vəziyyətdə tutub divarları ilə 1 ml oraya qatı sulfat turşusu tökülür. İki məhlulun sərhəddində tədricən qırmızı-bənövşəyi rəng əmələ gəlir. Bu zaman buzlu, qatı sirkə turşusunun tərkibində olan qlioksil turşusu formaldehidə çevrilir. Proses aşağıdakı şəkildə gedərək bis-2-triptofanilmetanı əmələ gətirir.



Formaldehid öz növbəsində iki molekul triptofanla reaksiyaya daxil olur.



Kondensə məhsulu bis-2-triptofanilkarbonilə qədər oksidləşir.



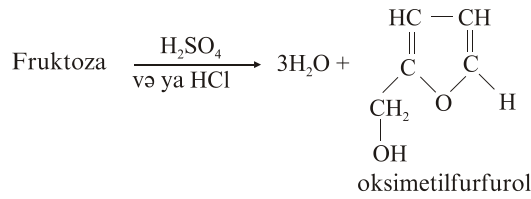
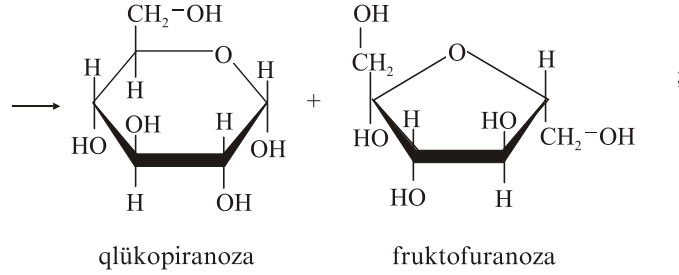
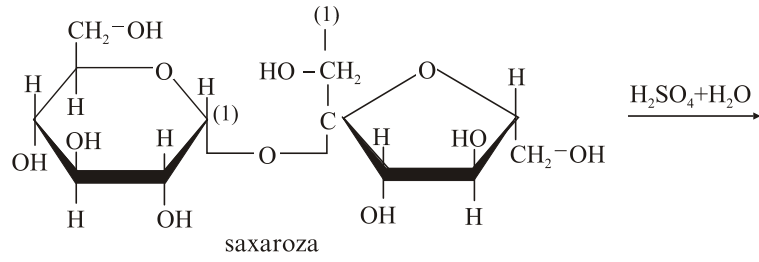
B. Hopkins-Kole reaksiyası.

Bu dəfə zülal əvəzinə sınaq şüşəsinə 1 ml 0,1%-triptofan, eyni miqdarda qlüksil turşusu preparatı və 10 damla 1%-li mis sulfat götürüb, sınaq şüşəsinə 2-3 ml az paylarla (bir neçə damla) şüşənin divarı ilə qatı sulfat turşusu əlavə edilir. Şüşə qızır. Onu hər paydan sonra axan su vasitəsilə soyutmaq lazımdır.

Nəhayət sınaq şüşəsinə 5 dəqiqə qaynayan su hamamına yerləşdirəndə göy-bənövşəyi rəng əmələ gəlir. Bu təcrübədə də yuxarıdakı reaksiyalar gedir. Sulfat turşusu mühitində əslində haloxromin hadisəsi baş verir, yəni mavi-bənövşəyi rəng bis-2-triptofanilkarbonil duzunun rəngidir.

C. Şuls-Raspayl reaksiyası.

Burada buzlu sirkə turşusu əvəzinə (və ya qlüksil turşusu preparatı əvəzinə (ondan formaldehid əmələ gəlir) digər bir aldehiddən - oksimetilfurfuoldan istifadə etmək olar. Bu aldehidi almaq üçün isə fruktoza və ya saxarozadan istifadə edilir. Saxarozaya sulfat turşusu təsirindən hidroliz olunub fruktoza və qlükozaya, fruktoza isə 3 molekul su itirərək oksimetil furfurola çevrilir.



Əmələ gələn aldehid (oksimetilfurfurol) triptofanla qırmızı-bənövşəyi kompleks əmələ gətirir.

İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə bir neçə damla zülal məhlulu və 2 ml 10%-li saxaroza və ya 5%-li fruktoza götürüb şüşənin divarları ilə şüşəyə 1 ml qatı sulfat turşusunu və ya xlorid turşusunu ehtiyatla əlavə edib tədricən əmələ gələn rəngi müşahidə etmək olar. Digər sınaq şüşəsində zülal əvəzinə triptofan məhlulunu götürmək olar.

A, B, C reaksiyalarını bitki zülalı ilə də aparmalı. Həmin reaksiyaları jelatinlə aparsaq nəticə alınmır.

İŞ 11

VUAZENE REAKSIYASI

Tərkibində triptofan olan zülallarda həmin amin turşusunu müşahidə etmək üçün tətbiq olunur. Bu reaksiyanın mexanizmi Hopkins-Kole və ya Adamkeviç reaksiyasında olduğu kimidir. Hər iki reaksiyada triptofan formaldehidlə reaksiyaya daxil olur.

Reaktivlər:

1. 2,5%-li formaldehid (əlavələr 8 - nisbət 2,5 hissə formalin 37,5 hissə su olmalıdır)
2. Qatı xlorid turşusu (HCl)

3. 1%-li yumurta zülalı
4. 0,5%-li natrium nitrit (NaNO_2)

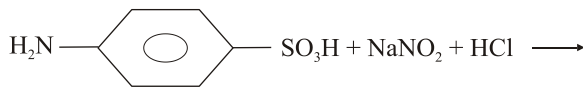
İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə 2 ml zülal məhlulu və 1 damla formaldehid götürüb qarışdırır və oraya 6 ml qatı xlorid turşusu tökülür. Sınaq şüşəsinə yenə qarışdırır 10 dəqiqə gözləyirik. Sonra sınaq şüşəsinə qarışdırma-qarışdırma oraya 10 damla natrium nitrit məhlulu tökdükdə tədricən intensiv göy-bənövşəyi rəng əmələ gəlir.

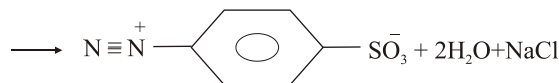
İŞ 12

PAULI REAKSIYASI

Bu reaksiya diazoreaksiya adı ilə də məlumdur. Reaksiyanın mahiyyəti tirozin və xüsusən histidin amin turşuları qalıqlarında onların radikallarının diazobenzolsulfon turşusu ilə rəngli birləşmələr əmələ gətirməsidir. Birləşmələrin xarakterindən asılı olaraq rənglər sarı, narıncı, qırmızı-albalı ola bilər. Diazoreaksiya dedikdə histidinin əsas reaktiv olan sulfanil turşusunun hidrogen xloridli məhlulu və natrium nitrit qarışığı ilə (diazoreaktiv) rəng əmələ gətirməsidir (bax əlavələr 10). Prosesdə tirozin də iştirak edə bilər. Müvafiq şəraitdə Pauli reaksiyası vasitəsilə triptofanı və bəzi fenolları da aşkar etmək olar. Adi şəraitdə Pauli reaksiyası histidin üçün spesifik deyil. Lakin Kassel və Kuçer diazoreaksiyasını istifadə etməklə, xüsusi şərait yaradaraq onu miqdarı analiz üçün tətbiq etmişlər. Bunun üçün tədqiq olunan məhlul və ya hidrolizatda fosforvolfram turşusu vasitəsilə miqdarca arginin, histidin, lizin və az miqdarda sistin çökdürülür. Qalan amin turşuları məhlulda qalır. Çöküntü yuyulur. Histidin və onu müşayiət edən amin turşuları məhlula keçirilir. Kolorimetrik üsulla Pauli reaksiyasına əsasən məhlulda histidin miqdarca təyin olunur. Reaksiyanı apararkən əvvəlcə natrium nitrit vasitəsilə sulfanil turşusunun hidrogen xloridli məhlulunda diazotlaşma prosesi gedir.

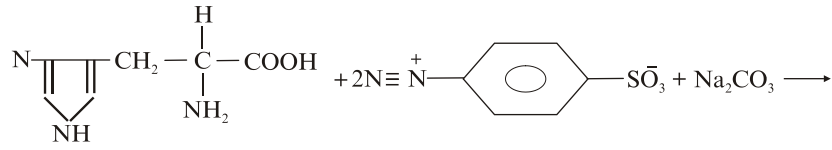


sulfanil turşusu



diazobenzolsulfon turşusu

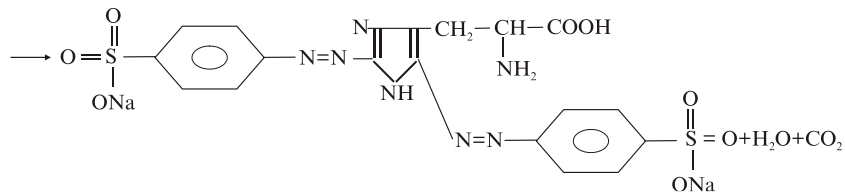
Sonra diazobenzolsulfon turşusu histidinlə qələvi mühitdə rəngli birləşmə əmələ gətirir.



histidin

diazobenzolsulfon turşusu

(n - sulfobenzoldiazoniy)



2,5-di-parasulfobenzol-azohistidin

(qırmızı-albalı rəngdə)

Reaktivlər:

1. 0,1%-li histidin
2. 0,1%-li tirozin
3. 1%-li yumurta zülalı
4. 1%-li bitki zülalı (əlavələr 3)
5. 10%-li natrium karbonat (Na_2CO_3)
6. Diazoreaktiv (əlavələr 10)

İşin gedişi

4 ədəd sınaq şüşəsinin birinə 1 ml histidin, digərinə tirozin, üçüncüyə və dördüncüyə zülal məhlullarını götürüb hər birinə 4 ml təzə diazoreaktiv əlavə edərək qarışdırmalı, sınaq şüşələrinə 2 ml natrium karbonat tökdükdən sonra əmələ gələn rəngləri müşahidə etməli.

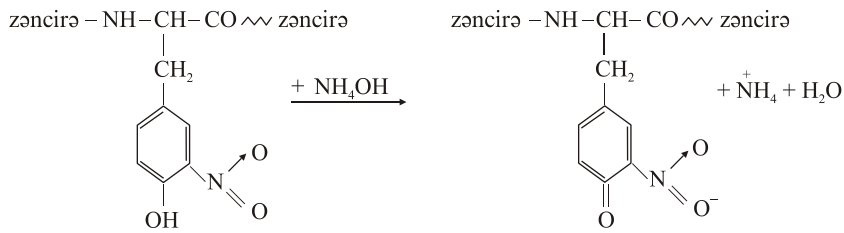
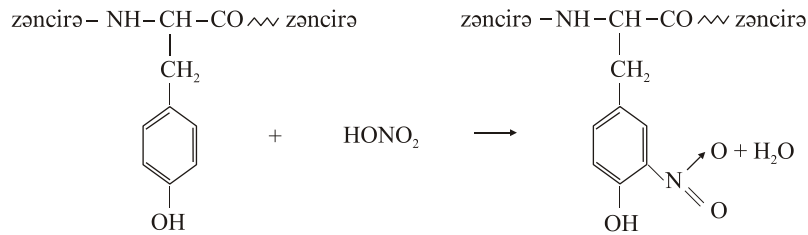
İŞ 13

KSANTOPROTEIN REAKSIYASI

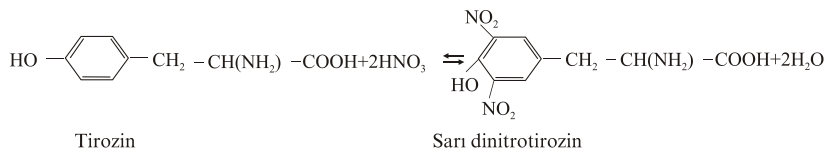
Ayrıca götürülmüş amin turşusunu aşkar etmək üçün tətbiq olunan təsvir etdiyimiz laboratoriya işlərindən fərqli olaraq, bu reaksiya ümumi olan bir xassəyə əsasən bir qrup maddəni aşkar etməyə imkan verir. Ksantoprotein məfumu yunanca *xanthos* -sarı sözündən törənir. Reaksiya tərkibinə aromatik nüvə daxil olan tsiklik amin turşularını aşkar etmək üçün tətbiq olunur. Aromatik nüvə asanlıqla nitrobirləşmə (nitrolaşma) əmələ gətirir. Əmələ gələn nitrotөрəmələr adətən sarı rəngli olurlar. Nitrotөрəmələr olan mühiti qələviləşdirdikdə narıncı rəngli duzlar əmələ gəlir. Bunun səbəbi xromofor qrupunun əmələ gəlməsidir. Reaksiya tərkibinə fenilalanin, tirozin və triptofan daxil olan zülallarla da müsbət nəticə verir.

Nümunəni jelatinlə apardıqda nəticə alınmır. Çünki bu zülalın tərkibində həmin amin turşuları yoxdur. Jelatin elə buna görə də qida nöqtəyi nəzərindən dəyərli zülal hesab olunmur. Ksantoprotein reaksiyasının mexanizmini tirozin radikalı üzrə zülalda necə getdiyinə baxaq. (Qələvi ammonium hidrogenoksid götürdükdə):

I Nitrolaşma

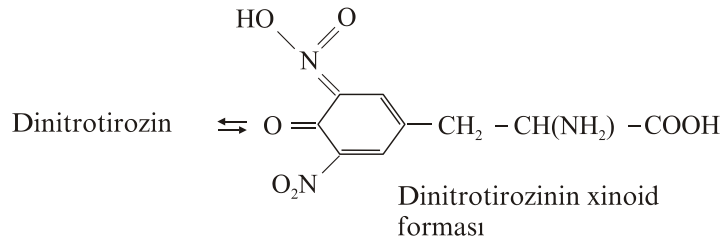


Ayrıca tirozin götürdükdə

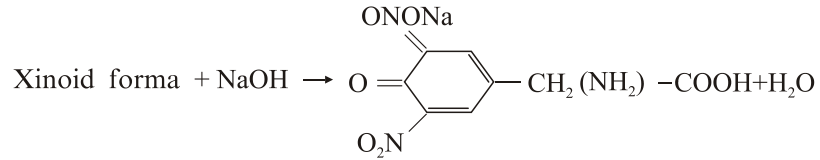


II Duzun əmələ gəlməsi

Dinitrotirozin xinoid formaya keçir



Bu dəfə qələvi (NaOH) mühitdə rəaksiyanı apardıqda:



narıncı rəngli

natriumdinitrotirozin duzu

Reaktivlər:

1. 0,1%-li tirozin
2. 0,1%li triptofan
3. 1%-li yumurta zülalı
4. 1%-li fenol (C₆H₅OH)
5. Qatı nitrat turşusu
6. 10%-li NaOH

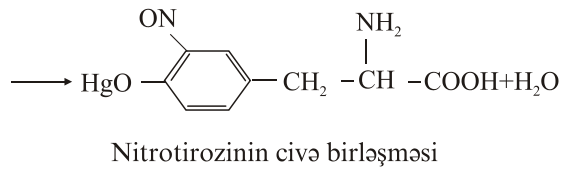
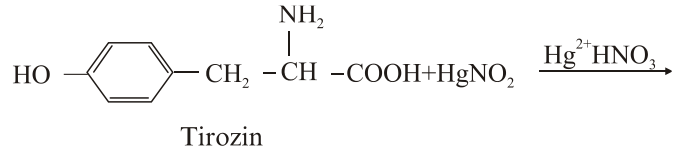
İşin gedişi

Dörd ədəd sınaq şüşəsinin birinə 4 ml tirozin, digərlərinə eyni miqdarda triptofan, zülal və sonuncuya fenol götürüb məhlulları nitrolaşdırmaq üçün hər bir sınaq şüşəsinə 2 ml qatı nitrat turşusu töküb ehtiyatla qızdırdıqda sarı rəng alınır. Sınaq şüşələrini soyudub hər birinə 3-4 ml natrium hidroksid (ammonium hidroksid də əlavə etmək olar) əlavə edib əmələ gələn narıncı rəngi və onun ayrı-ayrı hallarda intensivlik dərəcəsinə müşahidə etmək və müvafiq nəticəni iş dəftərinə qeyd etmək lazımdır. Reaksiyanı 1%-li jelatinlə aparıb nəticə alınmadığını da yoxlamaq olar.

İŞ 14

MILLON REAKSIYASI

Tirozini təsvir olunan aşağıdakı reaksiya ilə də aşkar etmək olar. Reaksiyanı spesifik hesab etmək olmaz.



Çünki bir sıra fenollar da həmin reaksiyanı verirlər. Civə ilə nitrat turşusu qarışığından ibarət Millon reaktivindən istifadə etdikdə tirozinin fenol nüvəsi və sərbəst hidroksil qrupu, reaktivin tərkibinə daxil olan civə duzları ilə qırmızı rəngli tirozinin civə birləşməsini əmələ gətirir.

Burada da benzol həlqəsinin nitrolaşması prosesi gedir və proses daha mürəkkəb birləşmə əmələ gəlməsi istiqamətində də gedə bilər. Bütün hallarda qırmızı rəng əmələ gəlir.

Reaktivlər:

1. 0,1%-li tirozin
2. 1%-li zülal
3. Bitki zülalı
4. 1%-li fenol
5. Millon reaktiv (əlavələr 11)
6. 1%-li jelatin

İşin gedişi

Beş sınaq şüşəsinə növbə ilə hərəsi 3 ml olmaqla, tirozin, yumurta zülalı və bitki zülalı, jelatin və fenol götürüb sınaq şüşəsinə növbə ilə 1,5 ml millon reaktivini əlavə edib rəngin əmələ gəlməsini müşahidə etmək olar. Müxtəlif maddələrlə aparılan bu reaksiyalarda rəng yavaş, tez əmələ gələ bilər, çöküntü ola bilər və s. jelatin olan sınaq şüşəsində nəticə alınmır.

İŞ 15

ZÜLALIN HIDROLIZI

Zülal məhlulu turşu və ya qələvi ilə qaynadıldıqda peptid əlaqələrinin qırılması və sərbəst amin turşularının əmələ gəlməsi baş verir. Prosesi müşahidə etmək üçün formoltitrləmə üsulunu tətbiq etmək olar (iş 37-yə bax). Formoltitrləmə hidroliz prosesində sərbəst amin qruplarının artmasını müşahidə etməyə imkan verir. Bu işdə isə hidrolizdən əvvəl və sonra formoltitrləmə prosesində sərf olunan qələvinin miqlarını müəyyənləşdirməklə kifayətlənəcəyik.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Sınaq şüşələri
2. Sentrifuqa üçün bölgülü sınaq şüşələri
3. Ştativ
4. Su hamamı
5. Şüşə çubuq
6. 1 ml-lik pipetka
7. Qatı HCl
8. 10%-li NaOH
9. 2%-li HCl
10. 0,05 N NaOH
11. Fenolftalein (spirtə məhlulu) (əlavələrə bax, 12)
12. 10%-li yumurta zülalı
13. Formol qarışıq (Zerensena görə) - əlavələrə bax (1).

Bölgülü sınaq şüşəsinə 2,5 ml zülal və 1 ml qatı HCl töküb şüşə çubuqla qarışdırdıqdan sonra qarışıqdan pipetka ilə 1 ml götürüb sınaq şüşəsinə keçiririk. Sınaq şüşəsinə fenolftalein və çəhrayı rəng alınana qədər damla-damla 10%-li qələvi əlavə edirik. 10%-li qələvi ilə zəif çəhrayı rəngin alınması çətin olduğu üçün aşağıdakı qayda üzrə işləmək lazımdır. Qələvi ilə qırmızı rəng alıb fenolftaleini 2%-li HCl-la zəif çəhrayı rəngə qədər çatdırırıq. Bu zaman 0,05 N NaOH-dan istifadə edilir. Sonra sınaq şüşəsinə 10 damla formol qarışıq əlavə edib qarışdırırıq. Rəng itərsə zəif çəhrayı rəng 0,05 N NaOH-da bərpa edilir. Sərf olunan 0,05 N NaOH-ın damlalarının sayı və ya ml-lə miqdarı cədvələ yazılır. Formol qarışıq tökdükdə çəhrayı rəng itməsə, bu o deməkdir ki, sərbəst karboksil qrupları yoxdur. Bu halda sınaq şüşəsinə qələvi əlavə etmək lazım deyil. Cədvəldə isə (0) yazılır.

Zülal HCl-la qarışdırılmış bölgülü sınaq şüşəsində məhlulun həcmi qeyd edilir. Sonra sınaq şüşəsi 1 saat müddətində qaynar su hamamına yerləşdirilir. Sınaq şüşəsinə soyudub əvvəlki həcmə çatana qədər üzərinə su tökürük. Hidrolizətdən 1 ml adi sınaq

şüşəsinə keçirib yuxarıdakı qayda üzrə fenolftaleinə əsasən məhlulu neytrallaşdırır və 10 damla formol qarışıq əlavə edib 0,05 N NaOH-da titrləyirik. Bu dəfə də qələvinin miqdarı cədvəldə qeyd edilir.

Tədqiq	Formoltitrlemə zamanı sərf olunan 0,05 N NaOH-in miqdarı (damla və ya ml-lə)	
olunan maddə	Hidrolizdən əvvəl	Hidroliz başlandıqdan 1 saat sonra
Yumurta zülalı		

İŞ 16

AMIN TURŞULARININ XROMATOQRAFIYA

ÜSULU İLƏ TƏYİNİ

Xromatoqrafik üsulla amin turşuları asanlıqla ayrılır və onları qarışıqda təyin etmək mümkündür. Üsulun mahiyyəti ondan ibarətdir ki, amin turşularının qarışıqından və ya zülal hidrolizatından götürülmüş zülal damlası filtr kağızından ibarət zolaq üzərində yerləşdirilir və zolağın ucu müvafiq üzvi həll ediciyə salınır. Həll edici zolaq vasitəsilə sorulur və özü ilə bərabər amin turşularını apararaq kağız üzərində paylayır. Amin turşularının yerdəyişmə sürəti onların kimyəvi tərkibi və mütəhərrik və ya qeyri-mütəhərrik həll edicidə həll olmasından asılıdır. Mütəhərrik həll edici kimi, məsələn, su ilə doymuş fenol (və ya n. butil spirti, amil spirti və s.) işlədilə bilər. Qeyri-mütəhərrik həll edici sudur. Suyun buxarları filtr kığızını doydurur (xarici kağız quru qalır). Amin turşuların suda həll olması nə qədər az, fenolda həll olması nə qədər çoxsa, o qədər də sürətlə üzvi həll edicinin ardınca hərəkət edir. Amin turşularının kağız üzərində vəziyyətini ninhidrin rəngli reaksiyasının köməyi ilə müşahidə etmək olar. Bunun üçün qurudulmuş kağız zolağını 0,1-0,2%-li ninhidrinin spirt məhlulu ilə çiləyib quruducu şkafda qızdırmaq lazımdır. Amin turşuları kimyəvi tərkiblərindən asılı olaraq göy, bənövşəyi və ya narıncı ləkələr şəklində aşkar olur. Ayrı-ayrı amin turşularının yerdəyişmə sürəti paylanma əmsalı (R_f) köməyi ilə ifadə oluna bilər. R_f həmçinin mütəhərriklik əmsalı da adlanır (şəklərin xromatoqrafiyası üsullarına bax).

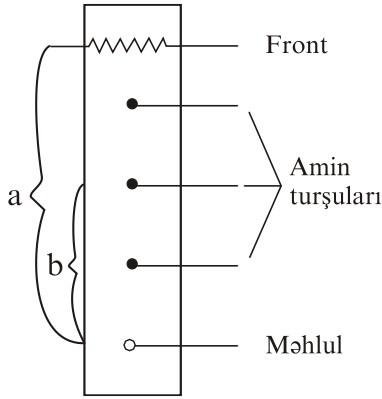
Paylanma əmsalı amin turşusu yerləşdirilən yerdən (çıxış nöqtəsindən) müvafiq amin turşusu ləkəsinin ortasına qədər (a) olan müsafənin (millimetrlə) çıxış nöqtəsindən həll edicinin yoluna (b) (front) olan nisbətində (millimetrlə) deyilir (şək.1).

$$R_f = \frac{a}{b}$$

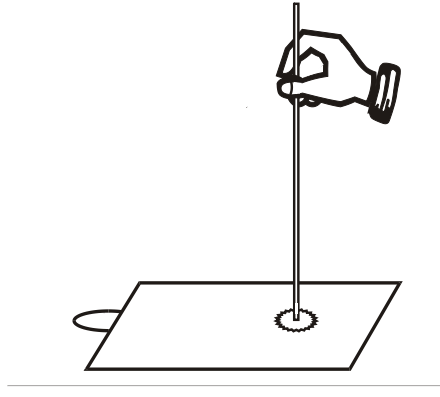
Paylanma əmsalı hər bir amin turşusu üçün səciyyəvi qiymət olub konkret şəraitdə (həll edici, temperatur, kağızın növü və s.) sabitdir.

Reaktivlər:

1. Amin turşularının qarışığı (alanin, leysin və s.)
2. Fenol və ya butanol
3. 0,1-0,2%-li ninhidrin (etanolda)



Şəkil 1.



Şəkil 2.

İşin gedişi

Uzunluğu 12-15, eni 1,5 sm olan filtr kağızı zolağı kəsilir. Xromatografiya üçün filtr kağızı hamar, təmiz və kifayət qədər sıx olmalıdır. Kağız yaxşı olduqda ninhidrinlə çiləndikdən sonra amin turşularının ləkələri dairəvi və ya bir qədər ellipsvari alınır. Əks halda ləkələr çox uzunsov olur. Zolağın yuxarı ucundan uzunluğu 15-20 sm olan sap keçirilir və ucu düyünlənir. Aşağı ucda zolağın kənarlarından 1 sm aralı diametri 3-4 mm olan dairə borunun köməyiylə tədqiq olunan amin turşularının qarışığı kiçik damla şəklində yerləşdirilir (şək.2). Damla yerləşdirilən nöqtə havada qurudulur. Uzunluğu 18-20, diametri 2-2,5 sm olan sınaq şüşəsinin dibinə divarlarını islatmadan 15-20 damla fenol (və ya butanol) tökülür. Sapdan yapışaraq zolağı 2-3 mm məhlula girənə qədər sınaq şüşəsinə vertikal vəziyyətdə (divarlara dəymədən) tıxac vasitəsilə asırıq (şəkil 3). Tıxacı yaxşı bağlayıb, cihazı ştativlə temperaturu 35-40°C olan termostata 1,5-2 saat müddətinə yerləşdiririk. Bu müddət ərzində həlledicinin frontu 10-12 sm

qalxır. Göstərilən müddət keçdikdən sonra zolağı çıxarıb temperaturu 50-100° olan quruducu şkafdan vertikal vəziyyətdə asırıq. 10-15 dəqiqədən sonra (fenol və ya butanol buxarlanmalıdır) zolağı çıxarıb ştativdə asaraq pulverizatorla ninhidrin məhlulu ilə çiləyib yenidən temperaturu



Şəkil 3.

100-110° olan quruducu
şkafa 5-6 dəqiqə
müddətinə yerləşdiririk.
Kağız zolağı qız-

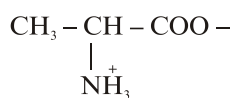
dıqca amin turşuları olan yerlərdə göy və ya bənövşəyi ləkələr əmələ gəlir. Kağız zolağını 20x10 sm ölçülü şüşə lövhə üzərinə qoyub xətkəş vasitəsilə (1-ci şəkilə bax) a və b məsafələrini ölçüb R_f -i hesablayırıq. Hər amin turşusu üçün paylanma əmsalı $R_f = \frac{a}{b}$ düsturu ilə hesablanır. Ləkələrin hansı amin turşusuna məxsus olmasını hər amin turşusu üçün ayrıca xromatoqrafiya olmaqla kontrol təcrübə yolu ilə müəyyənləşdirirlər.

İŞ 17

AMIN TURŞULARI MƏHLULLARININ

pH-nın TƏYİNİ

Amin turşularının suda məhlullarının reaksiyası, sərbəst amin və karboksil qruplarının miqdarından asılıdır. Monoaminomonokarbon turşularının karboksil və amin qrupları suda bir-birini qarşılıqlı neytrallaşdıraraq, daxili duz əmələ gətirir:



Belə amin turşularının suda məhlulunun reaksiyası neytrala yaxın olur. Monoaminodikarbon amin turşuları turş məhlul verir. Çünki bu halda daxili duz əmələ gəlməsi üçün bir COOH qrupu sərf olunur. Digəri isə suda dissosiasiya edərək H^+ ionları əmələ gətirir. Diaminomonokarbon amin turşuları, əksinə, qələvi məhlul verir. Daxili duz əmələ gələrkən bir amin qrupu sərbəst qalır. Amin turşuları məhlulunun pH-ı kalorimetrik üsulla təyin oluna bilər.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Universal indikatorla pH-ı təyin etmək üçün şkala universal indikator (əlavələrə bax, 13)
2. 0,1%-li qlisin
3. 0,1%-li asparaqın turşusu
4. 0,1%-li lizin

İşin gedişi

Üç mikrokimyəvi sınaq şüşəsinə 3 damla amin turşusu məhlulu götürüb (birinciye qlisin, ikinciye lizin, üçüncüyə asparaqın turşusu) hər birinə 5 damla universal indikator əlavə edirik. Qarışdırdıqdan sonra sınaq şüşələrində əmələ gələn rəng şkala ilə tutuşdurulur və nəticə cədvələ qeyd edilir.

Cədvəl 1

Amin turşuları qrupu	Amin turşularının adı	pH
monoaminomonokarbon	qlisin	
monoaminodikarbon	asparaqin turşusu	
diaminomonokarbon	lizin	

Şkala olmadıqda aşağıdakı cədvəldən istifadə etmək olar.

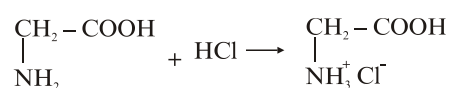
Cədvəl 2

Məhlulun rəngi	pH	Məhlulun rəngi	PH
qırmızı	4	yaşıl	8
narıncı	5	göy-yaşıl	9
sarı	6	göy-bənövşəyi	10
sarı-yaşıl	7	qırmızı-bənövşəyi	11

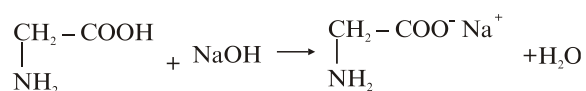
İŞ 18

AMIN TURŞULARININ AMFOTERLIYI

Mühitin reaksiyasından asılı olaraq amin turşuları özlərini turşu və ya əsas kimi apara bilir. Turşu ilə amin turşusu amin qrupu hesabına duz əmələ gətirir.



Qüvvətli turşu mühitində amin turşusunun karboksil qruplarının dissosiasiyası mümkün olmur. Lakin məhlula qələvi əlavə etdikdə COOH qrupu və qələvi hesabına duz əmələ gəlir.



Yuxarıdakı reaksiyalar amin turşuları məhlullarının yüksək bufer tutumuna malik olmasını izah edir. Amin turşusu məhlulu qələvi və ya turşu ilə titrəndikdə pH suya qələvi və ya turşu əlavə edilən haldan daha az dəyişir. Bunu görmək üçün aşağıdakı təcrübəni aparmaq kifayətdir.

Reaktivlər:

1. 5%-li qlisin
2. 0,4%-li NaOH
3. 0,4%-li HCl
4. 0,5%-li fenolftalein spirtdə
5. 0,1%-li metiloranj

İşin gedişi

Dörd mikrokimyəvi sınaq şüşəsini nömrələyib birinciyə 5%-lili qlisin, ikinciyə 5 damla su götürürük. Hər iki sınaq şüşəsinə bir damla fenolftalein əlavə edirik. İkinci sınaq şüşəsinə 1 damla NaOH salan kimi bənövşəyi rəng alınır. Birinci şüşəyə damla-damla NaOH ikinci şüşədəki rəngə uyğun gələnə qədər əlavə edirik. Əlavə olunan damlalar sayılır.

Hər iki sınaq şüşəsində məhlulun həcmnin eyni olması üçün birinci sınaq şüşəsinə titrləmə zamanı tökülən qələvi qədər, ikinci sınaq şüşəsinə damla-damla su tökmək lazımdır. Qlisinə sərf olunan NaOH-ın miqdarı cədvələ yazılır.

Üçüncü sınaq şüşəsinə 5 damla qlisin, dördüncüyə 5 damla su töküb hər birinə bir damla metiloranj əlavə edilir. Dördüncü sınaq şüşəsinə bir damla HCl əlavə etdikdə məhlul çəhrayı rəng alır. Üçüncü sınaq şüşəsindəki qlisin 0,4%-li turşu ilə eyni rəng (çəhrayı) alınana qədər damlaları sayə-saya titrlənir.

Hər iki sınaq şüşəsində məhlulun həcmnin eyni olması üçün titrləmə prosesində üçüncü sınaq şüşəsinə sərf olunan turşu qədər dördüncüyə damla-damla su tökülür və nəticələr qeyd olunur.

Sınaq şüşəsinin möhtəviyyatı	Titrleməyə sərf olunan maddənin miqdarı, damla ilə	
	0.4%-li NaOH	0,4%-li HCl
qlisin	-	-
su	1	1

İŞ 19

AMIN TURŞULARININ FLUORESSENSIYASI

Filtr kağızı üzərinə yerləşdirilmiş amin turşusu, ultrabənövşəyi şüa ilə işıqlandırıldıqda fluorensensiya edir.

Bu hadisə bioloji materialın tədqiqində istifadə edilir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Lyuminescent lamp
2. Filtr kağızı
3. 0,1 və ya 5%-li qlisin

Filtr kağızı üzərinə bir damla amin turşusu məhlulu yerləşdirib quruduruq. Qaranlıq yerdə lyuminescent lampası qarşısına filtr kağızını yerləşdirsək damla olan yerdə qəhvəyi fluorensensiya müşahidə edirik.

ZÜLALLARIN FİZİKİ-KİMYƏVİ XASSƏLƏRİ

İŞ 20

ZÜLALLARIN HƏLLOLMA QABİLİYYƏTİ

Su ilə yumurta zülalı, qan zərdabı, əzələ plazması və tərkibində albuminlər, qlobulinlər olan bioloji mayelərin qatılığını azaldıqda birincilər məhlula keçir, ikincilər isə çökürlər. Suda az miqdar qələvi metalların duzları olduqda (NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄ və başqaları) məhlula hər iki zülal fraksiyaları - albumin və qlobulinlər tədricən keçirlər. Bitki zülallarını ayırmaq üçün tədqiq olunan materialda zülal fraksiyalarının xarakterindən asılı olaraq müxtəlif həlledicilərdən istifadə olunur. Buğda, çovdar və arpa ununun zülalları 0,2%-li NaOH, daha yaxşı qələvinin su spirt məhlulunda (0,2%-li NaOH 50-60%-li etil spirtində) həll olunur. Məhlula albumin, qlobulin, prolamin və qlütelinlər keçirlər. Qlütelinlər tərkiblərində çoxlu dikarbon amin turşuları (qlütamin, asparagin) olduğundan qələvidə yaxşı həll olur və turşu xarakteri daşıyırlar. Prolaminlər (xüsusən buğda və çovdar qliadini, arpa qordeini), duz məhlulları suda həll olmur. Bunlar üçün həlledici 50-80%-lilə spirtir. Təcrübə işinin nəticəsi cədvəldə qeyd edilir.

Cədvəl 3

Zülalın həllolma qabiliyyəti

Zülalın adı	H ₂ O	5%-li NaCl	0,2%-li NaOH

Həllolmanı (+) zülalın həll olmamasını isə (-) işarə ilə qeyd etmək olar. İşin sonunda isə nəticələr yazılır.

İşin gedişi

1. İki damla yumurta zülalı üzərinə 20 damla su töküb qarışdırır və 3-5 dəqiqə saxlayırıq. Yumurta albumini həll olur, qlobulin isə az miqdar çöküntü verir. Məhlulu əvvəlcədən su ilə isladılmış qatlı filtdən süzüb filtratı çökdürmə reaksiyaları üçün istifadə edirlər.

2. İki damla yumurta zülalı üzərinə 20 damla 5%-li NaCl tökdükdə albumin və qlobulini olan duz məhlulu alırıq. Belə məhlul dializ üçün istifadə olunur.

3. 200 mq buğda və ya soya ununu farfor həvəngdə 5 ml 0,2%-li NaOH (0,1 N NaOH su ilə 1:1 nisbətində qarışdırılır) məhlulu ilə əzirik. Məhlula albumin, qlobulin və qlütelin keçir. Alınan qarışıq sınaq şüşəsinə keçirilir, bir qədər qaldıqdan sonra yuxarı bulanıq qat rəngli reaksiyalar və dializ üçün istifadə edilir.

İŞ 21

DIALİZ

Dializ məsamələrindən yüksək molekullu kolloid hissə-ciklərini buraxmayan membranlar vasitəsilə maddələrin ayrılmasının xüsusi üsuludur. Zülallar kolloid, sellofan və başqa maddələrdən ibarət yarımqeçirici membranlardan pis keçir. Zülalın kiçik molekullu birləşmə, məsələn, NaCl-la qarışığını belə membrandan düzəldilmiş kisəciyə keçirib axar suya salsaq (və ya suyu dəyişməklə qaba) duzdan zülalı azad etmək olar.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 10 ml-lik sentrifuqa və ya Vasserman sınaq şüşələri ştativlə
2. Bir ucu sellofan və ya kolloidylə örtülmüş, uzunluğu 120 mm, diametri 7 mm olan şüşə boru
3. 10%-li yumurta zülalı məhlulu
4. Doymuş NaCl məhlulu (əlavələrə bax, 14)
5. 1%-li AgNO₃
6. 1%-li CuSO₄
7. 10%-li NaOH

İşin gedişi

Sentrifuqa və ya Vasserman sınaq şüşəsinə 3 ml distillə suyu götürürük. Dializ üçün şüşə boruya açıq tərəfindən üç damla zülal və üç damla NaCl töküb içərisində su olan sınaq şüşəsinə elə salınır ki, sellofan və ya kolloidylə örtülmüş uc suya daxil

olsun (şəkil 4). 5 dəqiqədən sonra borunu çıxarıb müəyyən edirik ki, xlor ionları membrandan keçmiş, zülal hissəcikləri isə keçməmişdir. Bunun üçün iki mikro sınaq şüşəsinə böyük sınaq şüşəsindən bir neçə damla məhlul götürüb sınaq şüşələrinin birində zülal, digərində xloridlərə aid reaksiya aparılır. Xloridləri müşahidə etmək üçün 5 damla məhlul üzərinə 2 damla gümüş nitrat məhlulu əlavə olunur. Zülalları isə biuret reaksiyası ilə (iş 25) müşahidə etmək olar.



Şəkil 4. Dializi müşahidə etmək üçün cihaz.

İŞ 22

OKSIHEMOQLOBIN KRISTALLARININ

ALINMASI

Zülalların tərkibi və quruluşunu öyrənmək üçün mühüm məsələlərdən biri onların təmiz halda alınmasıdır.

Hazırda əksər zülalların kristallik preparatları alınmışdır. Lakin kristallik zülalların alınması çox vaxt mürəkkəb cihazlar tələb edir. Ona görə də biz kristallik zülal oksihemoqlobinin alınmasının sadə üsulu ilə tanış olaq.

Oksihemoqlobin eritrositlərin tərkibində olur. Əgər eritrositlərin qlafını toluolla dağıtsaq, azad olmuş oksihemoqlobin kristal əmələ gətirir.

Reaktiv və ləvazimat:

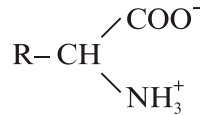
1. Mikroskop
2. Əşya və örtücü şüşələri
3. Şüşə çubuq
4. Toluolda həll edilmiş Kanada balzamu
5. Qan

İşin gedişi

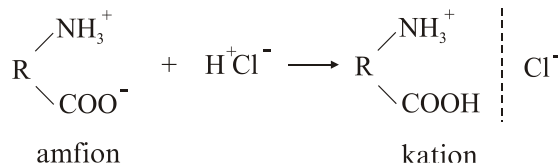
Əşya şüşəsi üzərinə şüşə çubuqla bir damla qan yerləşdirib üzərinə örtücü şüşə qoyuruq. Örtücü şüşənin ətraflarına Kanada balzamu (toluolda) sürtürük. Qan damlası havadan tamamilə təcrid edilməlidir. Alınan preparat 5-6 gün quruyana qədər saxlanılır. Bu müddətdə balzam quruyur, toluol isə balzamdən qan damlasına daxil olaraq eritrositləri hemoliz edir. Ayrılan oksihemoqlobin kristal əmələ gətirir. Bunu mikroskopla baxmaqla müəyyən etmək olar.

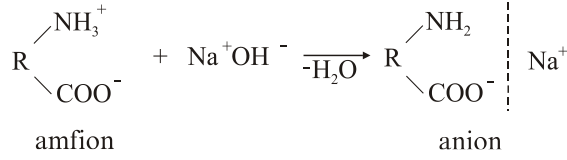
ZÜLALLARIN ÇÖKDÜRMƏ REAKSİYALARI

Müəyyən şəraitdə məhlulda olan zülal çöküntü əmələ gətirmək qabiliyyətinə malikdir. Bu hadisə tədqiq olunan materialda zülal tapılmasında və təmiz halda zülal alınmasında istifadə edilir. Zülal molekulası məhlulda elektrik yükü daşıyaraq su təbəqəsi ilə əhatə olunur. Bu vəziyyət zülalın çökməsinin qarşısını alır. Amin turşuları kimi, zülallar da amfoter elektrolitlər olub məhlullarda amfion əmələ gətirir.

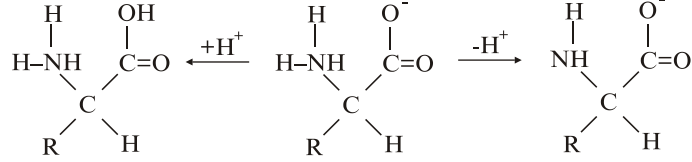


Hər bir zülal üçün müəyyən pH-da ionlaşmış əsasi qrupların miqdarı ionlaşmış turşu qruplarının miqdarına bərabər olan nöqtə mövcuddur. Həmin pH izoelektrik nöqtəsi və həmin nöqtədə zülalın vəziyyəti izoelektrik vəziyyət adlanır. İzoelektrik nöqtəsində zülal molekulasında ionlaşmış qrupların miqdarı minimal olur, molekul özü ilə elektrik yükü daşımır. İzoelektrik vəziyyətdə zülal molekulunun bütün uzunluğu boyu eyni miqdar turşu və əsasi qruplar yerləşir. Zülal plastik makromolekulası, müxtəlif adlı yüklərin qarşılıqlı təsiri nəticəsində yumaq şəklinə düşür ki, bu da zülalın çökməsinə səbəb olur. Əsas zülalların izoelektrik nöqtəsi zəif turşu olduğundan tam çökmə effekti üçün məhlullar daha da turşulaşdırılır. Turşunu artırıqlaması ilə əlavə etdikdə amin turşuları özlərini əsasi maddə kimi aparırlar. Bu zaman karboksil qruplarının dissosiasiyası zəifləyir. Amin qrupları isə müsbət yük kəsb edir, molekulun ayrı-ayrı hissələri arasında itələmə qüvvələri yaranır, molekul zəncirvari quruluşa qayıdır, bu isə zülalın çökməsinin qarşısını alır. Qələvi mühitdə zülal molekulası mənfi yük daşıyır ki, bu da molekulun açılmasına səbəb olur. Ona görə də zülal məhluluna qələvinin əlavə edilməsi çökmənin qarşısını alır. Beləliklə, qüvvətli qələvi və ya qüvvətli turşu mühitdə zülal ya qüvvətli müsbət və ya mənfi yüklənir. Bundan başqa, belə şəraitdə zülalın qismən hidrolizi baş verir:





Müsbət yükün artması (turş mühitdə) və mənfi yükün artması (qələvi mühitdə) aşağıdakı formulalarla ifadə oluna bilər.



molekul müsbət	amin turşularının	molekul mənfi
yüklənmişdir	svitterion forması	yüklənmişdir
pH = 2 - 3	pH = 4 - 9	PH = 9 - 10
(bipolyar forma)		

Zülal molekulasındakı yüklərin neytrallaşdırılması üçün məhlula bəzi mineral duzların az miqdarını da əlavə etmək olar. Bu üsul zülal məhlulunu azacıq turşu ilə izoelektrik nöqtəsinə gətirməklə yanaşı tətbiq edildikdə daha effektiv olur.

Zülalların çökdürmə üsullarının ən çox effektiv nəticəsi onları əhatə edən su qatının dağıdılması zamanı alınır. Bunu zülal məhlulunu qaynatmaq və ya duzlaşdırma ilə əldə etmək olar. Qaynatma zamanı hidrogen əlaqələrinin dağılması və ikinci quruluşun pozulması baş verir. Adətən qaynatma yolu ilə zülalın çökdürülməsi azacıq turşulaşdırılma və azacıq duzlaşdırma ilə yanaşı aparılır. Zülalların çökdürülməsi üsullarını qayıdan və qayıtmayan çökmə olaraq iki yerə bölmək olar. İkinciləri tətbiq edərkən zülal molekulasının nativ konformasiyası pozulur. Duzlaşdırma, spirtlə və asetonla (soyuqda) çökdürmə zamanı alınan çöküntünü bioloji xüsusiyyətlərini itirmədən həll etmə yolu ilə əvvəlki vəziyyətə qaytarmaq olar. Qaynatma, mineral və üzvi turşularla həmçinin ağır metal duzları ilə çökdürmə zamanı isə zülal öz bioloji xüsusiyyətlərini itirir.

İŞ 23

ZÜLALLARIN QAYNATMA YOLU İLƏ ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

İşin məqsədi neytral, turş, qələvi mühitlərdə və az miqdar NaCl iştirakı ilə qaynatma yolu ilə zülalın çökdürülməsidir.

Reaktivlər:

1. 10%-li yumurta zülalı
2. 2%-li sirkə turşusu
3. 10%-li qələvi (NaOH)
4. Doymuş NaCl məhlulu (əlavələrə bax, 14)

İşin gedişi

Altı mikrokimyəvi sınaq şüşəsinə 1 ml zülal məhlulu töküüb, ikinci, üçüncü sınaq şüşəsinə 1 damla (çox olmaz), dördüncü, beşinci sınaq şüşələrinə 5 damla sirkə turşusu, altıncıya 1 damla qələvi əlavə edirik, üçüncü və beşinci sınaq şüşəsinə əlavə 2 damla doymuş NaCl tökdükdən sonra bütün sınaq şüşələrini qaynayana qədər qızdırırıq. Hansı şüşədə çöküntü əmələ gəldiyini və intensivliyini (+) işarəsi ilə (1-dən 3-ə qədər) qeyd edirik.

Cədvəl 4

Sıra sayı	Sınaq şüşələrinin möhtəviyyatı, damlalar			
	Zülal	CH ₃ COO H	NaOH	NaCl
1	5	–	–	–
2	5	1	–	–
3	5	1	–	2
4	5	5	–	–
5	5	5	–	2
6	5	–	–	–
Alınan nəticələrin izahı				

İŞ 24

ZÜLALIN ÇÖKMƏSİNƏ pH-ın TƏSİRİ

Reaktivlər:

1. 2%-li sirkə turşusu
2. 2,8%-li natrium asetat (CH₃COONa)
3. 10%-li yumurta zülalı
4. Etil spirti

İşin gedişi

Beş ədəd mikrosınaq şüşəsində müxtəlif pH-lı qarışıq hazırlanır. Bunun üçün sirkə turşusu və natrium asetat məhlullarından 5-ci cədvəldə göstərilmiş nisbətlərdən istifadə edilir. Təcrübədən əvvəl natrium asetat və sirkə turşusu üçün istifadə olunan pipetkaların uclarının eyni olmasını yoxlamalı. Əks halda damlalar həcmcə müxtəlif olar. Bufer məhlulları hazırlandıqdan sonra sınaq şüşələrinin hər birinə 2 damla zülal götürüb qarışdırır və 10 damla spirt əlavə edirik. Yenidən məhlulları qarışdırıb 5-10 dəqiqə

ərzində maksimal bulanmanı qeyd edirik. Maksimum bulanıq, maksimal çökməyə uyğun olub zülalın izoelektrik nöqtəsinə yaxındır.

Cədvəl 5

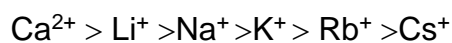
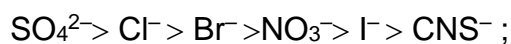
Sıra sayı	Sınaq şüşələrinin möh- təviyyəti, damlalar		pH-in təxmini qiyməti	Bulanm a dərəcəsi	Nəti- cələr
	CH ₃ COO H	CH ₃ COON a			
1	9	1	3,1		
2	8	2	4,7		
3	5	5	4,7		
4	2	8	5,3		
5	1	9	5,6		

İŞ 25

ZÜLALIN DUZLAŞDIRMA YOLU İLƏ ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Duzlaşdırma, zülalın yüksək qatılıqlı neytral duz məhlulları ilə (NaCl, (NH₄)₂SO₄ və b.) çökdürülməsidir. Duzlaşdırma reaksiyaları zülal makromolekulasının dehidratlaşması və eyni zamanda elektrik yükünün neytrallaşması ilə əlaqədardır. Müxtəlif zülalları çökdürmək üçün eyni duzların müxtəlif qatılıqları tələb olunur.

İri molekullu qlobulinlər, albuminlərə nisbətən asan çökürlər. Qlobulinlər yarım doymuş, albuminlər isə tam doymuş ammonium sulfat məhlulunda çökürlər. NaCl, (NH₄)₂SO₄-ə nisbətən zəif çökdürmə qabiliyyətinə malikdir. Bu isə Hofmeister sırasında vəziyyətləri ilə səciyyələnən ionların zəif dehidratlaşdırıcı qabiliyyəti ilə əlaqədardır.



Hofmeister sırası

NaCl qlobulinləri 100% doymuş məhlulda çökdürür. Albuminlərin çökməsi üçün isə əlavə olaraq məhlul turşulaşdırılmalıdır. Bu cür çökdürmə qayıdandır. Dializ və ya su ilə qatılığı azaltmaqla zülal çöküntüsünü yenidən həll etmək mümkündür və zülal öz xüsusiyyətlərini itirmir.

Üsul müxtəlif zülal fraksiyalarını ayırmaq və kristallik zülal almaq üçün tətbiq edilir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Yumurta zülalı (əlavələrə bax, 15)
2. Narın NaCl, toz halında
3. Doymuş ammonium sulfat məhlulu
4. Kristallik toz halına salınmış ammonium sulfat
5. 1%-li sirkə turşusu
6. 10%-li NaCl
7. 1%-li CuSO₄
8. Qıf və pipetkalar
9. Filtr kağızı

İşin gedişi

a) NaCl -la çökdürmə

Sınaq şüşəsinə 20 damla zülal məhlulu və həll olması dayanana qədər tədricən narın NaCl tökülür. Bir neçə dəqiqədən sonra qlobulinlər çökür. Məhlul süzülür. Filtratda albuminlər qalır. Neytral məhlulda hətta qatı NaCl əlavə edildikdə belə filtratdakı albuminlər çökmürlər.

Filtrata damla-damla (15-20 damla) 1%-li sirkə turşusu əlavə etdikdə turş mühitdə albuminlər çökür. Bir neçə dəqiqədən sonra albumini süzüb filtratda zülal qalmadığını biuret reaksiyası vasitəsilə yoxlayırıq (iş 5).

b) (NH₄)₂SO₄ -lə çökdürmə

15 damla zülal məhlulu üzərinə 15 damla doymuş ammo-nium sulfat məhlulu götürüb qarışdırdıqda yarım doymuş ammonium sulfat məhlulu alınır ki, həmin məhlulda çökmüş qlobulinlər müşahidə edilir. 5 dəqiqədən sonra alınan məhlul süzülür. Filtratda albumin qalır. Filtrata məhlul doyana qədər narın (NH₄)₂SO₄ əlavə edirik. Bu halda albumin çökür. Süzüldükdən sonra məhlulda zülalın olmadığını biuret reaksiyası ilə yoxlayırıq. Alınan nəticələri (+) və (-) işarələri ilə cədvəl şəklində qeyd etmək olar.

İŞ 26

ZÜLALLARIN AĞIR METAL DUZLARI

İLƏ ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Duzlaşdırmadan fərqli olaraq ağır metal duzlarının az miqdarı zülalı çökdürür. Zülallar ağır metal duzları ilə qarşılıqlı təsir zamanı onları adsorbsiya edir və duza

bənzər komplekslərin əmələ gəlməsinə səbəb olur. Bu kompleks birləşmələr həmin duzların artıq miqdarı götürüldükdə suda həll olmur. Ağır metal duzları (Pb, Cu, Ag, Hg və b.) zülalı qayıtmayan çökməyə, denaturasiyaya uğradır. Çöküntünün duzların artıq miqdarında həll olması adsorbsion peptizasiya adlanır. Bu hadisə zülal hissəciyi üzərində eyni adlı müsbət yüklərin əmələ gəlməsi ilə əlaqədardır. Zülalın ağır metal ionlarını həll olmayan çöküntü halında birləşdirmə qabiliyyəti civə, mis, qurğuşun və b. duzlarla zəhərlənmə zamanı istifadə olunur. Zəhərlənmə baş verdikdə xəstəyə dərhal süd və ya yumurta ağı verilir. Metallar mədəyə çatmamışsa və ya hələ sorulmamışsa müalicə yaxşı nəticə verir. Zülalla birləşmiş zəhərlər xəstəni qusdurma yolu ilə orqanizmdən uzaqlaşdırılır.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Şüşə çubuqlar
2. Pipetkalar
3. Yumurta zülalı məhlulu
4. 10%-li CuSO_4
5. 5-10%-li qurğuşun asetat $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb}$

İşin gedişi

a) CuSO_4 -lə çökdürmə

1 ml zülal məhlulu üzərinə 5 damla ehtiyatla 10%-li mis sulfat əlavə etdikdə suda həll olmayan solğun göy rəngli çöküntü alınır. Eyni miqdar zülal məhlulu üzərinə əvvəl 1, sonra 10 damla mis sulfat tökdükdə duzun artıq miqdarı çöküntünün həll olmasına səbəb olur.

b) qurğuşun asetatla çökdürmə

1 ml zülal məhluluna 5 damla 5%-li $\text{Pb}(\text{COOCH}_3)_2$ əlavə etdikdə suda həll olmayan, duzun artıq miqdarında həll olan çöküntü alınır. Alınan nəticələri cədvəl şəklində tərtib etmək olar.

İŞ 27

ZÜLALLARIN QATI MINERAL TURŞULARLA

ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Qatı mineral turşular zülalı denaturasiyaya uğradırlar. Zülalın çökməsi onun hissəciklərinin dehidratasiyası və turşularla kompleks duzlar əmələ gətirməsi ilə əlaqədardır. Ortofosfat turşusu çöküntü vermir. Nitrat turşusundan başqa digər mineral turşular artıq olduqda çöküntü həll olur. Bununla əlaqədar olaraq sidəyin kliniki tədqiqində nitrat turşusu ilə çökdürmə geniş tətbiq edilir (Geller nümunəsi). Bu

reaksiyaya əsasən sidiyin zülalları Robert-Stolnikov-İrandberq üsulu ilə miqdarca təyin edilir.

Reaktivlər:

1. Qatı HCl
2. Qatı HNO₃
3. Qatı H₂SO₄
4. Zülal məhlulu

İşin gedişi

a) Nitrat turşusu ilə çökdürmə

(Geller nümunəsi)

45°-lik bucaq altında 5 damla qatı HNO₃ üzərinə eyni miqdar zülal məhlulu ehtiyatla elə tökülür ki, iki maye qarışmasın. Məhlulların sərhədində ağ halqa əmələ gəlir. Sonra sınaq şüşəsini qarışdırıb oraya əlavə turşu tökdükdə çöküntünün həll olmadığını müşahidə edirik.

b) sulfat turşusu ilə çökdürmə

Eyni qayda ilə bu dəfə sulfat turşusu ilə çöküntü alınır. Lakin bu dəfə turşunun artıq miqdarında zülal çöküntüsü həll olur. Çökdürməni qatı xlorid turşusu ilə (HCl) yoxlamalı.

İŞ 28

ÜZVI TURŞULARLA ZÜLALLARIN

ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Üzvi turşular zülalları qayıtmayan çökməyə uğradırlar. Üçxlorsirkə turşusu - CCl₃COOH və sulfosalisil turşusu C₆H₃(OH)(COOH)SO₃H təcrübədə geniş tətbiq olunur. Sulfosalisil turşusu təbabətdə sidikdə cüzi miqdar zülalı aşkar etmək üçün tətbiq olunur (reaksiyanın həssaslığı 1:50000-dir). Bu turşu zülallarla yanaşı onların parçalanma məhsullarını da çökdürür (yüksək molekullu pepton və polipeptidləri). Üçxlorsirkə turşusu isə yalnız zülalları çökdürür. Bununla əlaqədar olaraq qanda olan yüksək molekullu polipeptidləri ayırmaq üçün qan zülalını üçxlorsirkə turşusu ilə çökdürürlər. Qanın qeyri-zülal azotunu təyin etmək üçün bu turşu tətbiq olunduqda, zülal azotu və digər azotlu maddələrin (peptidlər, sidik cövhəri, amin turşuları və s.) azotunu ayrıca təyin etmək mümkün olar.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Yumurta zülalı
2. 20%-li sulfosalisil turşusu

3. 1%-li üçxlorsirkə turşusu
4. Sınaq şüşələri ştativlə birlikdə
5. Pipetkalar

İşin gedişi

1. Sulfosalisil turşusu ilə çökdürmə

Sınaq şüşəsində 1 ml zülal məhlulu üzərinə 5-10 damla 20%-li sulfosalisil turşusu əlavə etdikdə zülalın çöküntüsü alınır.

2. Üçxlorsirkə turşusu ilə çökdürmə

Sınaq şüşəsində 1 damla zülal məhlulu üzərinə 5-10 damla 10%-li üçxlorsirkə turşusu əlavə etdikdə zülalın çöküntüsü alınır.

İŞ 29

ÜZVI HƏLLEDICİLƏRLƏ ZÜLALIN

ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Spirit, aseton, xloroform və digər üzvi həlledicilərlə zülal həll olmayıb çökür. Zülalın təbiətindən asılı olaraq onun çökdürülməsi üçün müxtəlif qatılıqda spirit tələb olunur. Spirit suyu özünə birləşdirərək zülal misellərinin dehidratasiyasına və məhlulda davamsız olmasına səbəb olur.

Zülal məhlulu spirtlə çökdürülərkən zəif turş və ya neytral olmalıdır. Reaksiya NaCl elektroliti olduqda daha yaxşı gedir. NaCl zülal hissəciyinin yükünü ləğv edir. Spirtin aşağı temperaturda zülalə təsiri qayıdandır. Çöküntünü tez spirdən azad etsək zülal öz nativ vəziyyətini saxlayır və yenidən suda həll edilə bilər. Spirtin uzun müddətli təsiri nəticəsində zülal denaturasiyaya uğrayır.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Yumurta zülalı məhlulu
2. Etil spirti və ya aseton
3. Doymuş NaCl məhlulu (əlavələr 14)
4. Sınaq şüşələri ştativlə birlikdə
5. Pipetkalar

İşin gedişi

5 damla zülal məhlulu üzərinə 15-20 damla etil spirti və ya aseton əlavə etdikdə məhlul bulanır. Sınaq şüşəsinə 1 damla qatı NaCl tökdükdə bir az sonra zülal çökür. Sınaq şüşəsinə 10 ml zülal məhlulu 5-6 ml etil spirti və ya aseton götürüb şiddətlə çalxalasaq "mağma" adlanan susuzlaşmış zülal kütləsi alarıq. İş xloroform məhlulu ilə də aparmaq olar.

İŞ 30

ALKOLOID REAKTİVLƏRİ İLƏ ZÜLALIN

ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

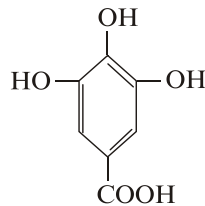
Alkoloidlər zülalları qayıtmayan çökdürməyə uğradır. Alkoloid reaktivləri sırasında tannin, pikrin turşusu, sarı qan duzu KJ-da civə yodid məhlulu, volfram, fosfor, molibden fosfor turşuları və s. aiddir. Zülalların alkoloid reaktivləri ilə çökməsi, alkoloidlərdə analoji heterotsikllər azot qruplarının, pirrol, indol, amidazol və s. olması ilə əlaqədardır. Alkoloid reaktivləri ilə zülalın çökmə mexanizmi zülalın əsasi azotlu qrupları ilə həll olmayan duza bənzər birləşmələrin əmələ gəlməsidir. Bu birləşmələrdə zülal kation, alkoloid reaktivləri isə anion vəzifəsini yerinə yetirir. Bu məqsədlə sirkə turşusu ilə zülal məhlulu azacıq turşulaşdırılır. Bu zaman zülal miseli üzərində müsbət yük əmələ gəlir ki, çökdürücünün mənfi yüklənmiş hissəcikləri ilə asanlıqla reaksiyaya girir. Müsbət yük daşıyan protamin və histon zülalları məhlulu turşulaşdırmadan alkoloid reaktivləri ilə asan çökürlər.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Yumurta zülalı məhlulu
2. Doymuş tannin məhlulu
3. 1%-li sirkə turşusu
4. Sınaq şüşələri, ştativlə birlikdə
5. Pipetkalar

İşin gedişi

Tannin – mürəkkəb efir olub hidroliz zamanı qlükoza və hal turşuları əmələ gətirir.



hal turşusu

5 damla zülal məhlulu üzərinə 1-2 damla doymuş tannin və 1-2 damla 1%-li sirkə turşusu əlavə olunur. Sarımtıl boz rəngli zülal çöküntüsü alınır. Analoji reaksiyanı pikrin turşusu ilə aparmaq olar.

İŞ 31

ZÜLALLARIN FENOLLA ÇÖKDÜRÜLMƏSİ

Spesifik polisaxaridlər və nuklein turşularını zülaldan ayırmaq üçün bu reaksiya tətbiq olunur (deproteinizasiya). Spesifik polisaxaridlər sırasına insan qanının bu və ya digər qrupa məxsus olmasını müəyyən edən (ABO sisteminin izoantigenləri) maddələr daxildir.

Reaktivlər:

1. Doymuş fenol məhlulu
2. 10%-li yumurta zülalı məhlulu

İşin gedişi

Üç damla zülal məhlulu üzərinə artıqlamasız, 10-15 damla fenol əlavə edib sınaq şüşəsini şiddətlə çalxaladıqda məhlul bulanır. Bir qədər sonra bulanıq artır. Bulanıq əmələ gəlməsi zülal çöküntüsü ilə əlaqədardır.

İŞ 32

KİRBİ-GEORGIYEV ÜSULU İLƏ

RNT VƏ DNT-nin ALINMASI

Həmin üsuldən istifadə etməklə bir obyektədən, zülaldan ayrı DNT və RNT preparatlarını almaq mümkündür. Üsul, homogenatın 0,14 M natrium-xlor (NaCl) məhlulu ilə suspenziyalaşdırılmasına əsaslanır.

Su ilə doydurulmuş fenolun əlavə edilməsi zülal hissədən azad olmağa imkan verir. Həmin proses RNP (ribonukleoproteid) üçün pH=6,0; DNP (dezoksiribonukleoproteid) üçün isə pH=8,3-də baş verir. Eyni vaxtda RNT və DNT ardıcıl və ayrı-ayrılıqda su məhluluna keçirlər ki, sonradan onları ayırmaq mümkün olur. Fenol burada həmçinin nukleazaların inhibitoru rolunu oynayır.

NT ilə iş zamanı ümumi olan bir qayda üzərində xüsusən dayanmaq lazımdır.

NT-na məxsus ayırma, çökdürmə işləri soyuqda (0-3°C) aparılmalıdır. İstifadə olunan bütün qablar əvvəlcədən soyudulmalı və iş prosesində buzda saxlanmalıdır. İstifadə olunan bütün reaktivlər də həmçinin müvafiq temperatura qədər soyudulmalıdır.

Preparatların ayrılması üçün istifadə olunası toxumalar dərhal işlənməyəcəksə onları heyvandan ayırdıqca 2-3 gün ərzində (daha çox yox) donmuş vəziyyətdə saxlayırlar.

Ləvazimat:

1. Soyuducusu olan sentri-fuqa (5000 g və yuxarı);
2. Homogenizator;
3. Çalxalayıcı;
4. Vakuüm-eksikator
5. 50 ml-lik şpris
6. Çini həvəng-dəstə
7. Ölçü silindri
8. 100 ml-lik bölücü qıf
9. 100-150 ml-lik Erlenmeyer kolbaları
10. Çəkilmək üçün şüşə byukslar
Kimyəvi sınaq şüşələri
- 11
- 12 Tənzif

Reaktivlər:

1. Su ilə doydurulmuş təzə qovulmuş fenol (əlavələr 29)
2. 0,14 M; 4 M; 1 M NaCl (əlavələr 30)
3. Tərkibində 1 l-də 0,05 M kalium sitrat olan 0,14 M NaCl (əlavələr 3)
4. Dietil efiri
5. 96 %-li etil spirti
6. Mütləq etanol
7. Buzlu sirkə turşusu
8. pH-ı 8,3 olan 1 l-də 0,3 M p-aminosalisil turşusu olan su ilə doymuş fenol (əlavələr 32)
9. Quru buz
10. Toluol

İş 4 mərhələdə aparılır:

- a) Toxumanın ayrılması və homogenatın hazırlanması;
- b) deproteinləşmə (zülal hissədən ayırma);
- c) su məhlulundan RNT-nin ayrılması;
- ç) DNT-nin ayrılması.

İşin gedişi

a) Təcrübə üçün təzə kəsilmiş heyvan toxumasından (qara ciyər, dalaq, beyin) istifadə olunur. Toxuma və ya üzvün ayrılması əməliyyatını mümkün qədər tez aparıb onu quru buza yerləşdirmək lazımdır.

Yaxşı soyudulduqdan sonra texniki tərəzidə 15-20 q toxuma çəkilir, onu doğrayıb çini, dibi buzla döşənmiş həvəngə yerləşdirir, tərkibinə kalium sitrat olan (dezoksiribonukleazanın inhibitoru rolunda) 0,14 M soyudulmuş NaCl məhlulu toxumanı örtənə qədər tökülür. Toxuma həvəngdə homogen hala 10-15 dəqiqə ərzində narın əzilmiş suspenziya halına salınır. Homogenləşdirməni Potter-Elveqeym və ya Uoring homogenizatorunda da aparmaq olar. Suspenziya alınan müddətdə tədricən məhlula kalium sitratlı NaCl -u ümumi həcmi 100 ml-ə çatdırmaqla əlavə edirik. Tərkibində DNT və RNT olan homogenat ikiqat tənzifdən süzülür.

b) Alınmış filtrat DNT və RNT-ni ardıcıl ayırmaq üçün işlədilir. Bu məqsədlə filtrata alınmış həcm qədər pH-ı 6,0 olan su ilə doydurulmuş fenol əlavə edilir. Kolbadakı qarışığı 30-40 dəqiqə müddətinə çalxalamaq üçün cihaza yerləşdiririk (yadda saxlamaq lazımdır ki, bütün əməliyyatlar soyuqda aparılır). Bu müddət ərzində ribonukleotidin (RND) dağılması baş verir, RNT su məhluluna, ayrılmış proteid hissə isə fenola keçir. İndi qarışığı sentrifüqanın soyudulmuş şüşə sınaq qablarına yerləşdirib 40-50 dəqiqə sentrifüqa əməliyyatı aparırıq (3000 g; $t^0=0-3,0^0C$). Əməliyyat başa çatdıqda sınaq şüşələrindəki qarışıq 4 qata ayrılır. Birinci (yuxarıdan) su qatında RNT və polisaxaridlər yer tutur. Onu ehtiyatla şpris vasitəsilə sorub soyuğa yerləşdirirlər. İkinci qat özlüdür, ağ rəngdədir, pH=6,0-da fenol təsirindən parçalanmayan dezoksiribonukleoproteid (DNP) və fenolda həll olmayan zülaldan ibarətdir. Bu qat həmçinin ehtiyatla sorulur, onu ikiqat həcmli pH-ı 6,0 olan fenolla qarışdırır və oraya eyni miqdar 0,14 M NaCl əlavə edilir. Alınan qarışığı 30-40 dəqiqə çalxalayıb 35 dəqiqə müddətində sentrifüqalaşdırırıq (3000 g, $t^0=0-3,0^0C$). Götürdüyümüz ikinci qat özü 4 hissəyə ayrılır. Yuxarıdakı su qatını sorub yuxarıdakı birinci su qatı ilə (birinci sentrifüqadan sonrakı) qarışdırırıq. İkinci həll olmuş DNT-proteid qatını yenə sorub aşağıdakı yolla RNT qalıqlarından təmizləyirik. Həmin qatı pH-ı 6,0 olan fenolla (ikiqat həcm ilə) və eyni miqdar 0,14 M NaCl -la 30-40 dəqiqə çalxalayıb yenə 5000 g və $0-3^0C$ -də sentrifüqadan keçiririk. Bu dəfə tərkibinə DNT-proteid daxil olan ikinci qatı götürüb qalanını atırıq.

Birinci sentrifüqalaşdırmadan sonrakı 4 qatın üçüncüsü (fenol qatı) tərkibinə fenolda həll olan zülallar daxildir. Onu da atırıq.

İlk sentrifüqalaşdırmanın dördüncü qatı ən ağır fraksiyadır, az miqdar DNT və denaturasiya olunmuş zülalların toxuma qalıqlarından təşkil olunmuşdur. Bu çöküntünü ikinci qatda olduğu kimi işləyib həll olmuş RNT-li su qatını ilkin su qatı məhlulu ilə birləşdiririk. Qalan hissə atılır.

Beləliklə, biz RNT və DNT-ni ayıraraq iki məhlul (xam konsentrat) aldıq. Həmin məhlullarla işləyib NT-ni ayırma əməliyyatını davam etdiririk.

c) Birləşdirilmiş, sentrifüqalaşdırılmış su məhlulundan RNT-ni ayırmaq üçün onun həcmi ölçüb oraya pH-ı 6,0 olan su ilə doydurulmuş fenoldan, ölçülmüş həcmi yarısı qədər əlavə edirik. Bu, məhluldan zülalları tamamilə ayırmaq üçün edilir. Sonradan artıq tanış olduğumuz sxem üzrə işləyirik: qarışıq 30 dəqiqə çalxalanır, sonra 40 dəqiqə sentrifüqadan keçirilir (3000 g). Yuxarıdakı RNT-si olan su qatını sorub qalanını atırıq.

Alınan həcmi ölçüb RNT-ni ölçülmüş həcmə 1,5 miqdarı qədər etanol vasitəsilə çökdürürük. (Məhlulda etanolun sonuncu qatılığı 55-60% olur). Məhlul 60 dəqiqədən çox olmayaraq soyuqda saxlanılır (çox saxladıqda RNT çökə bilər) və sonra 20 dəqiqə 3000 g -də sentrifuqadan keçirilir. Su-spirit qatını atıb çöküntünü az miqdar su ilə həll edirik. Həll olmayan hissəni sentrifuqa və ya süzmə yolu ilə ayırmaq lazımdır. Su hissədən isə, 4 M NaCl ilə bilavasitə yüksəkpolymerli RNT-ni təmiz halda çökdürürük. Bunun üçün su məhluluna ikiqat həcmdə 4 M NaCl töküüb ən azı 2,5-3 saat soyuducuda saxlayırıq. Bu mərhələdə işi saxlayıb məhlulu soyuducuda səhərə qədər saxlamaq olar. Yüksəkpolymer RNT çöküntüsünü aşağıpolymer çöküntüsündən ayırmaq (10 dəqiqə 3000 g) onu suda həll edir və bu vəziyyətdə sonrakı analizlər üçün işlədilir. RNT-ni kristallik halda almaq zərurəti meydana çıxdıqda onu məhluldan ikiqat həcmdə etanol vasitəsilə çökdürür, tam çökməsi üçün 1 saat soyuducuda saxlayır, sonra sentrifuqadan keçirib spirtdən azad edir, çöküntünü durulaşdırılmış (85%) spirtlə, ardınca susuz spirt və efirle yuyur (hər yuduqdan sonra 10 dəqiqə 3000 g-də sentrifuqadan keçirməklə) və sonra çöküntü eksikatora kalsium xlorid üzərində qurudulur. Çöküntü soyuducuda saxlanılır. RNT-nin su məhlulunu da bir neçə gün soyuducuda bir neçə damla toluol tökməklə saxlamaq olar.

ç) DNT preparatını almaq üçün aralıq mərhələdə alınmış su qatından istifadə olunur. Burada DNT proteinləşmiş vəziyyətdə toplanmışdır. Zülal hissədən artıq bizə məlum olan üsulla - tərkibinə paraaminosalisil turşusu daxil olan və pH-ı 8,3 olan su ilə doymuş fenolla çalxalamaqla azad olmaq mümkündür. Fenolu 80-100 ml miqdarında əlavə edib qarışığı eyni miqdar su ilə durulaşdırır və 30-50 dəqiqə müddətində ehtiyatla çalxalayır. Zülal hissə ayrılır, DNT isə suya keçir. Burada işi dayandıraraq preparatı soyuducuda səhərə qədər saxlamaq olar.

DNT-ni ayırmaq üçün qarışıq sentrifuqadan keçirilir (6000 g-də 60 dəqiqəyə qədər). Nəticədə üç qat alınır. DNT yığılmış yuxarı su qatını ehtiyatla sorub soyuq yerə yerləşdiririk. Qalan iki qat 30 dəqiqə 80-100 ml 0,14 M NaCl məhlulu vasitəsilə ekstraksiya edib məhlulu həmin şəraitdə sentrifuqadan keçiririk. Yenə su hissə ayrılır ki, onu birinci ilə birləşdiririk. pH-ı 8,3 olan fenolla təkrar işləməklə tam deproteinləşmə əldə edilir. Fenolu daha sonra 100 ml efir üzərinə 5-10 damla buzlu sirkə turşusu tökməklə alınan turşulaşdırılmış məhlulun ikiqat həcmi vasitəsilə ayırırlar. Efir qatını bölücü qıf vasitəsilə ayıraraq atırlar (qarışıq qatlara pis ayrılırsa yenidən onu sentrifuqadan keçirmək olar). Efirle iş 2-3 dəfə təkrar olunur.

Su məhlulundan DNT-ni spirtlə saplar halında ayırırlar. Spirti opalessensiya - (məhlulda sayrışma) itənə qədər davam edirlər. Qarışığı bir saatdan çox olmamaqla soyuducuda saxlayıb sentrifuqadan keçirir, çöküntünü ardıcıl olaraq 85%-li etanol, susuz etanol, dietil efiri ilə işləyib onu eksikatora kalsium xlorid üzərində qurudub soyuducuya yerləşdirirlər. Çox təmiz preparat almaq zərurəti olduqda onu 0,14 M natrium xlor məhlulunda təkrar çökdürmə yolu ilə ayırmaq lazımdır. Bu iş böyük həcmə görə və tələbdən kifayət qədər yüksək ixtisas qabiliyyəti tələb etdiyindən böyük ixtisas təcrübəsi dərslərində və ya sərbəst iş şəklində yerinə yetirilə bilər.

İŞ 32 a

MARMURA ÜSULU İLƏ NT-nın AYRILMASI

VƏ TƏMİZLƏNMƏSİ

(DNT və RNT-ni bir-birindən ayırma)

Əvvəlki işdə olduğu kimi burada da NT ilə zəngin olan heyvan toxumaları (qara ciyər, dalaq, beyin) istifadə olunur. İşlədilən qab və reaktivlər maksimum soyudulmalıdır.

Reaktivlər:

1. Duz məhlulu 0,15 M NaCl, 0,015 M natrium-sitrat, 0,01 M EDTA (natrium-etilendiamino-tetraasetat) (əlavələr 33)
2. Xloroform:izoamil spirti 24:1 (əlavələr 34)
3. Etil spirti:efir 1:1 (əlavələr 35)
4. Etil spirti 96 % və 70% (əlavələr 36)
5. Efir

Ləvazimat:

1. xini həvəng və ya şüşə stəkanlı homogenizator
2. 37⁰ C-də termostat
3. Sentrifuqa (sınaq şüşəli)
4. Sentrifuqatı sormağ üçün incə rezin borulu şlanq
5. Şüşə stəkanlar, şüşə tıxacla bağlanan kolbalar, şüşə çubuqlar, pipetkalar
6. 57 %, 2%-li xlor turşusu HClO₄ (əlavələr 37)
7. 0,5 N NaOH (əlavələr 38)
8. 1,0 və 5 N KOH (əlavələr 39)
9. 20 % natrium dodesilsulfat (əlavələr 40)
10. 5 M natrium xlorid (əlavələr 41)

İşin gedişi

Soyuq şəraitdə doğranmış toxumanı çini həvəngə və ya homogenizatorun şüşə stəkanına yerləşdirib oraya tökülən 30-50 ml duz məhlulunda eyni cinsli özlü kütlə alınana qədər əzirik (homogen vəziyyətə salırıq). Homogenləşdirmə prosesində soyudulmuş duz məhlulunu stəkana əvvəlki həcmi nəzərə almaqla cəmi 100 ml-ə çatana qədər əlavə edirik. Alınmış özlü homogenat üzərinə 10-12 ml 20 %-li natrium dodesilsulfat əlavə edilir natrium dodesilsulfatın homogenatda son qatılığı 2% olmalıdır.

Həvəng və ya homogenatı stəkanla birlikdə temperaturu 37°C olan termostata yerləşdiririk. 25-30 dəqiqədən sonra NT-nı ayırmaq olar.

NP (nukleoproteid) kompleksinin dissosiasiyası üçün homogenatı 0,5 M NaCl məhlulu ilə aşağıdakı yolla işləmək lazımdır. Homogenat olan qaba son qatılıq həddi 1 M olan 20-25 ml 0,5 M NaCl əlavə edib qarışığı bir neçə dəqiqə ərzində yaxşı qarışdırıb NT-nın ekstraksiya əməliyyatına başlayırlar. Homogenatı şüşə tıxaclı Erlenmeyer kolbasına (0,5 l) keçirib üzərinə 24:1 nisbətində olan xloroform: izoamil spirtinin 2,5 həcmi olmaqla (330-340 ml) məhlulunu tökdükdən sonra NT-nı ayırmaq üçün çalxalayıcıya 15-20 dəqiqə müddətində yerləşdiririk. Bu müddət keçdikdən sonra qarışığı şüşə stəkanlarda 30-40 dəqiqə 2500 dövrə/dəqiqə rejimində sentrifuqadan keçiririk. Bu zaman sentrifuqanın sınaq şüşələrində çöküntü üzərindəki məhlul təbəqələrə ayrılır. Yuxarıda NT, ortada zülallar, aşağı xloroform qatında isə lipidlər və digər ağır komponentlər yer tutur. Sentrifuqatın yuxarı qatını ehtiyatla incə rezin borulu şpris vasitəsilə sorub kolbaya keçirir və orada xloroform: izoamil spirti qarışığında şəffaf məhlul alınana qədər daha 2-3 dəfə əməliyyatı təkrar edirik.

NT-nın şəffaf məhlulu yavaş-yavaş 96%-li soyudulmuş etil spirtinin ikiqat həcminə tökülür, spirt dairəvi hərəkətlə şüşə çubuq vasitəsilə qarışdırılır. NT-lar incə spirallar şəklində çökür ki, onları şüşə çubuq vasitəsilə soyudulmuş 70 %-li etil spirti ilə stəkana keçiririk (bütün qablar da soyudulmalıdır). NT 2-3 dəfə təzə spirtə keçirilir və nəticədə 1:1 nisbətindəki spirt:efir qarışığı ilə yuyulub, havada otaq temperaturunda qurudulur. NT-nın quru preparatını bağlı qabda soyuducuda uzun müddət saxlamaq olar.

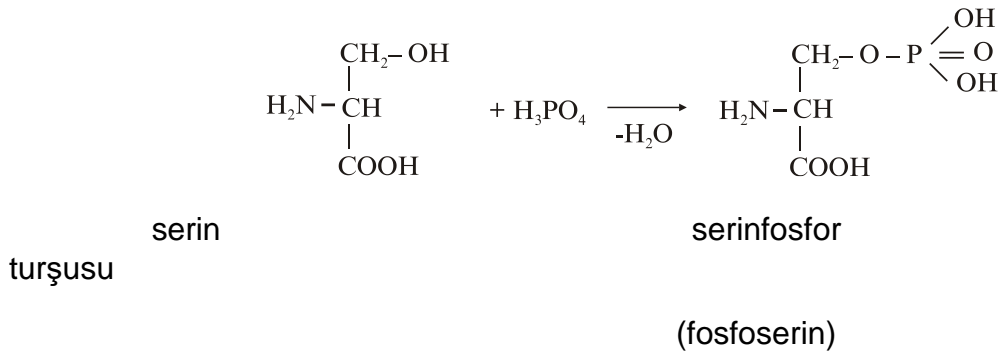
DNT və RNT-ni bir-birindən ayırmaq üçün 20-30 mq quru NT preparatını 10-15 ml 0,5 N NaOH -da həll edib 37°C-də 18-20 saat saxlayırıq. Məhlulu soyudur, soyudulmuş 57%-li xlor turşusu ilə neytrallaşdırır və sonuncunun qatılığını 2%-ə qədər artırırıq (0,5-1 ml neytrallaşmaya +0,5 ml 2% qatılıq almaq üçün). DNT bu zaman çökür, RNT məhlulda qalır. DNT-ni sentrifuqa vasitəsilə ayırırlar (15-20 dəqiqə 3000 dövrə/dəqiqə rejimində). Çöküntü ardıcıl olaraq 2% HClO₄ (2-3 dəfə), 7%-li spirt (2-3 dəfə), 1:1 nisbətindəki spirt:efir və efirə yuyulur. Hər dəfə DNT çöküntüsünü sentrifuqa vasitəsilə yığmaq lazımdır. Bütün məhlullar soyudulmalıdır. DNT-nin təmiz preparatını havada qurudub soyuducuda saxlayırıq.

MÜRƏKKƏB ZÜLALLAR (proteidlər)

Fosfoproteidlər

Fosfoproteidlər – mürəkkəb zülallar olub, qeyri-zülali prostetik qrupu fosfat turşusu qalıqından ibarətdir (0,5-0,9%).

Fosfoproteidlərə südün kazeinogeni, yumurta sarısının vitellini, vitini, balıq kürüsünün ixtulini və s. aiddir. Pepsin, fosfoqlükomutaza, fosforilaza kimi fermentlər də fosfoproteidirlər. Kimyəvi nöqtəyi nəzərdən bütün fosfoproteidlər zülal molekulunda fosfor turşusunun əmələ gətirdiyi efir əlaqələri ilə səciyyələnirlər. Fosfor turşusu adətən serin və treoninin oksid qrupu ilə efir əlaqəsi yaradır. Məsələn: fosfoserin zülal molekulasında digər amin turşuları ilə peptid əlaqəsi vasitəsilə birləşir. Ən çox fosfat turşusu zəncirdə qlutamin turşusu ilə yanaşı duran serinin hidrosil qrupu ilə birləşir.



Fosfoproteidlər inkişaf edən orqanizm üçün mühüm maddələr sırasına daxildir. Məsələn, südün kazeinogeni körpəyə lazım olan bütün əvəz edilməz amin turşularına və fosfor turşusuna malikdir (0,9%). Kazeinogen südün tərkibində həmçinin kalsium duzuna malikdir. Beləliklə körpə orqanizm skeletinin inkişafı üçün lazım olan Ca və P elementlərini alır. Hər iki element fizioloji optimal nisbətdə süddə olduğundan orqanizm tərəfindən asan mənimsənilir.

İŞ 33

SÜDDƏN KAZEINOGENİN AYRILMASI

Kazeinogen süddə həll olan kalsium duzu şəklindədir. O süddə turş xassəli olub, suda həll olan anionlar şəklində olur. Kazeinogenin izoelektrik nöqtəsi pH 4,7-dədir. Turşulaşdırdıqda süd çürüyərək kazeinogen halında çöküntü verir. Turşunun artıq dərəcədə əlavə edilməsi zülalın yenidən yüklənməsinə, çöküntünün həll olmasına səbəb olar. Süd turşusu həmçinin südü çürüdür və reaksiyanın turş xassəli olmasına səbəb olur. Pepsinin təsiri ilə süd çürüyərək kazeinogenin kazeinə çevrilməsi ilə nəticələnir. Kazeinin kalsium duzu, əksinə, suda həll olmur. Qatıq və digər süd məhsullarında çürümüş halda kazeinogen vardır.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Süd
2. Qatı sirkə turşusu
3. 1%-li mis sulfat
4. 10%-li NaOH
5. Millon reaktivi (əlavələrə bax, 11)
6. Fol reaktivi (əlavələrə bax, 5)
7. Qıflar
8. Filtrlər
9. Sınaq şüşələri

10. Şüşə çubuq

11. 2 ml-lik pipetka

İşin gedişi

2 ml süd üzərinə eyni miqdar distillə suyu əlavə edib qatı sirkə turşusu vasitəsilə kazeinogen çökdürülür. Çöküntü süzülür və filtdə 2 dəfə distillə edilmiş su ilə yuyulur. Filtdən çöküntünün bir hissəsini şüşə çubuqla götürüb onunla zülallara aid rəngli reaksiyaları (biuret, fol, millon) aparırıq.

İŞ 33 a

KAZEINOGEN (VƏ YA KAZEIN DANƏLƏRİNDƏ)

FOSFATIN MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

Kazeinogen qələvi ilə hidroliz edildikdə fosfat və zülal ayrılır. Fosfat spesifik reaksiya vasitəsilə molibden reaktivi ilə müşahidə edilə bilər.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Süddən və ya narın əzilmiş kazein danələrindən ayrılmış kazeinogen
2. 10%-li NaOH
3. 10%-li H₂SO₄
4. Molibden reaktivi (əlavələrə bax, 16)
- 5) Fenolftalein (0,5%-li spirt məhlulu)
- 6) 1%-li CuSO₄

İşin gedişi

Kazeinin hidrolizi – sınaq şüşəsinə kazeinogen və ya hazır reaktiv şəklində narın əzilmiş 30 mq kazein götürüb üzərinə 2 ml 10%-li NaOH tökürük. Asbest setka üzərində hava soyuducusu vasitəsilə 10-15 dəqiqə qaynadıb, soyuduqdan sonra hidroliz məhsullarına aid reaksiyaları aparırıq.

a) Zülalın müşahidə edilməsi

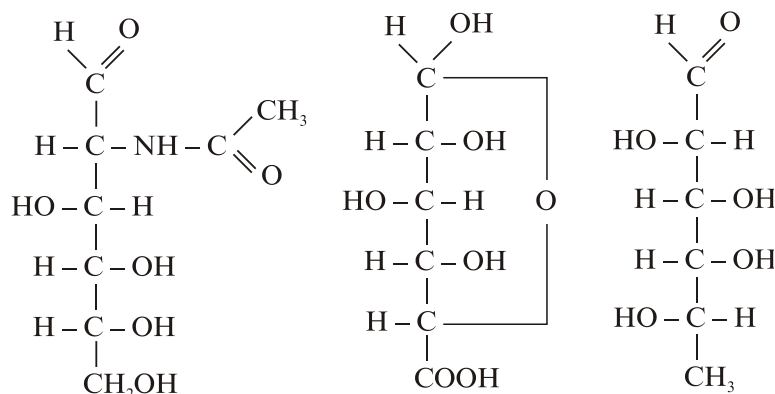
Zülal biuret reaksiyası ilə aşkar edilir. Sınaq şüşəsinə üç damla hidrolizat, bir damla 1% CuSO₄ götürüb qarışdırdıqda çəhrayı-bənövşəyi rəng alınır.

b) Fosfatın müşahidə edilməsi

Yerdə qalan hidrolizat 10 %-li HNO₃ vasitəsilə bir-iki damla fenolftaleinin iştirakı ilə rəng itənə qədər turşulaşdırılır və quru sınaq şüşəsinə süzülür. Beş damla filtratdan götürüb üzərinə 20 damla molibden reaktivi əlavə etdikdən sonra bir neçə dəqiqə qaynadılır. Məhlul sarı rəngə boyanır. Soyutduqda hidrolizatda fosfatın olmasını göstərən sarı rəngli fosfor-ammoniumun molibdenat çöküntüsü aydın müşahidə edilir.

Qlikoproteidlər

Qlikoproteidlər – mürəkkəb zülallar olub, prostetik qrupunun tərkibinə şəkərlər və onların törəmələri daxildir. Bəzi qlikoproteidlərin prostetik qrupu neytral və ya turş mukopolisaxaridlərdən ibarətdir. Mukopolisaxaridlər hidroliz zamanı qlükozamin, asetil-qlükozamin, qalaktozamin verir. Turş mukopolisaxaridlərə həmçinin qlukuron turşusu və sulfat turşusu daxildir. Neytral mukopolisaxaridlərin tərkibinə qalaktoza, mannoza, L-fukoza və sial turşuları daxildir.



N - asetilqlükozamin
fukoza

D - qlükuron

L -

Turş mukopolisaxaridlərə gialuron turşusu, xondriotinsulfat turşusu və heparin də aiddir. Qeyd etmək lazımdır ki, qlikoproteidlər orqanizmdə dayaq və qoruyucu funksiya daşımaqla demək olar ki, bütün toxumalarda və mayələrdə mövcuddur; onlar musinlər və ya mukoidlər adlanırlar.

İş 34

YUMURTA ZÜLALINDA ŞƏKƏR

KOMPONENTİNİN AŞKAR EDİLMƏSİ

Quru sınaq şüşəsinə beş damla 10%-li yumurta zülalı götürüb orada Moliş reaksiyasını aparmalı (karbohidratlar böl-məsinə bax). Sınaq şüşəsinin dibində qırmızı rəng əmələ gəlir (reaktivlər: 34a işə bax).

İŞ 34a

TÜPÜRCƏKDƏN MUSININ AYRILMASI

VƏ ŞƏKƏR KOMPONENTİNİN AŞKAR EDİLMƏSİ

Musinin tərkibində şəkər komponentini Moliş reaksiyası ilə müşahidə etmək olar.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Tüpürcək
2. Qatı H₂SO₄
3. 1%-li timol (spirtdə)
4. Qatı sirkə turşusu,
- 5-8. 32 sayılı işdə 7-11-ə bax.

İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə 2 ml tüpürcək yığıb üzərinə 4-5 damla qatı sirkə turşusu əlavə edilir. Turşunun artıq miqdarında çətin həll olan musin çökür. Sınaq şüşəsindəki məhlul ehtiyatla boşaldılır. Yerdə qalan musin kütləsi ilə Moliş reaksiyası aparılır. Bunlardan əlavə, mukoidləri aortadan ayırmaq, qan zərdabında sial turşularını təyin etmək və s. işlər aparmaq olar.

I BÖLMƏYƏ AİD SUALLAR

1. Zülal nədir?
2. Rəngli reaksiyaları sayın. Zülalın rəngli reaksiyaları hansı kimyəvi qrupların olması ilə əlaqədardır?
3. Amin turşuları zülal molekulunda necə birləşmişlər? Hansı reaksiya ilə əsas əlaqə növünü aşkar etmək olur?
4. Tərkibində benzol halqası olan amin turşularını yazın. Hansı reaksiya vasitəsilə onları aşkar etmək olar?
5. Tərkibində kükürd olan amin turşularını yazın. Hansı reaksiya vasitəsilə onları aşkar etmək olar?
6. Ninhidrin reaksiyasını səciyyələndirin.
7. Zülalın rəngli reaksiyalarının əhəmiyyəti nədir?
8. Zülalın çökməsi nə ilə əlaqədardır?
9. Hansı temperaturlarda zülalları çökdürmək olar?
10. İzoelektrik nöqtəsi nə deməkdir?

11. Turş və qələvi xassəli zülallara misal göstərin.
12. Qayıdan və qayıtmayan çökməyə misallar göstərin.
13. Zülalın denaturasiyası nə deməkdir?
14. Zülalların duzlaşdırılması nə deməkdir?
15. Çökdürmə reaksiyalarının təbabət elmi üçün əhəmiyyətinə misal göstərin.
16. Zülalları necə təsnifata bölürlər?
17. Zülalların denaturasiyası daha hansı reaktivlərlə aparıla bilər? Onların təbabət üçün əhəmiyyətli olanlarını təsvir edin.
18. Su məhlulunda zülalın yükü nədən ibarətdir?
19. Alkoloïd reaktivləri ilə zülalın çökdürülməsini səciyyələndirin.
20. Zülalın hidrolizi nədir və onu necə aparmaq olar?
21. Hidrolizin sonunu necə müəyyən etmək olar?
22. Formol titrləmə yolu ilə karboksil qruplarının təyin olunmasının əhəmiyyəti nədir?
23. Amin turşularının xromatoqrafik üsulla ayrılmasını necə aparmaq olar?
24. Xromatoqrafiya üsulunun mahiyyəti nədir?
25. Xromatoqrafiyanın hansı növləri mövcuddur?
26. Mürəkkəb zülalların təsnifatını yazın.
27. Mürəkkəb zülallarla sadə zülalların fərqi nədir?
28. Fosfoproteidlərə misal göstərin. Hansı reaksiya ilə onları aşkar etmək olar?
29. Qlikoproteidlərə misal göstərin. Hansı reaksiyalarla onları aşkar etmək olar?

II BÖLMƏ

FERMENTLƏR

Bütün canlı aləmə məxsus və kimyəvi təbiətinə görə üzvi maddələr sırasına daxil olan fermentlər – bioloji katalizatorlardır. Onların bir qismi (100-dən çox) yalnız zülal molekulundan ibarət olduğundan sadə fermentlər, qalan minlərlə fermentlər zülal hissə (apoferment, feron) və qeyri zülal təbiətli maddələrdən (prostetik qrup, apon) təşkil olduğundan mürəkkəb fermentlər adlanırlar. Prostetik qrup kimi burada zülalla birləşən maddələr vitaminlər, metallar, mineral maddələr və s. ola bilər. Prostetik qrup suda asanlıqla dissosiasiya edərək ayrılırsa, onlar fransız biokimyəvi Qabriel Bertranın təklifi ilə koferment adlandırılmışdır.

Canlı orqanizmlərdə baş verən elə bir biokimyəvi proses yoxdur ki, orada fermentlər iştirak etməsin. Təbiidir ki, zülallara məxsus bütün xassələr fermentlərə də aiddir. Onların katalitik aktivliyi zülal molekulunun nativ quruluşunu saxlamaq dərəcəsi və bəzi digər amillərdən asılıdır. Külli miqdarda ərzaq məhsullarının, içkilərin, müasir biotexnoloji proseslərin, bioistehsalın təşkili fermentlərsiz mümkün deyil. Ən incə, dəqiq kimyəvi analiz metodları, gen mühəndisliyi, immobilizə olunmuş fermentləri tətbiq etməklə ferment elektrodları, süni ferment gücləndiriciləri, reagentsiz arasıkəsilməz analiz, tibbi diaqnostika, gümüşsüz fotoqrafiya və onlarla belə digər proseslərdə fermentlər tətbiq olunur.

Fermentlərin termolabil olması, bəzi amillərə qarşı həssaslığı onların öyrənilməsi və tətbiqini çətinləşdirsə də müasir fermentologiya (enzimologiya) bir çox sahələrdə mühüm nailiyyətlər əldə etmişdir.

Hər bir ferment üçün temperatur optimumu mövcuddur. Bu temperaturda onlar maksimal aktivlik göstərilir. Fermentlərin çoxu 40-50°C intervalında maksimal aktivliyə malikdir. Lakin elə fermentlər var ki, intakt hüceyrədə 80°C-də belə aktivlik göstərilir. Fermentlərin digər xassəsi onların müvafiq pH-da maksimal aktivliyə malik olmalarıdır. Optimal pH dəyişdikcə aktivlik zəifləyir və ya dayanır (inaktivləşmə).

Fermentlərin spesifikliyi onların digər bir xassəsidir. Spesifiklik mütləq, qrup spesifikliyi, stereospesifiklik və s. növlərə bölünür.

Fermentlərin katalitik aktivliyi müxtəlif amillərin təsiri ilə güclənə və ya zəifləyə bilər. Katalitik aktivliyi artıran maddələr aktivator, azaldanlar isə inhibitor adlanır. Beləliklə fermentin aktivliyi dəyişkən kəmiyyət olub müxtəlif amillərdən asılıdır.

Fermentlərin həm təsiri, həm də aktivliyinin öyrənilməsi dolayı yolla aparılır. Məsələn, vahid zaman ərzində təsire məruz qalan substrat (S) nə qədər azalır və ya reaksiyanın məhsulu nə qədər toplanır. Başqa bir yanaşmada, toxumalardan alınmış məhlul halındakı süzüntüyə özlülüyün dəyişməsinin dərəcəsi, polyarizasiya müstəvisinin fırlanması, elektrik ötürücülüüyü, işığın sınma dərəcəsi, səthi gərilmə və s. göstəricilər əsasında aktivlik haqda nəticə çıxarılır. Belə yanaşma fiziki metodlardır. Əksər hallarda süzüntü alıqda toxumanın bütövlüyü pozulduğundan, alınan rəqəmlər nisbi olduğundan, müasir üsulların tətbiqi daha dəqiq nəticələr verir. Bu üsullara misal vakuum-infiltrasiya metodudur ki, burada toxumanın bütövlüyü pozulmur. Fermentin aktivliyi müxtəlif vahidlərlə ifadə olunur. Reaksiyanın sürəti (V) zaman vahidində reaksiyaya daxil olan molekulların sayı ilə ölçülə bilər.

Digər bir göstərici standart vahiddir (optimal temperatur, pH, substratın qatılığı şəraitində bir mikromol (mkM) S-ı 1 dəqiqədə çevirən fermentin (E) miqdarı). Standart vahid az tətbiq olunur. Fermentin aktivliyi 1 mq zülalla və ya çevrilən S-zülal miqdarı ilə ölçülə bilər.

Fermentin aktivliyi müasir dövrdə **Katal** adlanan vahidlə ölçülür. 1 katal $6 \cdot 10^7$ standart vahiddir. Yəni müvafiq şəraitdə substratı 1 mol/saniyə sürəti ilə çevirən fermentin miqdarı ilə aktivlik ifadə olunur.

Adi laboratoriya şəraitində yerinə yetirilməsi çox çətin olan daha müasir metodlar mövcuddur. Onlar fermenti kristallik halda təmizləyib almaq üçün tətbiq olunur. Buraya fraksiyalaşdırma, gel-filtrasiya, affın xromatoqrafiya, xromatoqrafiyanın digər müasir üsulları və onların kombinasiyası, immobilizə olunmuş fermentlər əsasında metodlar aiddir.

FERMENTLƏRİN XASSƏLƏRİ

Fermentlərin hamısına məxsus olan termolabillik, təsir spesifikliyi müvafiq pH-da optimal təsir göstərməsi, böyük sürətlə reaksiyaları aparmaq qabiliyyəti və s. xassələrini müşahidə etmək üçün aşağıdakı reaksiyalarla tanış olaq.

İŞ 35

AMILAZA VƏ PEPSİN FERMENTLƏRİNİN TEMPERATUR OPTIMUMUNUN MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

Fermentə təsir göstərən istilik amilinin müddəti, fermentin qatılığı, onun mühiti (in vitro yoxsa in vivo) və digər amillərdən asılı olaraq onun aktivliyi arta və ya azala bilər və onun denaturasiyaya uğraması da müvafiq temperatur intervalında baş verə bilər. Vant-Hoff qanununa tabe olaraq reaksiyon mühit temperaturunun 10°C artması reaksiya sürətini iki dəfə artırır. İnsan orqanizmi üçün normal temperatur $35-37^{\circ}\text{C}$ həddində olduğundan burada əksər fermentlərin optimumu ehtə həmin rəqəmə uyğun gəlir. Temperaturun $40-42^{\circ}\text{C}$ -ə qədər yüksəlməsi fermentativ reaksiyaların sürətini artırır. Reaksiya sürətinin artma effektini orqanizmdən kənar reaksiyon mühitdə də müşahidə etmək olar. Lakin temperaturun sonrakı artımı fermentin denaturasiyasına səbəb olur və reaksiya sürəti kəskin aşağı düşərək dayanır. Temperaturun aşağı düşməsi isə reaksiya sürətini azaltsa da, hətta 0°C -də belə denaturasiya baş vermir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Təzə hazırlanmış ağız suyu (kimyəvi stəkana yığılmış ağız suyunun qatılığını 5-10 dəfə su ilə azaldaraq tənizdən süzməli)
2. 1%-li nişasta (əlavələr 17)

3. Lüqol reaktivi (əlavələr 18)
4. Süd-asetat qarışığı (əlavələr 19)
5. Hazır mədə şirəsi preparatı
6. Qaynayan su hamamı
7. Temperaturu 40°C olan su hamamı
8. Buz
9. Termometr

İşin gedişi

İki ştativin hər birinə 4 ədəd üzərində sıra ilə rəqəmlər yazılmış sınaq şüşələrini yerləşdirib 1-ci iki sınaq şüşəsinə 4 ml 1%-li nişasta, o birinə süd-asetat məhlulu götürürük. Sınaq şüşələrini qaynayan su hamamına yerləşdiririk. İki digər sınaq şüşəsinə eyni miqdarda həmin maddələri töküüb bu dəfə temperaturu 40°C olan su hamamına qoyuruq. Üçüncü cüt sınaq şüşələrini həmin reaktivlərlə ştativdə otaq temperaturunda (20-23°C), dördüncü nişasta və süd-asetat məhlullu 2 sınaq şüşəsinə isə içərisində buz olan qabda saxlayırıq. Bütün 4-cüt sınaq şüşəsi 10-15 dəqiqə müvcud olduğu şəraitdə qalır və həmin temperaturu qəbul edir. Sonra nişasta olan sınaq şüşələrinə 1 ml ağız suyu (hər şəraitdəki bir-bir 4 sınaq şüşəsi) süd-asetat məhlulu olan o biri sınaq şüşələrinə isə 0,3 ml mədə şirəsi preparatı töküüb həmin temperaturlarda 20-30 dəqiqə saxlayırıq. Nişasta olan birinci sınaq şüşəsində amilaza təsirinin gedişini lüqol reaktiv vasitəsilə izləyirik. Bunun üçün filtr kağızı zolağı üzrə sıra ilə nöqtələrə 1 damla hər sınaq şüşəsindən məhlul damlayıb həmin nöqtələrə 1 damla lüqol reaktivi mikropipetka ilə ehtiyatla yerləşdirilir. Ləkələrin rənginə əsasən nişastanın amilaza təsirindən hidroliz dərəcəsi haqda nəticə çıxarmaq olar. Nəzərdə tutmaq lazımdır ki, nişasta tərkib hissələrinə parçalandıqca lüqol reaktivi onunla rəng əmələ gətirməyəcək (karbohidratlar bəhsinə bax). Süd-asetat məhlulu olan sınaq şüşələrində pepsinin təsirini müşahidə etmək üçün həmin ferment vasitəsilə kazeinogenin kazeinə çevrilməsi nəticəsində onun əmələ gəlməsi və toplanmasını müşahidə etmək olar.

FERMENTLƏRİN SPESİFİKLIYI

Fermentlərin əsas xassələrindən biri onların yüksək dərəcədə spesifikliyidir. Fermentlər kataliz etdikləri reaksiyanın tipinə və substrata görə spesifikdirlər. Bəzi fermentlər mütləq spesifikdirlər, yəni yalnız bir substratı kataliz edirlər. Fermentlərin bu dərəcədə spesifikliyi, fermentlərin tərkibinə daxil olan yalnız bəzi qrupların ferment substrat kompleksi əmələ gətirməsi ilə əlaqədardır.

Fermentlərin aktiv mərkəzlərini təşkil edən amin turşuları, fəzada müəyyən vəziyyətdə olurlar ki, bu da ferment substrat kompleksinin əmələ gəlməsində bilavasitə rol oynayır.

Ağız suyunun tərkibində olan amilaza yalnız nişastanı hidroliz edir, disaxaridlərə isə heç bir təsir göstərmir.

Maltaza maltozanın hidroliz olunmasını sürətləndirdiyi halda, başqa disaxarid - saxarozaya təsir göstərmir.

Saxarozanın tərkibində sərbəst aldehid və keton qrupu və ya sərbəst qlikozid hidroksili olmadığına görə Trommer reaksiyasını vermir. Saxarozaya özünün tərkib hissələrinə qlükoza və fruktozaya parçalandıqdan sonra Trommer reaksiyasını verir (karbohidratlar bəhsinə bax).

Reaktiv və ləvazimat:

1. Durulaşdırılmış ağız suyu (5 dəfə)
2. 1%-li saxarozaya məhlulu
3. 1%-li nişasta məhlulu
4. 10%-li NaOH
5. 1%-li CuSO₄
6. Termostat və ya su hamamı (38°C)
7. 10 ml-lik silindr

İşin gedişi

İki sınaq şüşəsinin hər birinə 5 damla durulaşdırılmış ağız suyu tökülür. Birinciyə 10 damla 1%-li nişasta, ikinciyə isə 10 damla 1%-li saxarozaya əlavə olunur. Hər iki kolba 10 dəqiqə termostatda və ya su hamamında saxlanılır və sonra Trommer reaksiyası aparılır. Yuxarıdakı qayda üzrə cədvəl tərtib olunur və nəticələr orada qeyd olunur.

İŞ 36

MÜHİT REAKSIYASININ (pH) FERMENTİN

AKTİVLİYİNƏ TƏSİRİ

Fermentlərin aktivliyi, mühitdəki hidrogen ionlarının qatılığından kəskin asılıdır. Hər bir ferment pH-ın çox az həddində, nisbətən aktivdir. Bu zona optimum (məəyyən ferment üçün) pH adlanır (cədvəl 6). pH-ın hansı istiqamətdə dəyişməsindən asılı olmayaraq (optimumdan) fermentin aktivliyi kəskin azalır. Optimum pH-ın dəyişməsi, fermentin zülal və prostetik qrupları arasındakı rabitənin qırılmasına və həmçinin fermentlə substrat arasındakı rabitəyə də təsir göstərməsinə səbəb olur.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 100 dəfə durudulmuş ağız suyu
2. 0,5%-li nişasta

3. 0,2 M Na₂HPO₄
4. 0,1 M limon turşusu məhlulu
5. 0,2% KJ məhlulunda 0,1% yod məhlulu
6. 1%-li NaCl məhlulu
7. Mikropipetka
8. Termostat və ya su hamamı (38°C), 1 ml-lik iki pipetka

Cədvəl 6

Bəzi fermentlər üçün optimum pH-ın həddü

Ferment	PH
pepsin	1,5–2,5
tripsin	8,0–9,0
tüpürcək amilazası	6,9–7,0
bağırsağ saxarazası	6,3
mədə şirəsinin lipazası	6,0
pankreas lipazası	7,0–8,5
katalaza	7,0

İşin gedişi

Yeddi sınaq şüşəsinə cədvəldə göstərilən (1-7) nisbətdə 0,2 M Na₂HPO₄ və 0,1 M limon turşusu tökülür. Bununla 5,6–8,0 pH-larla bufer məhlulu alınır. Hər sınaq şüşəsinə 10 damla 1%-li NaCl, 10 damla 0,5%-li nişasta və 10 damla ağız suyu əlavə olunur. Sınaq şüşələri 5-10 dəqiqə müddətində termostatda və ya su hamamında 38°C-də saxlanılır.

Cədvəl 7

Mühitin pH-nın amilazanın aktivliyinə təsiri

Sınaq şüşəsi №-si	0,2 M məhlulun miqdarı, ml-lə	0,1 M limon turşusu məhlulünün miqdarı,	pH	0,5 M nişasta və 1%-li məhlulünün miqdarı, ml-lə	Ağız suyunun miqdarı, ml-lə	Yodla rənglənmə

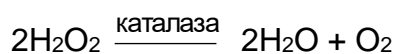
		<i>m/l-ə</i>				
1	0,58	0,42	5,5	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	damla	damla	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	damla	damla	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	damla	damla	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	
				damla	damla	
				10	10	
				damla	damla	
				10	10	
				damla	damla	

Bundan sonra sınaq şüşələrinin hərəsinə 1 damla yod məhlulu (0,2%-li yod məh- da 1%-li yod məh.) əlavə olunur, qarışdırılır və rənglər müşahidə olunur. Rəngə əsasən amilazanın aktivliyinə uyğun gələn pH müəyyən olunur.

İŞ 37

KATALAZANIN AKTİVLİYİNİN TƏYİNİ

Katalaza mürəkkəb ferment olub, zülal hissədən və tərkibində dəmir atomu olan prostetik qrupdan ibarətdir. Katalaza hidrogen-peroksidi suya və molekulyar oksigenə parçalayır və orqanizmin zəhərlənməsinin qarşısını alır.



Reaktiv və ləvazimat:

1. 100 ml-lik kolbalar
2. 100 ml ölçü kolbaları
3. Pipetkalar
4. Byuretka
5. Çini həvəngdəstə
6. CaCO₃
7. 10%-li H₂SO₄

8. 0,1 N KMnO₄

Üsulun prinsipi. Katalazanın aktivliyinin təyini ferment preparatının təsiri nəticəsində parçalanan H₂O₂-nin miqdarının hesablamasına əsaslanır və KMnO₄-lə titrləməklə tapılır.

İşin gedişi

Təzə bitki materialından 5 q götürüb çini həvəngdəstədə şüşə qırıntılarının və 0,3 q CaCO₃-in iştirakı ilə əzilir, üzərinə 20 ml su əlavə olunur, ölçü kolbasına keçirilib, distillə edilmiş su ilə cizgiyə qədər doldurulur. 30-40 dəqiqə sonra qarışıq ya filtr kağızı ilə süzülür və ya sentrifuqada ayrılır. Təmiz filtratdan və ya supernatantdan iki hissə (20 ml) götürüb 100 ml-lik kolbaya keçirilir. Kolbalardan birindəki məhlulu inaktivləşdirmək üçün o 2-3 dəqiqə qaynadılır, soyudulur. Hər iki kolbaya 20 ml su və ya 3 ml 1%-li hidrogen-peroksid əlavə olunur və 20-30 dəqiqə müddətində inkubasiya olunur. Inkubasiya qurtardıqdan sonra hər iki kolbaya 4-5 ml 10%-li H₂SO₄ əlavə olunur və 0,1 N KMnO₄-lə zəif-çəhrayı rəng alınana qədər (rəng 1 dəqiqə müddətində itməməlidir) titrlənir. Kontrol və təcrübə variantları arasındakı titr fərqi əsasən inkubasiya dövrü ərzində parçalanan H₂O₂ (1 q bitki materialına görə) aşağıdakı tənliklə tapılır.

$$x = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 1}{N}$$

burada: x – katalazanın milliqram H₂O₂ ilə 1 q bitki materialının inkubasiya dövründə parçalanmasına əsasən aktivliyi,

a – inaktivləşdirilmiş kolbadakı məhlul üçün 0,1 N KMnO₄, ml-lə,

b – təcrübə variantına sərf olunan 0,1 N KMnO₄-nin miqdarı, ml-lə,

T – titrə düzəliş, 1,7–1 ml 0,1 N KMnO₄-ə uyğun gələn H₂O₂-nin milliqramlarla miqdarı,

N – bitki nümunəsinin miqdarı, q-la.

Öyrəndiyimiz işdə aşağıdakı reaksiya gedir:



İŞ 38

PEROKSIDAZANIN AKTİVLİYİNİN TƏYİNİ

Peroksidaza fermentinin təsiri nəticəsində müxtəlif fenollar və aromatik aminlər oksidləşirlər. Bu ferment bitki və heyvan orqanizmində geniş yayılmışdır. Nisbətən peroksidaza ilə zəngin olan bitkilərdən qırmızı turpu və kökümeyvələri göstərmək olar.

Reaktiv və ləvazimat:

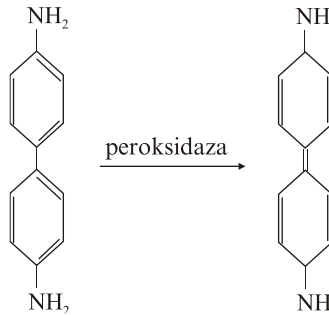
1. Kolorimetr
2. 10 və 25 ml-lik kolbalar

3. Pipetka
4. 3 dəqiqəlik qum saati
5. Çini həvəngdəstə
6. Spirt (xalis)
7. 30%-li NaOH
8. 3%-li H₂O₂
9. Benzidinin 1%-li buzlu sirkə turşusunda məhlulu
10. 0,01 N KMnO₄

Peroksidazanın benzidini oksidləşdirərək diiminodifenil əmələ gəlməsinə əsaslanır.

İşin gedişi

Nümunədən (qırmızı turp) 1 q götürüb, həvəngdə kvarts qumunun iştirakı ilə əzilir və həcmi 10 ml olan kolbaya keçirilir. Kolba su ilə cizgiyə qədər doldurulur, filtr kağızı ilə süzülür. 25 ml-lik kolbaya 2 ml 1%-li benzidin məhlulu, 2 ml 3%-li H₂O₂ və 1 ml hazırlanmış ferment preparatı əlavə olunur, qarışdırılır və 3 dəqiqə saxlanılır. 3 dəqiqədən sonra kolbaya 10 ml 30%-li NaOH əlavə olunur və qarışdırılır. Kolbada əmələ gəlmiş rəngli çöküntü 10 ml spirt vasitəsi ilə həll olunur, sonra standart (birtipli) məhlula nisbətən kolorimetrlənir.



Standart məhlul 25 ml-lik ölçü kolbasında hazırlanır. Kolbaya 2 ml 1%-li benzidin və 3 ml 0,01 N KMnO₄ məhlulu əlavə olunur. 10 dəqiqədən sonra (yaşıl rəng tünd qırmızı rəngə çevrildikdən sonra) 10 ml 30% NaOH və 10 ml spirt əlavə olunur.

Nəticənin hesablanması. Peroksidazanın aktivliyi vahidi olaraq, peroksidaza preparatının 3 dəqiqə müddətində standart məhlula görə əmələ gətirdiyi rənglənmə götürülür. Peroksidazanın aktivliyi (C) qəbul olunmuş vahidə görə 1 q bitki toxumasında aşağıdakı tənlik üzrə hesablanır.

$$C = \frac{h_1 \cdot 10}{h_2}$$

Burada, h_1 – nümunə məhlulu təbəqəsinin qalınlığı,
 h_2 – yoxlama məhlulu təbəqəsinin qalınlığıdır.

İŞ 39

ASKORBİNATOKSIDAZANIN AKTİVLİYİNİN

TƏYİNİ

Bu ferment oksidoreduktazalar sinfinə aid olub, askorbin turşusunun dehidroaskorbin turşusuna çevrilməsini kataliz edir. Askorbinatoksidazanın tərkibinə mis elementi daxil olur (vitaminlər bəhsinə bax). Balqabaq, kahı, lobyə bitkiləri nisbətən askorbinatoksida ilə zəngindir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Termostat
2. Çini həvəngdəstə
3. 25 və 30 ml-lik ölçü kolbaları
4. 100 ml konusvari kolba
5. 0,01 N KJ_2O_8
6. 10%-li KJ,
7. 0,001 N $Na_2S_2O_3$
8. 1%-li nişasta
9. Fosfat buferi (0,015 M, pH-7,0)
10. Askorbin turşusu (1 ml-də 1 mq askorbin turşusu olan məhlul)

Üsulun prinsipi. Askorbinatoksidazanın aktivliyi askorbin turşusunun miqdarının yodometrik üsulla təyininə əsaslanır.

İşin gedişi

20 q balqabaq bitkisi çini həvəngdə 10-15 ml pH=7 olan 0,15 M fosfat buferi məhlulununun iştirakı ilə əzilir. 50 ml-lik enliboğaz kolbaya keçirilir və fosfat bufer məhlulu ilə cizgiyə çatdırılır. Sonra məhlul filtrlə süzülür və filtratdan ferment preparatı kimi istifadə olunur.

Preparatdan iki 50 ml-lik ölçü kolbasının hər birinə 10-ml tökülür və bunlardan biri bir-iki dəqiqə qaynadılır (fermentin inaktivləşdirilməsi üçün) və sonra soyudulur. Hər iki kolbaya 10 ml askorbin turşusu əlavə edib termostatda, 37°C temperaturda 30 dəqiqə müddətində inkubasiya olunur. Sonra hər iki kolba qaynama temperaturuna qədər qızdırılır. Soyudulduqdan sonra su ilə cizgiyə qədər doldurulur. Şəffaf məhluldan iki 100 ml-lik konusvari kolbanın hər birinə 10-ml məhlul tökülür və üzərinə 5 ml 10% KJ, 10 ml

5%-li HCl, 10 damla 1%-li nişasta və 10 ml 0,01 N KJO₃ məhlulları əlavə olunur. 5 dəqiqədən sonra məhlullar 0,001 N Na₂S₂O₃ məhlulu ilə göy rəng itənə qədər titrlənir.

Nəticənin hesablanması. Nəticə aşağıdakı tənliyə əsasən hesablanır:

$$x = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,1088}{N}$$

burada: x – askorbinatoksidazanın aktivliyi

a – təcrübə variantı üçün sərf olunmuş 0,001 N Na₂S₂O₃ miqdarı, ml-lə,

b – kontrol üçün sərf olunmuş 0,001 N Na₂S₂O₃ miqdarı, ml-lə,

T – titrə düzəliş,

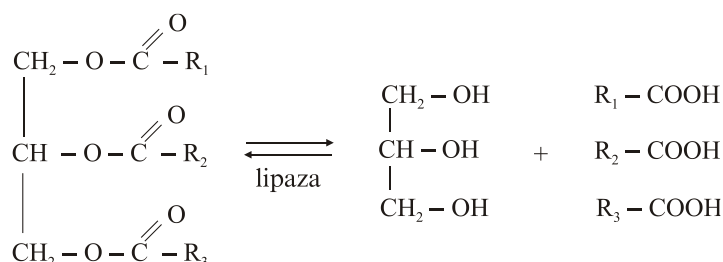
0,088 – 0,001 N Na₂S₂O₃-ə müvafiq olan askorbin turşu- sunun ml-lə miqdarı,

N – nümunənin qr-la miqdarı.

İŞ 40

LIPAZANIN AKTİVLİYİNİN TƏYİNİ

Lipaza qliserinlə yağ turşuları arasındakı mürəkkəb efir rabitəsinin parçalanmasını kataliz edir:



R₁; R₂; R₃ yüksək molekullu yağ turşularının radikallarını göstərir.

Lipaza fermenti bütün bitki orqanizmlərində yayılmışdır. Yağla zəngin olan bitkilərdə lipazanın miqdarı nisbətən çox olur. Müxtəlif bitkilərdən alınmış lipazalar bir-birindən aktivlikləri ilə, pH-ın və temperaturun optimumlarına və s. xassələrinə görə fərqlənirlər. Lipaza unu, yarmanı saxlayarkən (xüsusən yüksək rütubətdə və yüksək temperaturada) onun tərkibində olan yağları parçalayır və nəticədə onların turşuluğu artır ki, bu da unun və yarmanın tez xarab olmasına, keyfiyyətin aşağı düşməsinə səbəb olur.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 10 sm diametrdə həvəng-dəstə
2. 100 ml-lik və ağzı kip tıxac ilə bağlanan konusvari kolba
3. Təmiz günəbaxan yağı
4. Asetat buferi məhlulu, pH 4,7 (əlavələrə bax, 20)

5. Etil spirti
6. Efir
7. Toluol
8. Timolftaleinin və ya fenolftaleinin 1%-li spirt məhlulu
9. 0,1 N NaOH

Lipazanın aktivliyinin təyini, onun təsiri nəticəsində yağların parçalanmasından alınan yağ turşularını qələvi ilə titrləməyə əsaslanır.

İşin gedişi

İki nümunə götürüb (3 q) həvəngdəstədə kvars qumunun iştirakı ilə əzilir və 100 ml-lik ağzı kip örtülən konusvari kolbaya keçirilir. Həvəngdəstə 2-3 dəfə az miqdar (2-3 ml) su ilə yuyulur və kolbaya 1 ml təmiz günəbaxan yağı əlavə olunur. Lipazaların çoxunun optimum pH-nın 4,5-5,0 olduğunu nəzərə alaraq kolbaya 5 ml pH=4,7 olan asetat buferi məhlulu (pH=4,7 olan asetat bufer məhlulunu hazırlamaq üçün bir həcm 1 N CH₃COOH-la bir həcm 1 N CH₃-COONa qarışdırılır) və bir neçə damcı toluol əlavə olunur. Kolbadakı məhlul mexaniki qarışdırıcıda qarışdırılır və 20-24 saat müddətində termostatda 30°C-də və ya otaq temperaturunda saxlanılır. Bu müddət ərzində lipazanın təsiri nəticəsində yağlar parçalanır.

Təcrübi variantla yanaşı olaraq, kontrol variantda (iki nümunə) götürülür. Lakin termostata qoymamışdan əvvəl fermentin inaktivləşdirilməsi üçün 3-5 dəqiqə müddətində qaynadılır. 20-24 saatdan sonra konusvari kolbalara 25 ml spirt və 15-25 ml efir əlavə olunub qarışdırılır. Məhlul sükunət halını aldıqdan sonra 0,1 N NaOH-la 0,5 ml 1%-li timolftaleinin spirtdəki məhlulunun iştirakı ilə titrlənir.

Təmiz yağın hazırlanması – 300 qr günəbaxan yağı qıfda 2%-li NaOH məhlulu ilə qarışdırılır və sakitləşdikdən sonra qələvi məhlul tökülür. Qıfda distillə edilmiş su ilə bir neçə dəfə yuyulur (fenolftaleinlə mənfi reaksiya alınana kimi) və qıfdan CaCl₂ buraxılaraq qurudulur.

Nəticənin hesablanması. Lipazanın aktivliyi 10 q toxuma görə 0,1 N NaOH-la ifadə olunur. Hesablama aşağıdakı tənliklə aparılır:

$$x = \frac{(a \cdot T - b \cdot T) \cdot 10}{N}$$

burada: x – lipazanın aktivliyi

a – təcrübi variant üçün sərf olunmuş 0,1 N NaOH-ın miqdarı, ml-lə,

b - kontrola sərf olunan 0,1 N NaOH-ın miqdarı, ml-lə,

T – 0,1 N NaOH üçün titrə düzəlişi,

N – nümunənin çəkisi, qramla

II BÖLMƏYƏ AID SUALLAR

1. Fermentlər nədən təşkil olunmuşlar?
2. Koferment və prostetik qrup nə deməkdir?
3. Fermentlərin hansı mühüm xassələrini bilirsiniz?
4. Fermentləri materialdan ayırarkən hansı qaydalara əməl edilməlidir?
5. Amilazanın iştirakı ilə nişastanın parçalanması reaksiyasını yazın.
6. Fermentlərin spesifikliyini hansı təcrübə ilə müəyyənləşdirmək olar?
7. pH fermentin fəallığına necə təsir göstərir?

Təcrübəni təsvir edin

8. Katalaza və peroksidaza fermentlərinə aid təcrübələri təsvir edin.
9. Askorbinatoksidaza fermentinin fəallığını təyin etmək üçün təcrübə necə aparılır?
10. Lipaza fermenti nə kimi təsirə malikdir?

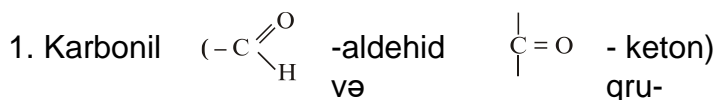
III BÖLMƏ

KARBOHİDRATLAR

Karbohidratlar təbiətdə, xüsusən bitkilər aləmində ən geniş yayılmış maddələrdir. "Karbohidrat" termininin meydana çıxması bu sinfin nümayəndələrinin öyrənilməsi zamanı ilkin tədqiqatlarda C, H və O elementləri nisbətlərinin C və suyun (H₂O) birləşməsinə uyğun gəlməsi ilə əlaqədardır və C_n(H₂O)_n formulu ilə ifadə oluna bilər. Sonradan məlum oldu ki, karbohidratların hamısı bu formulaya uyğun gəlmir. Buna misal ramnoza (C₆H₁₂O₅), 2-dezoksi-D-riboza (C₅H₁₀O₄), D-diqitoksoza (C₆H₁₂O₄), nadir və şaxələnmiş şəkildə olan streptoza (C₆H₁₀O₅) və s. ola bilər. Sonuncu şəkər molekuluna 2 aldehid və bir metil qrupu daxildir. Metil qrupu diqitoksozada da var. Bundan başqa karbohidratlara aid olmayan sirkə turşusu (C₂H₄O₂) yuxarıdakı formulaya uyğun gəlir. Beləliklə karbohidrat məfhumu tarixi ad kimi saxlanılmışdır.

Çoxatomlu spirtlərin aldehid və ketonları və onların polimerləri olan karbohidratlar energetik, plastik, müdafiə, dayaq, tənzimləyici, ehtiyat və s. kimi mühüm funksiyalar daşıyan maddələr olmaqla yanaşı, orqanizmlərin həyat fəaliyyətini təmin etməkdə əhəmiyyətinə görə heç də zülallardan geri qalmırlar.

Sadə şəkərlər və ya monosaxaridlər (C₃–C₁₀ aldo və keto şəkərlər) hidroliz olunurlar. Onlardan α-D(+)-qlükopiranoza təbiətdə sərbəst halda rast gəlinən ən davamlı şəkər kimi istisna olmaqla, qalanları maddələr mübadiləsi proseslərində I və II dərəcəli mürəkkəb şəkərlərdən əmələ gəlir. Fotosintez prosesi təbiətdə mövcud olan karbohidratların əsas mənbəyidir. Bundan başqa çoxlu digər biosintez yolları mövcuddur. Onlardan yağlar və zülallardan başlayan qlükoneogenezlər mühüm yer tutur. I dərəcəli poliozalar (oligoşəkərlər) və ondan çox monozadan ibarət II dərəcəli poliozalar (həqiqi qlikanlar, homo və heteropolisaxaridlər) hidrolizə (qeyri fermentativ və fermentativ) məruz qalaraq monomerləri olan müxtəlif sadə şəkərləri əmələ gətirirlər. Karbohidratlar xüsusən monozalar labil birləşmələrdir və üç əsas tip çevrilmələrə məruz qala bilərlər.



punun iştirakı ilə gedən oksidləşmə-reduksiya, əvəzolunma reaksiyaları, aldon turşularının alınması və s.

2. Hidroksil (spirt—OH) qruplarının iştirakı ilə gedən reaksiyalar. Buraya müxtəlif efirlərin karbonil törəmələrinin, uron turşularının, qlikozidlərin, anhidridlərin, dezoksişəkərlərin alınması ilə əlaqədar olan reaksiyalar aiddir.

3. Karbon skeletinin dəyişməsi ilə əlaqədar olan reaksiyalar. Buraya monoza skeletinin uzanması, qısalması, izomerlər əmələ gətirməsi, müxtəlif törəmələr və üzvi maddələrin digər sinifləri nümayəndələrinin əmələ gəlməsi və s. misaldır. Monoşəkərlərin reaksiyon qabiliyyəti funksional qruplardan, konformasiyalardan, reaksiyon mühitdən və s. asılıdır. Aşağıda nəzərdən keçirəcəyimiz keyfiyyət reaksiyaları əsasən karbon skeletinin dəyişməsi (3) karbonil qrupunun iştirakı (1) və bəzi digər spesifik xassələrə əsaslanır.

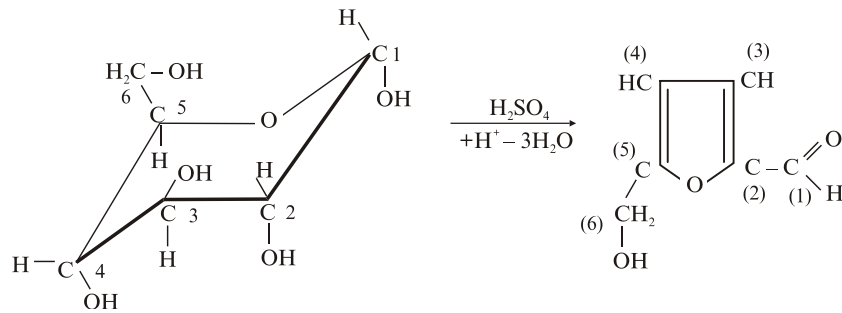
İŞ 41

MONOZALARA AID REAKSIYALAR

PODOBEDOV-MOLİŞ REAKSİYASI

(α -NAFTOLLA REAKSİYA)

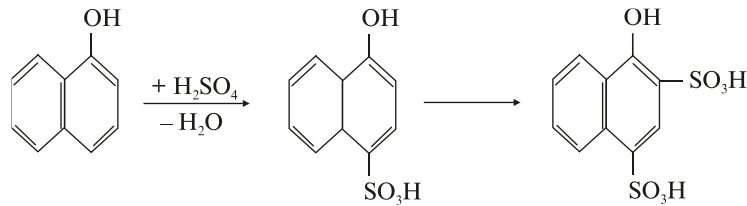
Bu reaksiya şəkləri müşahidə etmək üçün həssas reaksiyalar sırasına daxildir. Onun vasitəsilə mürəkkəb maddələrin, məsələn zülalların tərkibində olan şəkər komponentlərini də aşkar etmək olur. Reaksiyanın mahiyyəti ondan ibarətdir ki, şəkər komponenti, məsələn qlükoza, mineral turşu (bizim halda sulfat turşusu) təsirindən 3 molekul su itirərək oksimetilfurfurola, ksiloza və ya arabinoza furfurola çevrilirlər. Öz növbəsində α -naftol sulfat turşusu mühitində sulfolaşır və furfurool və ya oksimetilfurfurola xinoid təbiətli rəngli məhsullar əmələ gətirir



α - D - qlükopiranoza

oksimetilfurfurol

Yuxarıda α -D-qlükopiranoza ən davamlı konformer şəklində (C-1 konformasiya - Chair ingiliscə "kürsü" sözünün baş hərfi) yazılmışdır.



α - naftol
(1- oksinaftalin)

4 - sulfo - α -
naftol (1 - oksi -
4 sulfonaftalin)

2,4 - sulfo - α -
naftol (1 - oksi -
2,4 sulfonaftalin)

Reaktivlər:

1. 5%-li monosaxarid (qlükoza, fruktoza, mannoza, qalaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza və s.)
2. 1%-li α -naftol (spirtdə)

3. Qatı H₂SO₄

4. Timolun 1%-li spirtli məhlulu

İşin gedişi

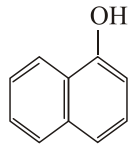
İki sınaq şüşəsinin birinə 5 ml yoxlanılan monosaxarid məhlulu digərinə eyni miqdarda distillə suyu (yoxlama variantı) götürüb hər iki sınaq şüşəsinə 1 ml α-naftol və şüşənin divarı ilə ehtiyatla 3 ml qatı H₂SO₄ əlavə etməli. Çalışmaq lazımdır ki, sınaq şüşələri silkələnməsin. Onlar ştativdə bir qədər qalır, turşu dibə keçir və bir neçə dəqiqədən sonra iki məhlulun sərhəddində qırmızı-bənövşəyi rəngli həlqə aydın görünür. Yoxlama variantında belə rəng əmələ gəlmir.

Sınaq şüşəsinə saxaroza (0,1%), zülal məhlulu götürüb təcrübəni bu dəfə timolla təkrar edin və nəticələri dəftərə qeyd edin.

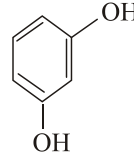
İŞ 42

TOLLENS NÜMUNƏSİ

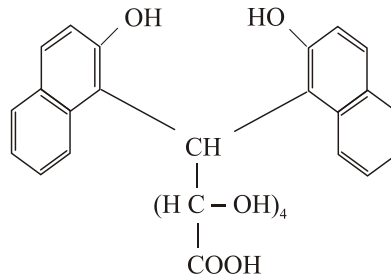
Naftorezorsinlə karbohidratların əmələ gətirdiyi rənglərin xarakterinə görə onları biri-birindən ayırmaq mümkündür. Adətən Tollens nümunəsini uron turşularını müşahidə etmək üçün tətbiq edirlər. Sonuncu spirt qrupunun karboksil qrupuna qədər oksidləşməsi nəticəsində müvafiq monozadan əmələ gələn uron turşusu adətən naftorezorsinlə bənövşəyi rəngli məhlul əmələ gətirir.



α - naftol



rezorsin



Dinaftolqlükuzonat

Adətən şəkərlər oksidləşdiricilərə qarşı qələvi mühitdə həssasdırlar. Çünki qələvi mühitdə şəkər molekulası asanlıqla enollaşır. Karbon skeleti izomerləşə və ya parçalana bilər. Aldon turşuları (aldehid qrupunun karboksilə qədər oksidləşməsi zamanı alınan turşular) və poliollar da şəkərlərə aid olan bəzi xarakterik reaksiyaları verir.

Şəkərlərin həmçinin aromatik sistemlərlə kondensə reaksiyasına daxil olması və rəngli məhsullar əmələ gətirməsi artıq bizə məlumdur. Elə qlükuron turşusu da naftorezorsinlə kondensə olunub dinaftelglükuronat əmələ gətirir.

Qlükuron turşusu naftorezorsinlə bənövşəyi, maltoza və qalaktoza göy-yaşıl rəngləri əmələ gətirirlər.

Reaktivlər:

1. 5%-li qlükoza, fruktoza, mannoza, qalaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza, dezoksiriboza məhlulları

2. Etanolda 2%-li naftorezorsin (əlavələr 21)

3. Qatı xlorid turşusu (HCl)

4. Benzol

İşin gedişi

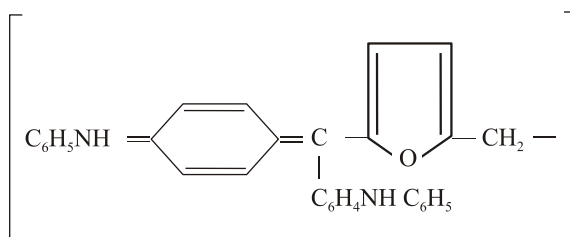
7 sınaq şüşəsinə növbə ilə bərabər miqdarda (5 ml) qlükoza, fruktoza, mannoza, qalaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza məhlullarını götürüb hər birinə 0,5 ml naftorezorsin və 1 ml qatı xlorid turşusu əlavə edərək onları qızdırır və 1-2 dəqiqə qaynadırıq. Sınaq şüşələrini soyudub onlara eyni miqdar mövcud həcm qədər benzol əlavə edir və qarışdırırıq. Məhlullar tədricən ayrılarkən əmələ gələn rəngləri müşahidə etməli və dəftərdə qeyd etməli. 2-ci, fruktoza olan şüşədə rəng əmələ gəlmir. Qlükoza, mannoza, qalaktoza göy-yaşıl, ramnoza bənövşəyi, arabinoza və ksiloza isə tünd göy rəng verir.

Tollens sınağını apararkən benzol əvəzinə efir də götürmək olar.

Bu nümunə vasitəsilə ayrıca götürülmüş monoza məhlullarından başqa, tərkibinə hər hansı bir monoza daxil olan maddə və ya onun su ekstraktında monozaları da müşahidə etmək olar.

Digər bir təcrübə vasitəsilə qarışıqda reduksiya qabiliyyətinə malik olan şəkərləri aşkar etmək mümkündür. Bunun üçün əvvəlcədən tərəzidə 0,005 q dinitrobenzol çəkib (analitik tərəzidə çəkmək daha əlverişlidir) onu sınaq şüşəsinə keçirir və 5-6 damla efir vasitəsilə həll edirik. Sınaq şüşəsini mantar tıxacla bağlamaq olar. Sonra həmin sınaq şüşəsinə tədqiq olunan maddədən narın halda az miqdar və ya ekstraktdan 1-2 ml töküüb qarışıqda 2 ml su və 2-3 damla 1,0 N NaOH məhlulu əlavə edərək şüşəni qızdırırıq.

Sınaq şüşəsində aşağıdakı quruluşlu müvafiq rəngli birləşmənin əmələ gəlməsi (adətən tünd-bənövşəyi) mühitdə reduksiya qabiliyyətinə malik şəkərin olduğunu göstərir.



İŞ 43

KETOHEKSOZALARA MƏXSUS

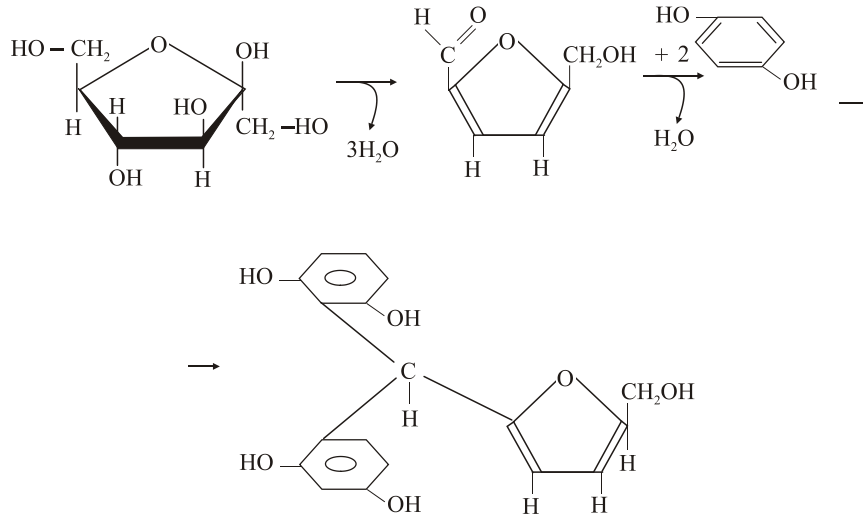
SELIVANOV REAKSIYASI

Fruktoza və digər ketoheksoza məhlullarını xlorid turşusunda həll edilmiş rezorsin məhlulu ilə birlikdə qızdırdıqda qırmızı-albalı rəngli birləşmə alınır. Kondensasiya məhsulunun əmələ gəlməsi üçün fruktoza turşu mühitdə 3 molekul su itirərək oksimetil-furfurola çevrilməlidir (41 sayılı işə bax).

Xüsusi mühit yaradıldıqda (müvafiq temperatur və pH mühitində) aldoheksozalar da bu reaksiyanı verirlər

Reaktivlər:

1. 5%-li fruktoza və qlükoza
2. Selivanov reaktivi (əlavələr 22)



Güman olunan alizarin tipli rəngli kompleks

İşin gedişi

İki sınaq şüşəsinin hər birinə 5 ml Selivanov reaktivi, birinə 1 ml fruktoza, ikinciyə həmin miqdarda qlükoza əlavə edib onları temperaturu $70-80^\circ\text{C}$ olan su hamamında 3-5 dəqiqə saxlayırıq. Birinci sınaq şüşəsində xarakterik rəng əmələ gəlir.

İŞ 44

KARBOHIDRATLARIN KARBAMIDLƏ

KEYFIYYƏT REAKSIYASI

Aldoza və ketozalar qatı xlorid turşusu mühitində karbamidlə (sıdık cövhəri) reaksiyaya girərək onları ayırmağa imkan verən müxtəlif rənglər əmələ gətirirlər.

Aldoheksozalar qırmızı, fruktoza isə firuzəyi-göy rəngli maddələrin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

Reaktivlər:

1. 5%-li fruktoza və qlükoza
2. Kristallik karbamid
3. Qatı xlorid turşusu

İşin gedişi

2 çini (oda davamlı) qaba 1,5-2 q kristallik sidik cövhəri kristalları yerləşdirib onu 2,5-3 ml xlorid turşusu vasitəsilə islatmalı. Birinci qaba 2 ml qlükoza, ikinciyə həmin miqdarda fruktoza töküb şüşə çubuq vasitəsilə qarışdırmaqla karbamid kristallarının həll olunmasına nail olmalı. Qabları qaynayan su hamamına yerləşdirib vaxtı qeyd edirik. İndi məhlulu qarışdırmadan 5-10 dəqiqə ərzində qablarda rəngli həlqənin əmələ gəlməsini müşahidə edirik. Qırmızı həlqə qlükozaya, ikinci qabdakı firuzəyi-göy rəng isə fruktozaya məxsusdur.

İŞ 45

PENTOZALARIN MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

(Bial reaksiyası)

Pentozalar turş mühitdə furfurool əmələ gətirir. Furfurool orsinlə dəmir xloridin cüzi miqdarının iştirakı ilə kondensə reaksiyasına girir. 0,25 q orsin 120 ml 25%-li xlorid turşusu məhlulunda həll edilir. Məhlula 5 damla FeCl₂ əlavə edilməlidir. Alınmış orsin reaktivinin 10 ml-nə 5 ml 0,1% hər hansı pentozaya məhlulu əlavə edib qarışığı 1-2 dəqiqə qaynatdıqda göy-yaşıl rəng alınır. Qeyd etmək lazımdır ki, bu reaksiyanı qlükoza ilə də aparmaq olar. Bu şəkərlər qəhvəyi rəng əmələ gətirir. Reaksiyanı arabinoza məhlulu ilə aşağıdakı qayda üzrə də aparmaq olar.

Sınaq şüşəsinə 1-2 ml orsin reaktivini töküb qaynama temperaturuna qədər qızdırırıq. Sınaq şüşəsinə dərhal 5-6 damla arabinoza şəkəri əlavə edib gözləyirik. 2-3 dəqiqədən sonra rəngin əmələ gəlməsi müşahidə edilir. Orsin reaktivini ilə arabinozanın sınaq şüşəsində qarışığı su hamamına da yerləşdirilə bilər. Bu zaman yaşıl rəng tədricən əmələ gəlir. Rəngin əmələ gəlməsi bu dəfə orsinlə oksimetilfurfuroolun yaşıl rəngli alizarin tipli rəngli boya alınması ilə əlaqədardır.

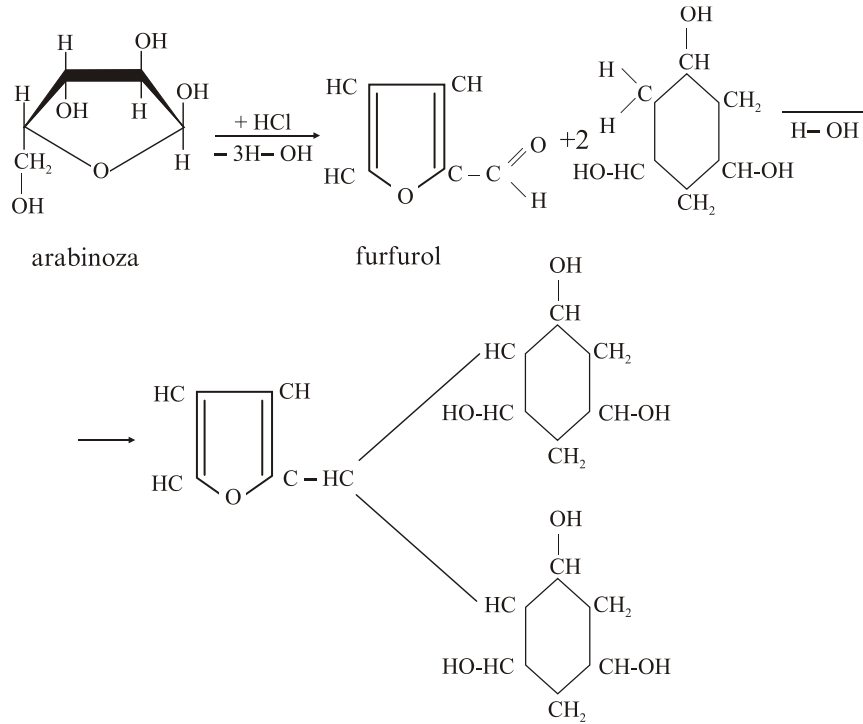
İŞ 46

FLOROQLYUSINLƏ REAKSIYA

Sınaq şüşəsinə 1-2 ml floroqlyusin töküb qaynayana qədər qızdırırıq. Sınaq şüşəsinə 5-6 damla arabinoza və ya başqa pentozaya məhlulu əlavə etdikdə dərhal çəhrayı və tədricən qırmızı rəng alınır. Qeyd etdiyimiz kimi mühitdə pentozaya olduqda

heksozalardan fərqli olaraq furfurool əmələ gəlir. Furfurool isə öz növbəsində floroqlyusinlə müvafiq rəng verir.

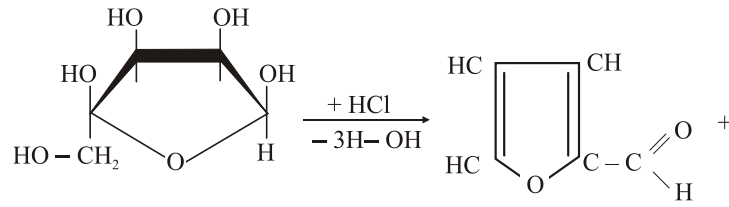
Reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir və qeyd edilən formullu rəngli kompleks əmələ gəlir.



İŞ 47

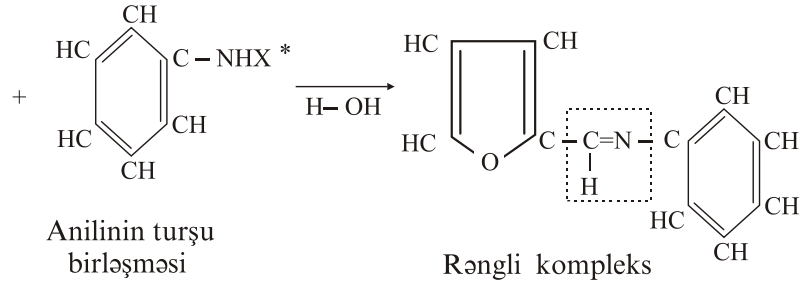
FURFUROLUN MÜŞAHİDƏ EDİLMƏSİ

Xlorid turşusunun təsirindən pentozalardan furfurool əmələ gəldiyini müşahidə etmək üçün sınaq şüşəsinə 1-2 ml pentoza məhlulu və eyni miqdar qatı HCl əlavə edilir və qaynadılır. Anilin asetat və ya anilin başqa turşularla birləşməsi məhlulunda isladılmış zolaq şəkilli filtr kağızını sınaq şüşəsindən ayrılan buxar üzərində saxladıqda, kağız zolağı qırmızı rəngə boyanır. Bu zaman ayrılan furfurool buxarları anilin birləşməsi ilə kondensə edərək qırmızı rəngli kompleks əmələ gətirir. Reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir.



ribofuranoza

furfurol



Anilinin turşu birləşməsi

Rəngli kompleks

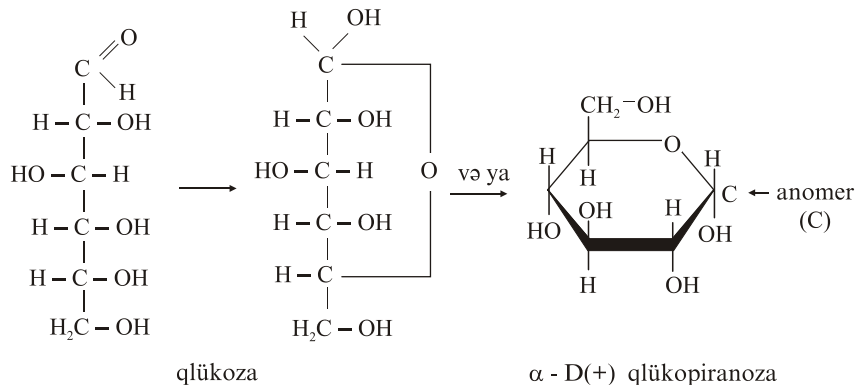
* X - burada müvafiq üzvi turşu qalığını göstərir və həmin qalıq reaksiyada bilavasitə iştirak etmir. Təcrübə zamanı rəngin əmələ gəlməsi – C = H – qrupunun yaranması ilə əlaqədardır.

KARBONİL QRUPU ÜZRƏ KARBOHIDRATLARA

MƏXSUS REAKSIYALAR

Sadə şəkərlərdə karbonil qrupu (sərbəst aldehyd və keton qrupları) yüksək reaksiya qabiliyyətlə malik olduğundan onlar ən müxtəlif kimyəvi çevrilmə reaksiyalarına məruz qala bilərlər. Sadə şəkərlərin məhlullarda tsiklik vəziyyətə (99%) düşməsinə nəzərə alsaq, yarımasetal və ya tautomer formada mövcud olan şəkərdə karbonil qrupunun anomer karbonu (iki oksigen atomu ilə birləşən yeganə "C"- atomu) izafi mənfi yükə ($-\delta$ yük) malik olaraq daha çox aktivləşmiş olur.

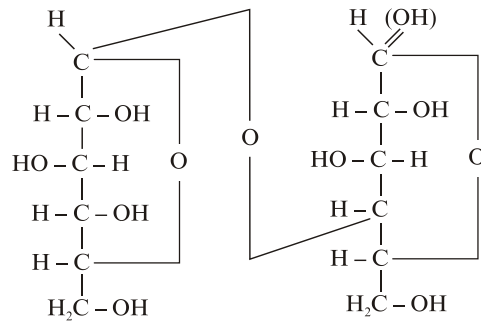
Karbonil qrupunun daxil ola bildiyi reaksiyalarına, əvəz olunma, oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları, aldol turşuları törəmələrinin alınması, lakton həlqəsinin açılması və s. misaldır.



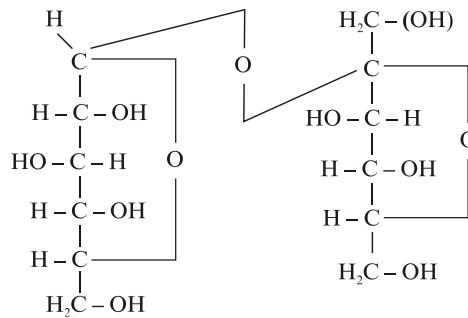
qlükoza

α -D(+) qlükopiranoza

Mühitdən asılı olaraq gedə bilən bu proseslərdən, oksidləşmə reaksiyaları qələvi mühitdə asanlıqla gedə bilər. Bu zaman karbonil qrupu karboksilə qədər oksidləşir və müvafiq aldol turşusu əmələ gəlir. Monosaxaridlərin bir sıra zəif oksidləşdiricilər vasitəsilə qələvi mühitdə və yüksək temperaturda asanlıqla oksidləşməsi onların miqdarca təyin olunması reaksiyalarında geniş tətbiq olunur. Belə oksidləşdiricilərə 2-

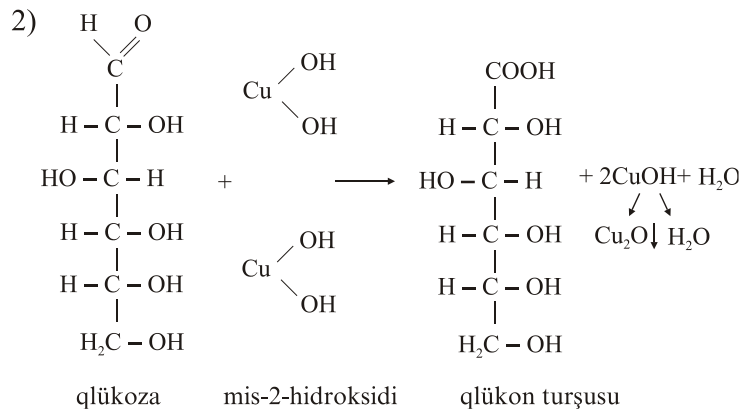
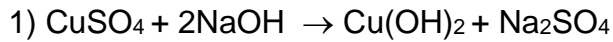


maltoza

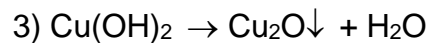


saxaroza

Trommerin təklif etdiyi bu təcrübədə CuSO_4 duzu qələvi mühitdə temperaturun təsirindən şəkərlərin iştirakı ilə mis 1 oksidə (Cu_2O) qədər reduksiya olunur. Reaksiya aşağıdakı kimi gedir:



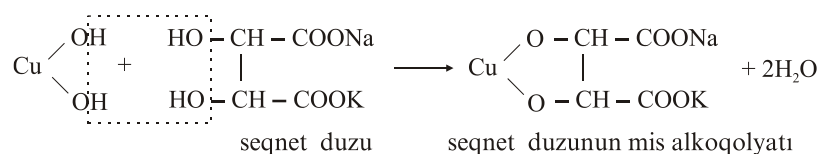
Qırmızı kərpici rəngli mis 1 oksidin əmələ gəlməsi, yoxlanılan şəkərin reduksiyaetmə qabiliyyətinə malik olduğunu göstərir. Trommer reaksiyasının çatışmayan cəhəti ondadır ki, mis duzunun artıq olması, qızdırarkən mis 2 oksidin əmələ gəlməsinə və mühitin bəzən qara rəngə boyanmasına səbəb olur.



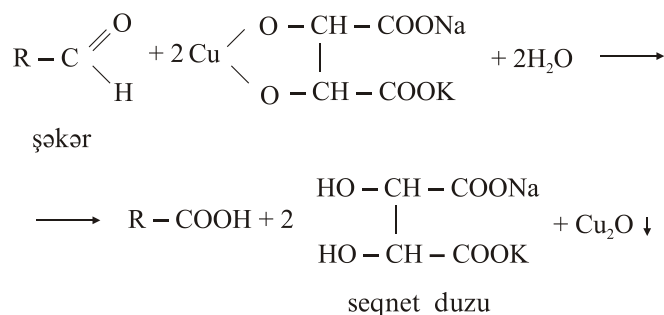
qara rəngdə

Bu hal qələvi çatışmadıqda da baş verir və ya qələvi çox götürüldükdə isə sarı rəngli CuOH alınır.

Xarakterik qırmızı kərpici rəng, yəni Cu₂O almaq üçün CuSO₄-lə yanaşı Felinq-2 mayesi adlanan stabilizatorndan istifadə edirlər. Felinq-2 mayesi seqnet duzunun qələvidə məhluludur. Stabilizatorun mühitə daxil olması ilə reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir. 1-ci reaksiyada əmələ gələn Cu(OH)₂ çöküntü verə bilmir və seqnet duzu ilə birləşib kompleks maddə əmələ gətirir. Reaksiya aşağıdakı kimi gedir.



Bu zaman əmələ gələn seqnet duzunun mis alkoqolyatı şəkərlə birləşərək aşağıdakı kimi reaksiyanın getməsinə səbəb olur və nəticədə seqnet duzu ayrılır.



Reaktiv və ləvazimat:

1. Ştativ, sınaq şüşələri və su hamamı
2. Pipetkalar
3. 5-10%-li qlükoza
4. 5-10%-li maltoza
5. 5-10%-li saxaroza
6. 10%-li NaOH
7. 1-5 %-li CuSO₄
8. Felinq-2 mayesi (əlavələrə bax, 23)
9. 10%-li NH₄ OH
10. Nilander reaktivi (əlavələrə bax, 24)

11. 5 %-li AgNO₃
12. 5 %-li mis asetat (CH₃COO)₂Cu)
13. 5 %-li natrium asetat
14. 1 %-li sirkə turşusu (CH₃COOH)

İşin gedişi

A. Trommer sınağı

Təmiz quru sınaq şüşəsinə 1-2 ml yoxlanılan şəkər məhlulu, şəkər məhlulu həcmnin yarısı qədər NaOH və 4-5 damla CuSO₄ məhlulu töküb qaz üzərində qaynaya qədər qızdırırıq. Əmələ gələn rəngi əyani görmək üçün sınaq şüşəsinə maili tutub məhlulun üst səthi qızdırılır. Nəzərdə tutmalı ki, həddən çox qızdırma və uzun müddətli qaynatma zamanı reduksiya etmə qabiliyyətinə malik olmayan şəkərlər də qismən hidrolizə uğrayıb müsbət reaksiya verə bilər. Əmələ gələn rəngi və onun səbəblərini izah etməli.

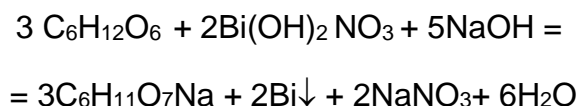
B. Felinq sınağı

Sınaq şüşəsinə 1 ml yoxlanılan şəkər məhlulu, 1 ml Felinq 2 mayesi və 4-5 damla CuSO₄ məhlulu töküb maili vəziyyətdə məhlulun üst səthini qızdırırıq.

Bu dəfə əmələ gələn rəngin nə üçün xarakterik olduğunu izah edin.

C. Nilander sınağı

Bu sınaq bismut duzlarından bismutun metallik formaya qədər reduksiya olduğunu göstərir. Sınaq şüşəsinə 1-2 ml yoxlanılan şəkər məhlulu götürüb üzərinə 1 neçə damla Nilander reaktivi əlavə edib qızdırdıqda qara rəngli metal bismutun çökməsi müşahidə edilir. Reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir.

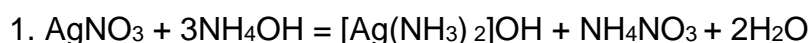


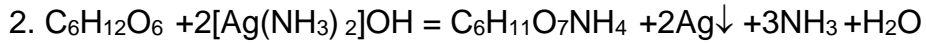
Ç. Gümüş güzgü sınağı

Bu sınaqda gümüş metalının reduksiya olunması göstərilir.

Sınaq şüşəsinə 1-2 ml təzə hazırlanmış AgNO₃ məhlulu götürüb, üzərinə damla-damla ammonium hidroksid əlavə edilir və boz rəngli çöküntü alınır. Çöküntü həll olana qədər qələvini əlavə etməli. Daha sonra sınaq şüşəsinə 2-3 ml 5%-li qlükoza əlavə edib qaynar su hamamına yerləşdiririk. Bir müddətdən sonra sınaq şüşəsinin divarlarında gümüşün çökdüyü müşahidə edilir. Bunu daha aydın görmək üçün sınaq şüşəsi soyudulub içərisindəki məhlul atılır.

Bu zaman reaksiya aşağıdakı şəkildə gedir.





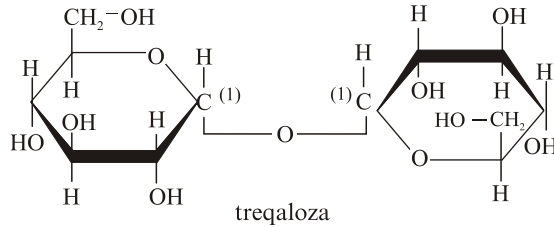
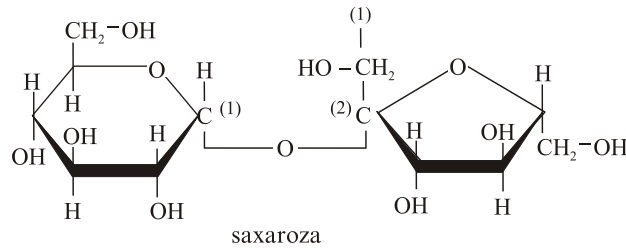
Gördüyümüz kimi burada heksozadan, qlükon turşusunun ammonium duzu əmələ gəlir və gümüş metalı sərbəst olaraq ayrılır.

İŞ 49

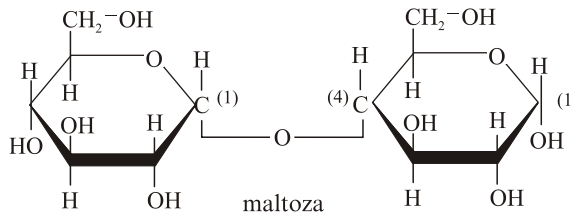
DISAXARIDLƏR

Onlar birinci dərəcəli mürəkkəb şəkərlərə aid olub, oliqo-şəkərlər sırasına daxildirlər. "Oliqos" yunanca bir qədər deməkdir. 2, 3 və 4 monoza qalığında əmələ gələn oliqoşəkərlər müvafiq olaraq di-, tri-, tetrasaxaridlər adlanır. Disaxaridlər, I monozanın qlikozid hidrosili, o birinin hidrosil qrupu hesabına əmələ gəldiyindən, öz mahiyyəti etibarilə qlikozidlərdir.

Reduksiyaetmə qabiliyyətinə görə disaxaridlər 2 tipə: maltoza və treqaloza tiplərinə ayrılır. Treqaloza tipli disaxaridlərdə monozaların birləşməsi qlikozid hidrosilləri hesabına olduğundan onlar reduksiyaetmə qabiliyyətinə malik olmur. Buraya saxaroza və treqaloza aiddir.



Göründüyü kimi saxaroza qlükoza və fruktozadan, treqaloza isə, 2 molekul qlükozadan əmələ gəlmişdir. Maltoza tipli şəkərlərdə isə 2 monozanın birləşməsi qlikozid hidrosili hesabına olmadığından onlar reduksiyaetmə qabiliyyətinə malikdir.



Disaxaridlərin digər nümayəndələri - maltoza, melibioza, sellobioza maltoza tipli şəkərlərə aiddir.

Disaxaridlər fermentativ yolla və ya mineral turşular vasitəsilə, onları təşkil edən monozalara qədər parçalanır. Daha doğrusu, hidrolizə uğrayırlar. Bu zaman saxaroza,

qlükoza və fruktozaya; treqaloza isə 2 molekul qlükozaya parçalanaraq digər disaxaridlər kimi Felinq mayesi ilə müsbət reaksiya əmələ gətirir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 5 %-li maltoza, laktoza və saxaroza
2. 5 %-li NaOH
3. 5 %-li CuSO₄
4. Qatı HCl
5. Qatı H₂SO₄
6. 250 ml-lik Erlenmeyer kolbaları
7. Hava soyuducuları
8. Su hamamı
9. Sınaq şüşələri
10. Qırmızı lakmus kağızı

İşin gedişi

a) sınaq şüşəsinə eyni miqdarda (2-3 ml) maltoza, laktoza və saxaroza məhlulları töküb üzərinə 1 ml NaOH və 4-5 damla CuSO₄ əlavə edib Trommer sınağında olduğu kimi məhlulun üst səthi qaynayana qədər qızdırılır.

b) Həmin təcrübəni Felinq 1 və 2 mayələrinin qarışığı ilə təkrar etməli.

c) *Mineral turşularla saxarozanın hidrolizi.* Saxaroza götürülmüş sınaq şüşəsində mis-1-oksidin əmələ gəlmədiyini müşahidə etdikdən sonra 2 ədəd Erlenmeyer kolbasının birinə 4-5 ml qatı HCl və digərinə qatı sulfat turşusu götürüb hər ikisinə 10-15 ml saxaroza əlavə edirik. Kolbalara müvafiq hava soyuducusu keçirib su hamamına yerləşdiririk. 25-30 dəqiqədən sonra hidrolizin başa çatdığını yoxlamaq üçün əvvəlcə sulfat turşusu götürülmüş kolbadan, sonra isə digərindən 1-2 ml məhlul sınaq şüşələrinə keçirilir. Sınaq şüşələrini əvvəlcə soyudur və qırmızı lakmus kağızının iştirakı ilə NaOH vasitəsilə məhlullar neytrallaşdırılır. Sonra hər 2 sınaq şüşəsində Trommer və ya Felinq sınağı aparılır. Qırmızı kərpici rəngin əmələ gəlməsi hidrolizin başa çatdığını göstərir. Əks halda kolbaları hamamda bir qədər də saxlamaq olar.

Qeyd etmək lazımdır ki, həddən çox və uzun müddət saxarozanın turşularla birlikdə qızdırılması yaxşı nəticə vermir. Çünki bu halda əmələ gələn monoşəkərlər də yana bilər. Xüsusilə bu sulfat turşusu ilə təcrübəyə aiddir. Bu təcrübədə kolbalara tökülən saxarozanın miqdarının azaldılması mümkündür.

İŞ 50

MÜRƏKKƏB ŞƏKƏRLƏR

(ikinci dərəcəli poliozalar)

Buraya əsasən iri molekul kütlələri olan və su ilə kolloid məhlulları əmələ gətirə bilən şəkərlər aiddir. Nişasta, inulin, qlükogen, sellüloza, hemisellülozalar, pektin maddələri, qalaktanlar aqar-aqar, bir qrup selikli maddələr, ksilanlar, qismən az rast gəlinən kalloza, lixenin, dekstranlar və digər şəkər tipli maddələr II dərəcəli poliozalara aiddirlər.

Bu şəkərlərin əksəriyyəti bitkilərdə ehtiyat qida maddəsinin böyük hissəsini təşkil edir. Yüksək mollekullu karbohidratlar bitki və heyvan orqanizmində gedən maddələr mübadiləsində, qidalanmada, bir çox sənaye sahələrində mühüm rol oynayır. Onların xarakterik nümayəndələrindən nişastanı göstərmək olar. Qeyd etməliyik ki, nişastanın şəkər hissəsi 2 mürəkkəb şəkərdən, amiloza və amilopektindən təşkil edilmişdir.

Nişasta bir cinsli maddə olmayıb tərkibində fosfat turşusu, müxtəlif yağ turşuları və s. maddələrə rast gəlinir. Nişastanın mühüm xassələrindən biri, onun kalium məhlulunda həll edilmiş yodla göy rəng əmələ gətirməsidir. Göy rəngin əmələ gəlməsi, görünür nişastanın yodla adsorbsion və kimyəvi birləşmələr verməsilə izah edilir. Soyuq suda nişasta yalnız şişir, lakin həll olmur. Turşu ilə hidroliz zamanı 96,1-97,6% qlükoza əmələ gətirir. Aralıq məhsullar olaraq əvvəlcə müxtəlif molekul kütləli dekstrin adlanan mürəkkəb şəkərlər əmələ gəlir. Hidrolizin ilk məhsulları öz xassələri etibarilə nişastadan az fərqlənir. Sonrakı məhsulların molekul kütlələri get-gedə azalır. Reduksiyaetmə qabiliyyəti artır. Bu dekstrinlər aşağıdakılardır.

1) *Amilodekstrinlər* - 25%-li spirtde həll olan ağ rəngli maddələr olub yodla bənövşəyi göy rəng əmələ gətirirlər.

2) *Eritrodekstrinlər* - mülayim etil spirtində sferik şəkilli kristallar şəklində çöküntü əmələ gətirir. Yodla qırmızı qonur rəng verirlər.

3) *Axroodekstrinlər* - isti 70%-li etil spirtində həll olur və buxarlandırıldıqda sferik kristallar şəklində spirt məhlulundan ayrılır. Yodla rəng əmələ gətirmirlər.

4) *Maltodekstrinlər* - spirt vasitəsilə çökmür və yodla rəng əmələ gətirmirlər. Maltodekstrinlərdən sonra hidroliz davam etdirildikdə maltoza və nəhayət qlükoza molekulları əmələ gəlir.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 5 və 10%-li NaOH
2. 1%-li CuSO₄
3. qatı və 25%-li HCl
4. qatı və 10%-li H₂SO₄
5. 1 və 0,1%-li nişasta
6. Lüqol reaktiv (əlavələr 25)

- 7.0,1%-li qlikogen
8. Erlenmeyer kolbaları
9. Hava soyuducucu
10. Qırmızı lakmus kağızı
11. Sınaq şüşələri
12. Su hamamı

İşin gedişi

a) Sınaq şüşəsinə 5 ml 1%-li nişasta məhlulu götürüb üzərinə 2 ml 5%-li NaOH, 4-5 damla CuSO_4 əlavə edib su hamamına yerləşdiririk. Mis bir oksidin əmələ gəlib gəlmədiyini müşahidə edirik.

b) Sınaq şüşəsinə 5 ml 1%-li nişasta, 2-3 damla qatı HCl və ya H_2SO_4 töküb 10-15 dəqiqə müddətinə su hamamında yerləşdiririk. Sonra sınaq şüşəsi soyudulur, neytrallaşdırılır və Trommer sınağı vasitəsilə hidrolizin qurtarmasını yoxlayırıq.

c) Nişastanın hidrolizini saxaroza ilə olduğu kimi Erlenmeyr kolbasında aparıb hidrolizin qurtarmasını Trommer sınağı ilə yoxlayırıq.

Nişastanın hidroliz məhsullarının

müşahidə edilməsi.

ç) Məlum olduğu kimi nişasta və onun hidroliz məhsulları yodla müxtəlif rənglər əmələ gətirir. Hidrolizin sonuna yaxın və son məhsulları rəng vermirlər. Hidroliz nəticəsində dekstrinlər, maltoza və nəhayət qlükoza alınır.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Qaynar su hamamı
2. 0,1 %-li nişasta
3. Lüqol məhlulu
4. Felinq mayesi
5. 10 %-li NaOH
6. 10 %-li H_2SO_4

Mikrokimyəvi sınaq şüşəsinə 15 damla nişasta və eyni miqdar sulfat turşusu tökürük. Məhlulu qarışdırıb oradan digər sınaq şüşəsinə 2 damla məhlul keçiririk. Həmin sınaq şüşəsində nişasta aşkar edilir. Birinci sınaq şüşəsinə qaynar su hamamına hidroliz üçün yerləşdiririk. Hər dəqiqədən bir sınaq şüşəsindən nümunə götürüb boş sınaq şüşəsinə keçiririk. Nümunə götürülməsi o vaxta qədər davam etdirilir ki, nəhayət heç bir rəng əmələ gəlməsin. Sonra hidrolizi başa çatmış məhlulda qlükoza olub-olmadığını Trommer və ya Felinq sınağı vasitəsilə yoxlamaq olar.

Sınaq şüşəsinə 2-3 ml 0,1%-li nişasta və 1 damla lüqol məhlulu əlavə edib əmələ gələn rəng müşahidə edilir. Sınaq şüşəsi qızdırıldıqda (qaz üzərində) məhlul yenidən şəffaflaşır. Soyutduqda rəng bərpa olunur.

d) nişastanı müşahidə etmək üçün bitki məhsullarından istifadə etmək olar. Bunun üçün dənli bitkilərdən taxıllar, paxlalı bitkilərin toxumları, kartof yumrusu və tərkibində nişasta olan başqa materiallar istifadə edilə bilər.

Məsələn, kartof yumrusundan kəsiklər götürüb əşya şüşəsində və ya farfor qabda yerləşdirilir. Kəsiklərin üzərinə 1 damla lüqol reaktivi əlavə etdikdə göy rəng əmələ gəlir.

Bitki toxumalarında digər şəkərlərin olmasını da müşahidə etmək olar.

Məsələn, inulini müşahidə etmək üçün yer armudu yumrusunu əvvəlcədən 14 gün müddətinə 50%-li etanolda saxladıqdan sonra, ondan kəsiklər hazırlayıb mikroskopla baxmaq olar. Hüceyrə divarlarında sferik formada inulin kristallarının ayrıldığını görmək olar.

e) sınaq şüşəsinə 2-3 ml qlikogen və 1-2 damla lüqol reaktivi əlavə edib qarışdırdıqda boz rəng alınır.

ə) inulin fruktofuranosa və az miqdar qlükopiranoza qalıqlarından təşkil olunduğundan, Selivanov sınağını verə bilər. Sınaq şüşəsinə 5 ml 0,1 %-li inulin, 1 ml 25 %-li HCl və bir neçə rezorsin kristalları əlavə edib qızdırırıq. Məhlul qırmızı rəngə boyanır (fruktoza ilə reaksiyaya bax, iş 43).

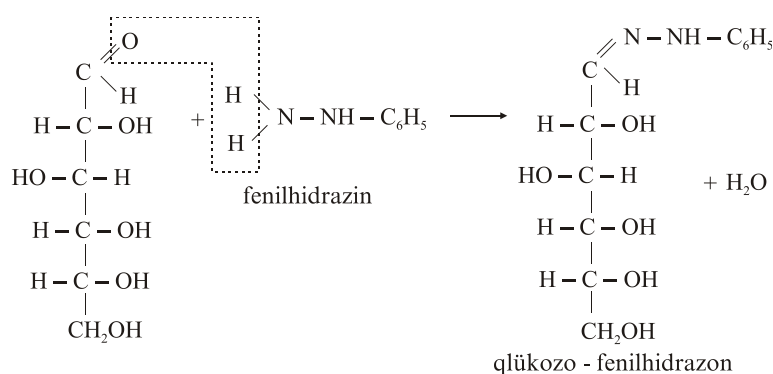
İŞ 51

SADƏ ŞƏKƏRLƏRİN FENILHIDRAZIN

SINAĞI İLƏ AŞKAR EDİLMƏSİ

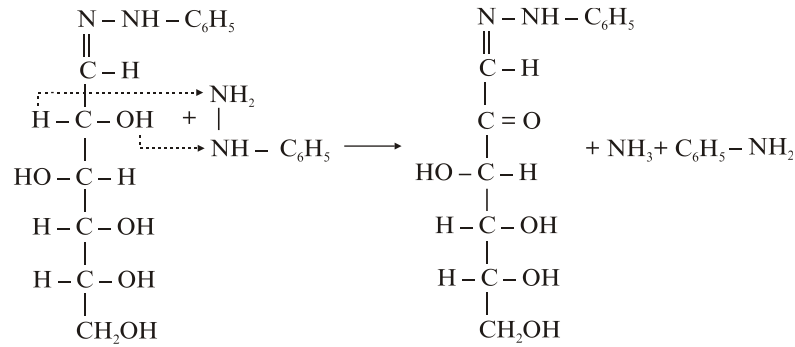
Fenilhidrazin sınağı sərbəst karbonil (aldehid və keton) qrupuna malik olan şəkərlər üçün həssas sınaq olub cüz'i miqdarda reduksiya qabiliyyətinə malik şəkərləri aşkar etməyə imkan verir. Reaksiya zamanı suda həll olmayan ozazonlar alınır ki, bu zaman kristalların formasına əsasən mühitdə hansı şəkər olduğunu müəyyənləşdirmək mümkündür. Məsələn, fenilhidrazin və sirkə turşusunun natrium duzu mühitində qlükoza incə saplaqlardan əmələ gəlmiş süpürgə, ulduz və başqa formalarda toplaşmış iynəvari kristallar əmələ gətirir. Reaksiya aşağıdakı 3 mərhələdə gedir.

Birinci mərhələ

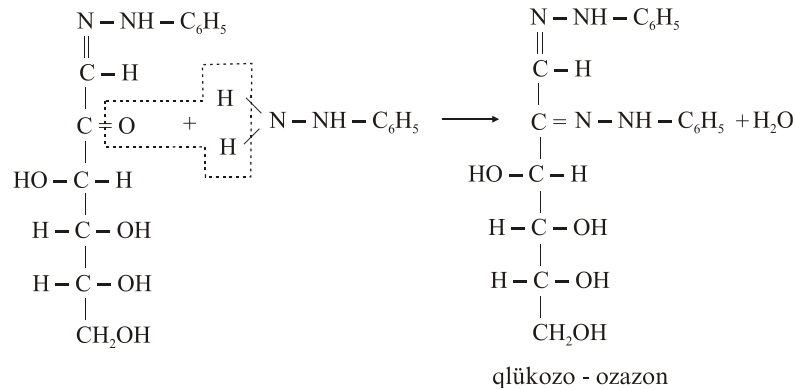


Burada fenilhidrazin qlükoza ilə birləşib qlükozo- fenilhidrazon əmələ gətirir.

İkinci mərhələdə fenilhidrazin əmələ gələn fenil hidrazonu oksidləşdirir. Fenilhidrazon 2-ci karbon atomunun yanındakı 2 H atomunu itirir və həmin yerdə yeni karbonil qrupu olan ketoqrup əmələ gəlir.



Üçüncü mərhələdə əmələ gələn ketoqrup yenidən fenilhidrazinlə reaksiyaya girərək qlükoza ozazon kristallarını verir.

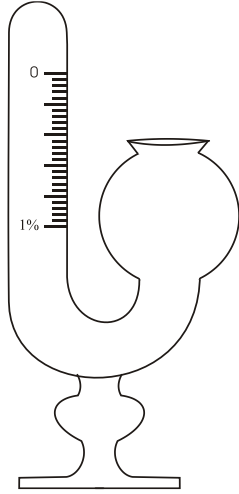


Reaktiv və ləvazimat:

1. Ştativ və sınaq şüşələri
2. Su hamamı
3. Buzlu su
4. Mikroskop
5. Əşya şüşəsi
6. Pipetka
7. Fenilhidrazin
8. Sirkə turşusunun natrium duzu (CH₃COONa)
9. 0,5 %-li qlükoza məhlulu

İşin gedişi

Sınaq şüşəsinə 100-150 mq fenilhidrazin, 200-300 mq CH₃COONa kristalları götürüb üzərinə 2-3 ml qlükoza məhlulu tökülür. Sınaq şüşəsini qarışdırıb 30-40 dəqiqə müddətinə qaynar su hamamına yerləşdiririk. Arabir sınaq şüşəsini qarışdırmalı.



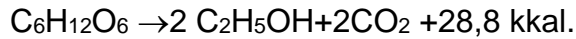
Şəkil 6

Göstərmək lazımdır ki, spirt qıçqırmasına heksoza, trioza və monoza uğraya bilələr. Qıçqırma qabiliyyəti monoşəkərlərin konfigurasiyası və izomer formalarından da asılıdır. Məsələn, təbiətdə ən çox yayılmış qlükozanın D forması daha asanlıqla qıçqırır. Qıçqırmanı müşahidə etmək üçün burada da Eynhorn cihazından istifadə etmək olar.

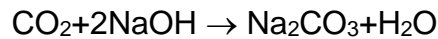
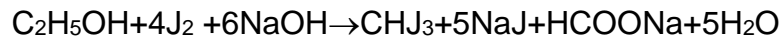
Cihazın içərisinə şəkər məhlulunda qarışdırılmış maya həlməşiyi töküb 30-35°C temperatur mühitinə yerləşdirildikdə mayanın fəallığından asılı olaraq 1-3 saatdan sonra CO₂ qazının köpük şəklində məhluldan

ayrıldığını müşahidə edərik. Proses tədricən getdikdə CO₂ borunun nazik (bağlı) hissəsinin yuxarı tərəfində toplanır.

Xüsusi dərəcələnməmiş cihazlarda toplanmış CO₂-nin həcmcə miqdarına əsasən götürülmüş şəkərin faizini müəyyənləşdirmək olar. Qıçqırma zamanı həmçinin etil spirti emələ gəlir. Prosesin cəm tənliyi belədir:



Boruda etil spirti alındığını, yodoform alınması reaksiyası ilə, CO₂-ni isə qələvi tərəfindən onun udulması ilə müəyyənləşdirmək olar.



Reaktiv və ləvazimat:

1. Təzə və ya quru maya
2. 5 %-li qlükoza
3. «Çaxır daşı» turşusunun 1 %-li məhlulu
4. 10 %-li NaOH
5. J-un KJ -da hazırlanmış məhlulu (Lüqol reaktivinin hazırlanmasına bax; 25)
6. 2 ədəd Eynhorn cihazı
7. həvəng-dəstə
8. Ölçü silindri
9. Termostat
10. Termometr
11. Sınaq şüşələri və ştativ

12. Kiçik qıf

İşin gedişi

İş aşağıdakı mərhələlərlə aparılır:

1. 1 q təzə maya, 5 ml distillə suyu ilə birlikdə farfor həvəngdə əzilir və qarışdırıb 30 ml su ilə kimyəvi stəkana keçirilir.

Stəkana 1 ml «çaxırdaşı» turşusunun məhlulu tökülür. Bu zaman pH-ı təxminən 5-6 olan mühit yaranır (lakmus kağızı ilə yoxlamalı). Belə mühitdə qıcırma daha yaxşı gedir. Zəif üzvi turşu əvəzinə mineral turşu işlədilsə pH çox aşağı düşə bilər. Stəkandakı məhlulu Eynhorn cihazına maili vəziyyətdə elə boşaldırıq ki, bağlı hissə tamamilə dolsun və orada qabarcıq qalmasın. Cihazı tamamilə doldurmaq lazım deyil. Cihazda olan məhlul yoxlama məhluludur (su ilə). Nəzərdə tutmalı ki, maye tərkibində müəyyən qədər qlükoza ola bilər.

2. Paralel olaraq götürülmüş 1 q maya 5 ml 5 %-li qlükoza məhlulu ilə həvəngdə əzilib 30 ml həmin qlükoza məhlulu və 1 ml üzvi turşu iştirakı ilə kimyəvi stəkana, oradan da yuxarıdakı qayda üzrə Eynhorn cihazına keçirilir. Hər iki cihaz 30-37°C temperaturda termostata yerləşdirilir. Qıcırmanın müddəti maya göbələklərinin fəallığı, miqdarı, optimal mühitdə (t^0 və pH) qlükozanın miqdarı, forması və digər amillərdən asılıdır. Qeyd etmək lazımdır ki, təzə maya olmadıqda fəallığını itirməmiş quru mayadan da istifadə etmək olar. Bu halda maya həvəngdə mülayim su və qlükoza məhlulu ilə əzildikdə daha yaxşı nəticə verir.

3. 30-180 dəqiqədən sonra hər iki cihaz termostatdan çıxarılır. Müddəti müəyyənləşdirmək üçün arabir qıcırmanın hansı sürətlə getdiyinə baxmaq olar. Kontrol cihazda maya tərkibində şəkər olmadığı və ya cüzi olduğu halda cihazın bağlı hissəsində çox az qabarcıq yığılır. Təcrübə variantında isə çoxlu miqdarda CO₂ qazı toplanır.

4. Əmələ gələn qazın CO₂ olduğunu yoxlamaq üçün cihaza tam dolana qədər 10% NaOH məhlulu töküb baş barmaqla cihazı bağlayırıq. Qarışdırıb barmağın əmələ gələn boşluğa doğru sorulduğunu müşahidə edirik. Bu zaman CO₂ qələvi vasitəsilə udulur və vakuum əmələ gəlir.

5. Həqiqətən etil spirti əmələ gəldiyini yoxlamaq üçün cihazdan sınaq şüşəsinə 3-4 ml məhlul süzülür. Məhlula sarı rəng əmələ gələndə qədər J₂ (yod) məhlulu tökülür. (Lüqol məhlulu) və sınaq şüşəsi qızdırılır. Bu zaman yodoformun kəskin iyi hiss edilir.

İŞ 53

QICQIRMA PROSESİNİN FLÜOR İONLARI

İLƏ TORMOZLANMASI

Şəkərlərin anaerob çevrilməsinin səciyyəvi cəhətlərindən biri, bu prosesdə maqnezium ionu və fosfor turşusunun iştirakıdır. Spirt qıcırması və bu prosesdə Mg ionlarının iştirakını, qlükozanın müəyyən temperatur və pH-da fosfat buferində maya ilə qıcırması prosesində karbon qazının ayrılması ilə müşahidə etmək olar. Spirt

qıvcırmasının tormozlanmasını mühitə natrium flüor əlavə etməklə əldə etmək olar. Güman olunur ki, tormozlanma enolazanı inaktivləşdirən maqnezium-flüor-fosfat kompleksinin əmələ gəlməsi ilə əlaqədardır. Qıvcırmanı yenidən bərpa etmək üçün kalsium xlorid istifadə edilir.

Təcrübəni aparmaq üçün U şəkilli borulardan quraşdırılmış monometrdən istifadə olunur. Borular diametri 1 sm, hündürlüyü 55-60 sm olub bir ucu açıq, ikinci ucu isə həcmi 80-100 ml-lik iki ədəd hərnlənən retortlu şüşə qaba bərkidilir. Monometrlər metilen abısı məhlulu ilə doldurulur və taxta ştativə bərkidilir. Xüsusi monometrlər olmadıqda təcrübə diametri 0,5-0,6 sm olan adi U şəkilli borularla aparıla bilər. U şəkilli üç ədəd boru metilen abısı ilə doldurulur və hər biri rezin borular vasitəsilə sınaq şüşələri ilə birləşdirilir. Sınaq şüşələri isə kauçuk tıxac ilə möhkəm bağlanır.

Monometrlə işlədikdə onun boruları arasında millimetrlə kağız zolağı yapışdırmaqla hesablama aparılır. Qeyd etmək lazımdır ki, yuxarıdakı qayda üzrə qurulmuş monometrin iş prinsipi Varburq cihazına uyğundur.

İşi aparmaq üçün aşağıdakı məhlullar hazırlanır.

1. pH-ı 6,0 olan fosfat buferi (M/15)
2. 25 %-li qlükoza
3. 1 %-li NaF
4. 10 %-li kalsium xlorid (məhlul doymuş CaCl_2 -dən hazırlanır)
5. Təzə maya

Təcrübədən qabaq cihazın qabını və retortunu aşağıdakı qayda ilə doldururuq. Fosfat buferində suspenziya halına salınmış maya süzüntüsü qabın mərkəzi hissəsinə tökülür. Qlükoza məhlulunu yan retortlardan birinə töküb lazım gəldikdə oraya natrium flüor əlavə edilir. CaCl_2 məhlulu müvafiq qabların retortuna (ikinci retort) əlavə edilir. Beləliklə, aşağıdakı tərkibli qarışıqlar alınır.

Cədvəl 8

Qabın əsas tutumu		Reaksiyon qarışıqlarının tərkibi				
		1-ci yan retorta		2-ci yan retorta		
maya (q-la)	pH-ı 6,0 olan fosfat buferi (ml-lə)	25%-li qlükoza (ml-lə)	1 %-li (ml-lə)	fosfat buferi ? pH 6,0 (ml-lə)	10%-li CaCl_2 (ml-lə)	fosfat buferi? pH-6,0 (ml-lə)
1. 2	6	2	-	1	-	1
2. 2	6	2	0,5	0,5	0,5	0,5
3. 2	6	2	1	-	1	-

4.	2	6	2	1	-	-	1
----	---	---	---	---	---	---	---

Qablar doldurulduqdan sonra onları monometrlərə birləşdirib Varburq cihazının vannasına yerləşdiririk. Cihaz temperaturun bərabərləşməsi üçün (açıq kranla) 10 dəqiqə saxlanılır. Sonra birinci retortdakı məhlul (qlükoza və NaF) qabın mərkəzi hissəsinə boşaldılır. Qablardakı məhlullar 5 dəqiqə qarışdırılır və monometrin kranları bağlanılır. 15 dəqiqədən sonra birinci hesabat qeyd edilir. Kranlar açılır, ikinci retortdan CaCl_2 əlavə edilir. Yenə kranları bağlayıb 15 dəqiqədən sonra ikinci hesabat qeyd olunur. Təcrübə 30 və 37⁰ C-də aparıla bilər. Sonuncu halda proses daha intensiv gedir və təcrübə tez başa çatır. Hər hesablamadan sonra monometrlərdə məhlulların səviyyəsinin bərabərləşdirilməsi ondan irəli gəlir ki, həmin şəraitdə spirt qızcırması kifayət qədər sürətlənir və hər 15 dəqiqədən bir səviyyələrin dəyişməsi demək olar ki, monometrin bütün qolunu tutur.

Təcrübənin nəticəsini aşağıdakı qayda ilə qeydə alırlar: təcrübənin müddəti qızcırmanın CaCl_2 əlavə edildikdən sonra bərpa olunma sürəti ilə müəyyən edilir. Nəticə göstərir ki, birinci qabda gedən normal qızcırma fonunda digər (2, 3 və 4 s-ı) qablarda NaF ionunu özünə birləşdirərək qızcırmanı tormozlayır. İkinci və üçüncü qaba CaCl_2 əlavə edilməsi qızcırmanı əvvəlki qiymətinə qədər bərpa edir. Tormozlamanın gücü və bərpanın sürəti əlavə olunan NaF və CaCl_2 -nin qatılığından asılıdır.

Adi U şəkilli borularla işlədikdə üç sınaq şüşəsinin hər birinə tərkibində 2 q təzə maya olan 6 ml fosfat buferi, 2 ml qlükoza və sınaq şüşələrinin ikisinə 1 ml NaF məhlulu tökülür. Sınaq şüşələrində məhlullar qarışdırılır və təxminən 20 dəqiqədən sonra U şəkilli borulara birləşdirilir. 15-20 dəqiqədən sonra birinci sınaq şüşəsində qızcırma getdiyi, qalan iki sınaq şüşəsində isə qızcırmanın tormozlanması aydın görünür. Sonra hər üç sınaq şüşəsini açıb ikinci sınaq şüşəsinə 1 ml CaCl_2 məhlulu töküüb yenidən U şəkilli borularla birləşdiririk. 20-30 dəqiqədən sonra birinci və üçüncü sınaq şüşəsində əvvəlki kontrol qədər qızcırma getdiyi müşahidə edilir. İkinci şüşədə qızcırma dayanır. Üçüncü sınaq şüşələrində qızcırma Ca ionlarının köməyiylə bərpa olunur.

İŞ 54

ŞƏKƏRLƏRİN MÜBADİLƏSİ

Çox hallarda maddələr mübadiləsində şəkərlərin funksiyasının onun yalnız kimyəvi reaksiyaları enerji ilə təmin etməsi ilə əlaqələndirirlər. Lakin bu tamamilə belə deyil. Əlbəttə şəkərlərin oksidləşməsi zamanı orqanizmdə çoxlu miqdarda enerji alınır ki, bu enerji ATF molekulunun makroerqik əlaqələrində toplanır və bu enerji kimyəvi reaksiyaların getməsinə sərf olunur. Lakin maddələr mübadiləsində şəkərlər daha mühüm bir vəzifəni yerinə yetirir. Şəkərlər çoxlu miqdar üzvi maddələrin mənbəyidir. Həmin maddələr lipidlərin, zülalların və nuklein turşularının və digər mühüm maddələrin sintezində iştirak edirlər. İlk üzvi maddələr kimi bitkilərdə sintez olunan şəkərlərdə «C» bir element kimi daxil olur və onlarda enerji toplanır. Demək olar ki, bütün digər maddələri «C» (karbon) və enerji ilə təmin edən şəkərlərin parçalanması prosesidir.

Mədəaltı şirənin amilazası vasitəsilə

nişastanın həzmi

Nişasta və digər mürəkkəb şəkərlər qida ilə birlikdə qismən ağız boşluğunda və sonra mədədə ağız şirəsinin amilazasının təsirindən parçalanır. Lakin mədə şirəsində amilaza olmadığından, şəkərlər tam parçalana bilməyib onikibarmaq bağırsağa daxil olur və yalnız orada bağırsağ şirəsinin amilazasının təsirindən tam hidrolizə uğrayır. Nişasta və digər mürəkkəb şəkərlər burada aralıq məhsullarına və sonra monozalara qədər parçalanaraq qana sorulur. Nişastanın bu yolla həzmini göstərmək üçün aşağıdakı qaydada işləyirik.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Ştativlə birlikdə sınaq şüşələri
2. Termostat
3. Termometr
4. Tərkibində 0,3 % NaCl olan suda 0,1 %-li nişasta
5. Mədə şirəsindən alınmış süzüntü və ya 0,1 %-li Na₂CO₃ məhlulundan hazırlanmış 0,2%-li pankreatin məhlulu
6. Mədə şirəsi və ya 0,2 %-li HCl-da hazırlanmış 0,1% pepsin (əlavələrə bax, 26)
7. 10 %-li NaOH
8. 5 %-li CuSO₄
9. 10 %-li HCl
10. Lüqol reaktiv

İşin gedişi

1. 3 ədəd sınaq şüşəsinə təxminən 1 ml nişasta məhlulu tökülür.
2. Birinci sınaq şüşəsinə 2-3 ml mədə şirəsindən alınmış süzüntü və ya pankreatin məhlulu, ikinci sınaq şüşəsinə 2-3 ml mədə şirəsi və ya NaOH-la əvvəlcə neytrallaşdırılmış pepsin məhlulu tökülür.
3. Hər 3 sınaq şüşəsi 37-40°C temperaturda 1,5-2 saat müddətə termostata yerləşdirilir.
4. Hər sınaq şüşəsindən bir qədər götürüb bir və üçüncü məhlulu HCl-la turş mühitə qədər çatdırırıq (əks halda qələvi mühitdə yod rəngini itirir), üzərinə damla lüqol reaktiv əlavə edilir. Birinci sınaq şüşəsində göy rəng əmələ gəlmir. Çünki burada nişasta parçalanır. Lakin birinci sınaq şüşəsində bənövşəyi qırmızı rəng əmələ gələ bilər. Bu isə məhlulda dekstrinlər olduğunu göstərir. İkinci və üçüncü sınaq şüşələrində isə nişasta parçalanmadığından göy rəng müşahidə olunur.
5. Hər üç sınaq şüşəsində Trommer sınağı aparılır. Pankreatin olan sınaq şüşəsində amilaza təsir göstərdiyindən müsbət nəticə alınır. Neytrallaşdırılmış və neytrallaşdırılmamış mədə şirəsi olan sınaq şüşələrində isə qırmızı kərpici rəng müşahidə olunur ki, bu da mədə şirəsində amilaza olmadığını göstərir.

İŞ 55

ŞƏKƏR MÜBADİLƏSİNİN ARALIQ

VƏ SON MƏHSULLARININ TƏYİNİ

(əzələ ekstraktında süd turşusunun müşahidə edilməsi)

Uffelman nümunəsi

Heyvan toxumalarında, xüsusən əzələlərdə şəkərlərin anaerob parçalanmasının son məhsulu olan süd turşusunu müşahidə etmək üçün aşağıdakı məhlul və preparatlar hazırlanır.

1. Əzələ ekstraktı - 30-50 q siçovul və ya adadovşanın əzələsini əvvəlcə qayçı vasitəsilə doğrayıb sonra çini həvəngdə 60-100 ml su ilə tam qarışıq halına düşənə qədər əzirik. Əzələni ət maşınından da keçirmək olar. Alınan süzüntünü kolbaya keçirib, 10 dəqiqə qarışdırır və bir neçə qat tənzifdən süzürük.

2. 1 % -li fenol məhlulu.

3. 1 %- li xlorlu dəmir məhlulu.

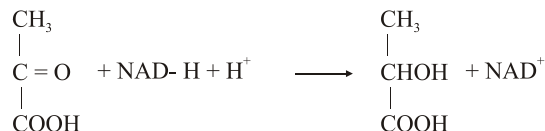
İş zamanı iki ədəd silindrə 50-80 ml fenol və 1-2 ml xlorlu dəmir tökürük. Dəmirin fenollu birləşməsinin əmələ gəlməsi, məhlulların bənövşəyi rəngə boyanmasına səbəb olur. Sonra silidrlərdən birinə əzələ ekstraktını əlavə edirik. Həmin silindrə yaşılımtıl sarı rəngin əmələ gəlməsi, mühitdə süd turşusunun dəmir duzunun alınması ilə əlaqədardır. İkinci silindrə bənövşəyi rəng dəyişmir.

İŞ 56

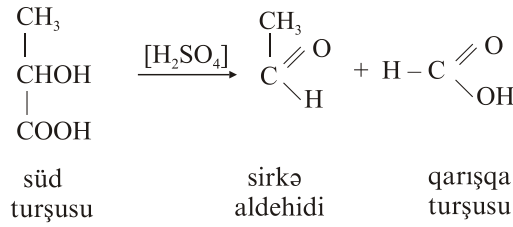
QLİKOLİZ ZAMANI SÜD TURŞUSUNUN

ƏMƏLƏ GƏLMƏSİ

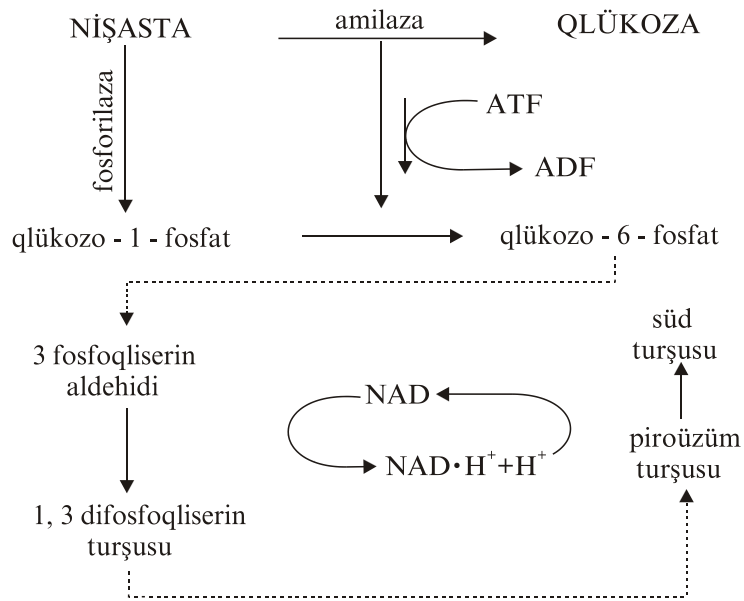
Məlum olduğu kimi anaerob mühitdə fosfotriozalardan əmələ gəlmiş piroüzüm turşusu insan və heyvan orqanizmində süd turşusuna çevrilir.



Qlikoliz zamanı əmələ gəlmiş süd turşusunu, onu sirkə aldehidinə sulfat turşusu vasitəsilə çevirməklə müşahidə etmək olar.



Əmələ gələn sirkə aldehydi veratrolla rəngli birləşmə əmələ gətirir. Süd turşusunun əmələ gəlməsini öyrənmək üçün ferment mənbəyi, piroüzüm turşusu və reduksiya olunmuş NAD olmalıdır. Lakin bahalı qiymətli NAD tapmaq əvəzinə aşağıdakı qaydaya əsasən işləmək olar. Əzələ həlməşiyinə nişasta məhlulu əlavə etsək, həlməşikdə olan fermentlər nişastanın piroüzüm turşusuna qədər parçalayır. Bu zaman paralel olaraq əzələnin NAD⁺-n. NAD.H (+H⁺)-a qədər reduksiya olunur. Sonuncu piroüzüm turşusunu süd turşusuna çevirir. Reaksiya aşağıdakı sxemdə gədir.



Reaktiv və ləvazimat:

1. Termometrlə su hamamı
2. Buz
3. Şpatel
4. Qıf
5. Filtrlər
6. Bufer məhlulunda hazırlanmış 0,5 %-li nişasta (0,5 M natrium bikarbonatda)
7. 20 %- li üçxlor sirkə turşusu
8. 20%- li mis sulfat
9. Kalsium hidroksid toz şəklində

10. Qatı sulfat turşusu
11. Etil spirtində hazırlanmış 0,2%-li² veratrol (pirokatexinin dimetil efiri)
12. Əzələ həlməşiyi (100 q ada dovşanının əzələsi ət maşınından keçirilir, tənzifdə yuyulur və sıxılır. Yuyulmuş əzələyə fizioloji məhlul tökülür.

İşin gedişi

İki sınaq şüşəsinə ümumi kütləsi noxuddan böyük olmayan miqdarda əzələ həlməşiyi götürüb sınaq şüşələrini nömrələyirik. Kontrol rolunu oynayan birinci sınaq şüşəsinə fermentləri inaktivləşdirmək üçün 5 damla 3-xlorsirkə turşusu əlavə edirik. Sonra hər iki sınaq şüşəsinə şüşə həcmninin yarısı qədər nişasta məhlulu və anaerob mühit yaratmaq üçün 7 damla vazelin yağı götürüb onları 37°C-də 1 saat müddətinə su hamamına yerləşdiririk. Müddət keçdikdən sonra ikinci sınaq şüşəsinə 5 damla 3-xlorsirkə turşusu əlavə edirik. Sınaq şüşələrindəki məhlullar müvafiq nömrələnmiş təmiz sınaq şüşələrinə süzülür. Süd turşusunun müşahidəsinə mane ola bilən şəkərləri çökdürmək üçün, sınaq şüşələrinə 0,25 q kalsium hidrokسيد və 10 damla mis sulfat tökürük. 15 dəqiqə müddətində şüşələr arabir çalxalanır. Məhlullar yenidən nömrələnmiş beşinci və altıncı sınaq şüşəsinə süzülür. 5-6 damla süzüntü yığıldıqda sınaq şüşələri buza yerləşdirilib hər birinin üzərinə 15 damla qatı sulfat turşusu əlavə edilir. Sınaq şüşələri 5 dəqiqə qaynar su hamamına yerləşdirilir. Nəhayət sınaq şüşələrini buzda soyudub hər ikisinə iki damla veratrol əlavə edirik. Tədricən təcrübə sınaq şüşəsində qırmızı rəng əmələ gəlir. Kontrol sınaq şüşəsində isə təcrübədən əvvəl əzələdə olan süd turşusunun iştirakı ilə əlaqədar zəif çəhrayı rəng alınır.

İŞ 57

SİDİKDƏ PİROÜZÜM TURŞUSUNUN

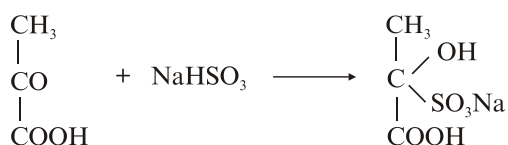
MİQDARCA TƏYİNİ

Piroüzüm turşusu insan orqanizmində şəkər mübadiləsinin aralıq məhsulu kimi əmələ gəlir. Anaerob şəraitdə piroüzüm turşusu yuxarıda göstəriləndiyi kimi süd turşusuna çevrilərək reduksiya olunmuş NAD-H₂-nin oksidləşməsinə səbəb olur. Aerob şəraitdə isə piroüzüm turşusu CO₂ və H₂O-ya qədər oksidləşir. Bu proses ATF tərkibində enerji toplanması ilə əlaqədardır.

Normal halda qan plazmasında 0,8-1,5 mq % piroüzüm turşusu olur. Bir sutkada sidik vasitəsilə 10-25 mq piroüzüm turşusu ixrac olunur. B₁ avitaminozu və hipovitaminozu zamanı qanda, digər toxumalarda və xüsusilə beyində çoxlu miqdarda piroüzüm turşusu toplanır ki, bu da tərkibində tiamin pirofosfat olan koenzim A-nın sintezinin pozulması ilə əlaqədardır. Koenzim A aerob parçalanmanın ilk mərhələlərində iştirak edir. O, pantoten turşusu, tioetanolamin fosfor turşusu və adenindən ibarətdir.

Piroüzüm turşusunun miqdarca təyini onun turşu mühitdə NaHSO₃ və KHSO₃ də bisulfit birləşməsi əmələ gəlməsinə əsaslanır.

² Veratrolu 0,2%-lm qvayakolla (пирокатехинин монометил ефири) явяз етмяк олар



NaHSO₃ –un artıq miqdarını J₂ ilə birləşdirməklə reaksiya mühitindən çıxarmaq olar.



Bu zaman sidiyin üzvi birləşmələri də oksidləşir. Məhlula NaHSO₃ əlavə etməklə qələvi mühit yaratmaq üçün piroüzüm turşusunun bisulfit birləşməsi parçalanır. Beləliklə sərbəst ayrılan bisulfitin miqdarı piroüzüm turşusunun miqdarına ekvivalentdir. Bisulfit isə J₂ ilə titrlənir. Sərf olunan yoda görə piroüzüm turşusunun miqdarı hesablanır.

Reaktiv və ləvazimat:

1. 1%-li NaHSO₃ və ya KHSO₃
2. 0,1 N J₂ məhlulu
3. 0,01 N HJ məhlulu
4. NaHSO₃ (doymuş məhlul)
5. 0,1 hiposulfit (KNO₃-lə yoxlamalı. Əlavələrə bax 27, 27A)
6. Doymuş NaCl məhlulunda hazırlanmış 1%-li nişasta
7. 0,1 N quzuqulağı turşusu
8. Mikrobüretka
9. 1 ml-lik pipetka
10. 10 ml-lik silindr
11. konusvari kolbalar
12. 200 ml-lik kimyəvi stəkanlar

İşin gedişi

1 ml sidik üzərinə 1 ml 0,1 N quzuqulağı turşusu və 9 ml su tökürük (sidikdə olan kalsiumu çökdürmək üçün).

Alınan məhlula 10 damla təzə hazırlanmış NaHSO₃ əlavə edib qarışdırır və qaranlıqda 15 dəqiqə saxlayırıq. Bisulfitin artıq miqdarını nişasta iştirakı ilə göy rəng itənə qədər 0,1 N J₂-la J₂-un artığının isə rəng itənə qədər 0,1 N hiposulfitlə ləğv edirik. Axırda daha dəqiq nəticə almaq üçün məhlula 0,01 N J₂ məhlulu zəif göy rəng bərpa olunana qədər damla-damla əlavə edilir. Hiposulfit mühitdən kənar edildikdən sonra kolbaya 10 damla doymuş NaHSO₃ məhlulu tökürük (bu zaman göy rəng itir). Kolbadakı

məhlul 10-20 saniyə ərzində itməyən göy rəng alınana qədər 0,01 N J₂-la titrlənir. Sərf olunan 0,01 N J₂-un miqdarı piroüzüm turşusunun miqdarı ilə ekvivalentdir.

Hesablama aşağıdakı tənliklə aparılır.

$$X = \frac{\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH} \cdot 0,01 \cdot A}{1,0} \quad \text{sidiyinin qandlıq miqdarı}$$

0,01 J₂-un qatılığı

A - 0,01 N J₂-un *m*-lə miqdarı (titrlənməyə sərf olunan); 1,0 - analiz üçün götürülmüş sidiyin miqdarı. Piroüzüm turşusunun qram ekvivalenti və sutka ərzində əmələ gələn sidiyin miqdarı nəzərə alındıqda bir sutkada əmələ gələn piroüzüm turşusu *m**q*-la ifadə olunur.

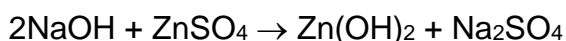
İŞ 58

QANDA ŞƏKƏRİN MİQDARCA TƏYİNİ

Qeyd etmək lazımdır ki, insan orqanizminə şəkərlər əsasən bitki məhsulları vasitəsilə daxil olurlar. Orqanizm hər gün yağlardan təxminən 10 dəfə çox, 500 *q*-dan az olmamaq şərti ilə şəkər daxil olur. Yuxarıda qeyd etdiyimiz kimi şəkərlərin həzmi əsasən onikibarmaq bağırsaqla və xüsusən nazik bağırsaqla baş verir. Disaxaridlər - maltaza, saxaroz, laktoza və digərlərinin parçalanması nazik bağırsaqla ifraz olunan qlükozidaza (maltoza), β-fruktofuranozidaza (saxaraza) və ya invertaza-qalaktozidaza (laktaza) və digər müvafiq fermentlər vasitəsilə başa çatır. Alınan monoşəkərlər müxtəlif sürətlə (qlükoza və qalaktoza) daha tez qana sorulur. Qarı venası vasitə ilə şəkərlər qara ciyərdə gəlir. Qlükozanın bir hissəsi qara ciyərdən keçərək bütün orqanizmə yayılır. Əsas kütlə isə qlikogen şəklində qaraciyərdə toplanır. Qanda şəkərin miqdarı azaldıqda qlikogen parçalanır, yenidən qlükoza əmələ gəlir və qana daxil olur. Orqanizmin bütün hüceyrələri tərəfindən qlükozanın sərf olunmasına baxmayaraq qanda şəkərin miqdarı eyni səviyyədə (80-120 *m**q* /%) qalır.

Xagedorn-Yensen üsulu

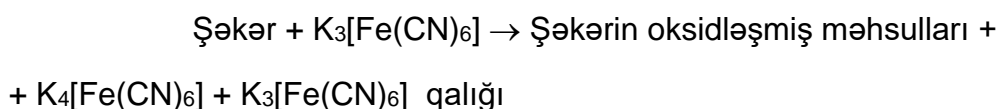
Bu üsul ilə şəkərin miqdarca təyini aşağıdakı prinsipə əsaslanır. Əvvəlcə qələvi (NaOH) məhlulu ilə sink sulfat (ZnSO₄) qarışdırılır.



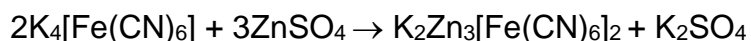
Alınan qarışıqda müəyyən miqdar təyin olunan qan tökülür. Bu zaman şəkər məhlulda qalır. Qeyd etmək lazımdır ki, məhlulda digər reduksiya etmə qabiliyyətinə malik olan maddələr də var (məsələn, qlütation, sidik turşusu, kreatinin). Əslində qanda qlükozanın miqdarı bir qədər azdır. İstifadə olunan bu üsulun elə çatışmayan cəhəti də burasındadır. Lakin qlükoza miqdarca digər reduksiyaedici maddələrdən dəfələrlə çoxdur. Məhz buna görə alınan nəticəni qlükoza kimi qəbul edirlər.

Məhlulda çökmüş zülalı süzməklə, ayıraraq süzüntüyə müəyyən miqdar titrlənmiş qırmızı qan duzu məhlulu əlavə edib qızdırırlar. Bu zaman qanın reduksiyaedici

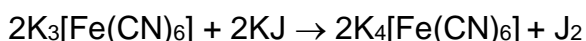
maddələri ekvivalent miqdarda qırmızı qan duzunu sarı qan duzuna qədər reduksiya edir.



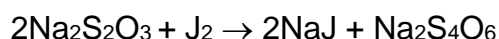
Bundan sonra maye içərisinə sirkə turşusu və sink sulfat (ZnSO_4), kalium yod (KJ) və natrium xlor (NaCl)-dan ibarət qarışıq əlavə edilir. Sink ionu əvvəlcədən əmələ gəlmiş sarı qan duzunu çökdürür.



Beləliklə, sarı qan duzu sonrakı reaksiyalarda iştirak etmir. Sarı qan duzu çökdürülməsə, o oksidləşib qırmızı qan duzuna çevrilə bilər və nəticə düzgün olmaz. Paralel olaraq KJ reaksiyaya daxil olmayan qırmızı qan duzu ilə reaksiyaya girir, bu zaman qırmızı qan duzunun miqdarına ekvivalent olaraq J_2 ayrılır.



Nəhayət ayrılan yod nişastanın iştirakı ilə (indikator sifətilə) hiposulfitlə titrlənir.



Titrlənməyə sərf olunmuş hiposulfitin miqdarı qanın şəkəri ilə reduksiya edilməmiş qırmızı qan duzu ilə ekvivalentdir. Sərf olunan hiposulfitin miqdarını bilərək xüsusi cədvəldən qanda şəkərin miqdarını hesablamaq olar.

Qeyd etmək lazımdır ki, şəkərin təyində istifadə olunan reaktivlər reduksiyaedici qabiliyyətə malikdir. Həmin reaktivlər tərəfindən reduksiya olunmuş qırmızı qan duzunun miqdarını nəzərə almaq üçün kontrol təcrübə qoyulur və alınan nəticədən həmin qiyməti çıxırlar.

Reaktiv və ləvazimat:

1. Sınaq şüşələri və kimyəvi stəkanlar üçün yuvaları olan su hamamı
2. Kimyəvi stəkanlar
3. Qıflar
4. İki ədəd 25-50 ml-lik büretka
5. 2-3 ml-lik mikrobüretka
6. Rezin borulu 0,1 və 0,2 ml lik mikropipetka
7. 2-3 ml-lik pipetkalar
8. Qan götürmək üçün iynə
9. 0,1 N NaOH
10. 0,45 %-li ZnSO_4

11. 0,005 %-li qələvi reaksiyalı qırmızı qan duzu
12. Üçqat məhlul ($ZnSO_4 + KJ + NaCl$)
13. 3 %-li sirkə turşusu
14. 0,005%-li hiposulfit (əlavələ bax 27, 27 A)
15. Doymuş NaCl-da hazırlanmış 1%-li həll olan nişasta
16. Distillə suyunda qaynadılmış və suyu sıxılmış pambıq
17. Etil spirti

İşin gedişi

1. 4 ədəd sınaq şüşəsini nömrələyib hər birinə 5 ml $ZnSO_4$ və 1 ml NaOH tökülür.

2. Sol əlin adsız barmağını (çəçələ yanındakı barmaq) spirtlə isladılmış pambıqla silib spirt quruduqdan sonra sterilizə edilmiş iynə ilə barmağı sancırlar. İynə qismən dərinə getməlidir. Qanın birinci damlasını pambıqla təmizləyib ikinci damlasını mikropipetkaya yığmalı. Mikropipetkanı elə vəziyyətdə tutmaq lazımdır ki, qan özü oraya axsın. Belə mümkün olmadıqda pipetkadan havanı sormaqla qanı yığmalı. Lakin belə etmək lazımdır ki, qan içərisinə hava qabarcığı düşməsin. 0,1 ml qan toplayıb pipetkanın ucunu pambıqla sildikdən sonra qan birinci sınaq şüşəsinə üfürməklə boşaldılır. Qan sınaq şüşəsindən yenidən sorulur və yenidən boşaldılır. Bunu üç dəfə təkrar etməli (pipetka bu yolla yuyulur). Yuxarıdakı qayda üzrə ikinci sınaq şüşəsinə də 0,1 ml qan götürülür. Sonra spirtlə isladılmış pambıqla barmaq silinir. Üç və dördüncü sınaq şüşələri kontrol kimi qalır.

3. Bütün dörd ədəd sınaq şüşəsi üç dəqiqə müddətinə su hamamına yerləşdirilir. Bir azdan zülal çökür. Çöküntünü filtratdan ayırmaq üçün dörd kiçik kimyəvi stəkanı nömrələyib hər birinə içərisinə su ilə yuyulmuş pambıq yerləşdirilmiş qıf qoyulur, hər sınaq şüşəsində olan qarışıq müvafiq nömrəli stəkanlara süzülür. Sınaq şüşələri və müvafiq qıflar iki dəfə 3 ml su ilə yaxalanıb qıfdan süzülür. Bütün stəkanlarda filtrat şəffaf olduqda pambıqlar qıflardan çıxarılır.

4. Hər stəkana pipetka ilə 2 ml qırmızı qan duzu əlavə edib onları 15 dəqiqə müddətinə qaynar su hamamına yerləşdirirlər. 15 dəqiqədən sonra stəkanlar əvvəl havada, sonra suda soyudulur.

Hər stəkana pipetka ilə 3 ml üçqat məhlul və 2 ml sirkə turşusu əlavə edilir. Bununla J_2 ayrılır və məhlul sarı rəngə boyanır. Bu zaman əmələ gəlmiş sarı qan duzu mühitdən çıxarılmış olur. Həmçinin KJ-da olan və reaksiyaya daxil olmayan qırmızı qan duzuna ekvivalent miqdarda sərbəst J_2 KJ-dan sıxışdırılıb çıxarılmış olur.

5. Mikrobüretkanı hiposulfitlə doldurub stəkanlardan biri sarı rəng itənə qədər titrlənir. Sonra stəkana bir damla nişasta əlavə etdikdə məhlul J_2 ilə göy rəngə boyanır. Göy rəng əmələ gələrsə titrləməni davam etdirirlər. Bu zaman stəkanı ağ fonda qoymaq lazımdır. Nişasta əlavə etməzdən əvvəl və sonra sərf olunan hiposulfitin ümumi

miqdarını qeyd edib ikinci stəkani titrləyirik. Alınan rəqəmlərdən istifadə edərək hesablama aparılır. Bir və ikinci stəkana birlikdə sərf olunan hiposulfitin orta qiyməti və eyni ilə üç və dördüncü stəkana sərf olunan hiposulfitin orta qiymətini tapıb şəkərin qiyməti cədvəlindən hesablanır. Tutaq ki, təcrübə variantına (qan olan variantlara) sərf olunan hiposulfitin orta qiyməti 1,34 ml-dir (1,3+0,04) yoxlama variantınıniki isə 1,98-dir (1,9+0,08).

Cədvəl 9

Hipo- sulfit miq- darı, ml-lə	Hiposulfitin miqdarı, $\frac{1}{100}$ ml-lə									
	0,0 0	0,0 1	0,0 2	0,0 3	0,0 4	0,0 5	0,0 6	0,0 7	0,0 8	0,0 9
0,0	38	38	37	37	37	37	36	36	36	35
0,1	5	2	9	6	3	0	7	4	1	8
0,2	35	35	35	34	34	34	34	33	33	38
0,3	5	2	0	8	5	3	1	8	6	3
0,4	33	32	32	32	32	32	31	31	31	31
0,5	1	9	7	5	3	1	8	6	4	2
0,6	31	30	30	30	30	30	29	28	29	29
0,7	0	8	8	4	2	0	8	6	4	2
0,8	29	28	38	28	23	28	27	27	27	27
0,9	0	8	5	4	2	0	8	6	4	2
1,0	27	26	26	26	26	26	25	25	25	25
1,1	0	8	6	4	2	0	9	7	5	3
1,2	25	24	21	21	24	24	24	23	23	23
1,3	1	9	7	5	3	1	0	8	6	4
1,4	23	23	22	22	22	22	22	21	21	21
1,5	2	0	8	6	4	2	1	9	7	5
1,6	21	21	20	20	20	20	20	20	19	19
1,7	3	1	9	8	6	4	2	0	9	7
1,8	19	19	19	19	18	18	18	18	18	17
1,9	5	3	1	0	8	6	4	2	1	9
	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16
	7	5	3	2	0	8	6	4	3	1
	15	15	15	15	15	15	14	14	14	14
	9	7	5	4	2	0	8	6	5	3
	14	13	13	13	13	13	13	12	12	12
	1	9	8	6	4	2	1	9	7	5
	12	12	12	11	11	11	11	11	11	10
	4	2	0	9	7	5	3	1	0	8
	10	10	10	10	99	97	95	93	92	90
	6	4	2	1	81	79	77	75	74	72
	88	86	84	83						

	70	68	66	65	61	61	59	57	56	54
	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

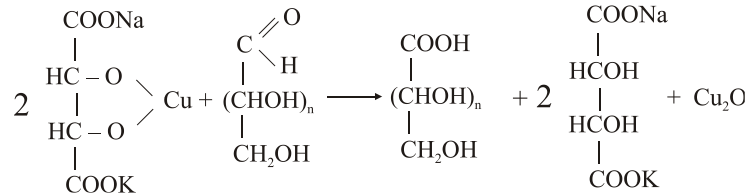
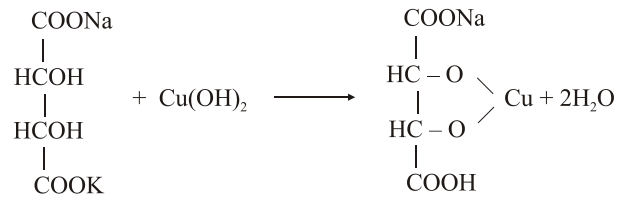
Cədvəldən 1,3 və 0,04 şaquli sətirlərinin kəsişmə nöqtəsində 117 rəqəmini tapırıq, yəni 117 mq % kontrol variant üçün qiymət tapılır. Təcrübədən kontrol variantın qiymətini çıxıb şəkərin qiymətini tapırıq (117-3 = 114 mq/%).

İŞ 59

BERTRAN ÜSULU

(MAKEN-ŞOORLA GÖRƏ MODİFİKASIYA)

Bertran çəki üsulu ilə şəkərlərin miqdarca təyini şəkər nümunəsini Felinq mayesi ilə qaynadarkən mis-1 oksidin (Cu_2O) əmələ gəlməsi və həmin çöküntünün çəkisinin müəyyən edilməsinə əsaslanır. Aldozaların Felinq reaktivi ilə oksidləşmə reaksiyası aşağıdakı sxemlə gedir (iş 48).



Şəkərləri təyin edərkən əmələ gələn mis oksidi, havanın oksigeni ilə asanlıqla oksidləşdiyindən Bertran üsulunun qaydalarının azacıq gözlənilməməsi səhv nəticələrə səbəb olur. Ona görə də hal-hazırda şəkərləri miqdarca təyin etmək üçün Maken və Şoorlun işləyib hazırladıqları daha dəqiq və sadə həcmi analiz üsulu tətbiq edilir. Bu üsulda tərkibində misin miqdarı dəqiq məlum olan Felinq mayesindən istifadə edilərək yodometrik üsulla təyin olunmuş sərf olunmayan misin miqdarına əsasən reduksiya olunmuş misin miqdarı hesablanır.

Maken və Şoorl üsulu şəraiti qlükoza, fruktoza, invert şəkər (saxaroza), laktoza, maltoza, qalaktoza, pentoza, arabinoza, ksiloza və ramnoza üçün eynidir.

Reaktivlər:

1. Tərkibində 34,64 q kristallik mis sulfat olan 500 ml həcmdə su məhlulu.

2. Tərkibində 173 q seqnet duzu və 50 q NaOH olan 500 ml həcmində su məhlulu.

İşin gedişi

250 ml-lik odadavamlı konusvari kolbaya pipetka ilə 10 ml 1-ci, sonra 2-ci məhluldan 10 ml töküb üzərinə tərkibində 100 mq-dan çox təyin olunacaq maddəsi olmayan hər hansı bir maddə və ya şəkər 50 ml-ə çatana qədər distillə suyu əlavə edirik. Məhlul elektroplitə və ya qaz üzərinə yerləşdirilmiş asbest lövhə üzərinə qoyulur. Lövhədə diametri 6 sm-ə yaxın dairə çəkilir. Qarışıq üç dəqiqə ərzində qızdırılıb dəqiq 2 dəqiqə aramla qaynadılır ki, kolbada olan məhlulun həcmi azalmasın. Bunun üçün kolbanın ağzına kiçik qıf qoymaq olar.

Qaynatma qurtardıqdan sonra kolba soyuq su ilə 25°C-yə qədər soyudulur və üzərinə 10 ml suda və 10 ml 25%-li sulfat turşusunda (1 həcm turşu, 6 həcm su) 3 q kalium yodid həll edilmiş qarışıq əlavə edilir (cəmi 20 ml). Yuxarıdakı qarışıqdan həmin nisbətdə nümunələrin sayına müvafiq hazırlamaq olar. Qarışıq əlavə edilən kimi aramsız qarışdıraraq kolbadakı məhlulu 0,1 N Na₂S₂O₃-lə (natrium tiosulfit) qəhvəyi rəng sarıya keçənə qədər titrəliyirik. Kolbaya 10 ml 0,5-11%-li nişasta töküb dərhal titrləməni göy rəng tam itənə qədər davam etdiririk. Məhlulun rəngi mis yodidə məxsus sarımtıl (krem rəngi) qalır.

Tamamilə eyni qayda üzrə lakin şəkərsiz kontrol təcrübəsi aparılır. Yoxlamaya sərf olunan natrium tiosulfitin miqdarından (ml) birinci təcrübə variantına sərf olunan Na₂S₂O₃ çıxılır. Alınan nəticəyə əsasən aşağıdakı cədvəldən şəkərin miqdarı hesablanır (cədvəl 10). Saxarozanın miqdarını təyin etmək üçün məhlul əvvəlcə inversiyaya uğradılır. Bunun üçün 5 q şəkər, 50 ml HCl-da həll edilir (5%). Məhlul 30 dəqiqə qaynar su hamamında qızdırılır. Soyudulduqdan sonra 1 ml 1 N NaOH-la neytrallaşdırıb 500 ml-ə qədər qatılığı azaldılır. Sonra lazımı miqdar məhlul götürüb yuxarıdakı qayda üzrə analiz edirik. Alınan nəticə ümumi həcmə hesablanır.

Cədvəldə hər vertikal sıranın sağında (qlükozadan başlayaraq) ikinci sıra rəqəmlər verilmişdir. Bu rəqəmlərdən sərf olunan natrium tiosulfitin ml-lə miqdarı qeyri tam (kəsri) ədəd olduqda istifadə edilir.

Məsələn, qlükoza məhluluna titrləmə zamanı 3,5 ml Na₂S₂O₃ sərf edilmişdir. Onda qlükozanın miqdarı belə hesablanır: 3 ml Na₂S₂O₃ 19,1 mq misə və ya 9,4 ml qlükozaya uyğun gəlir. 9,4-dən sonra sağda 3,2 yazılmışdır, fərq 0,5 qədərdir. Bu zaman

$$\text{qlükozanın miqdarı} = 9,4 \frac{3,2}{2} = 11 \text{ mq olur.}$$

Alınan cavab kolbaya götürülmüş nümunədə olan şəkərin miqdarıdır. Bu miqdara əsasən ümumi çəkiyə, həcmə və s. görə şəkəri %-lə hesablamaq olar.

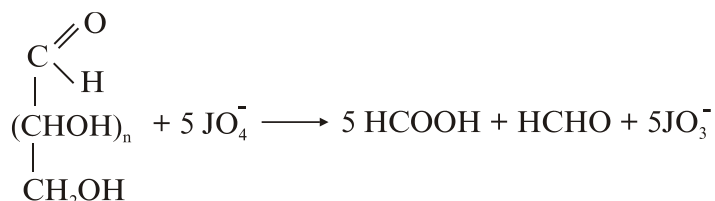
İŞ 60

ŞƏKƏRLƏRİN MIKROKİMYƏVİ

ÜSULLA TƏYİNİ

Şəkər molekulları peryodat-ionla oksidləşərək qarışıq turşusu əmələ gətirir. Alınan turşunu titrləmək olar.

Hamar, şüşə tıxacı olan ölçüsü 22×3 sm-lik sınaq şüşəsinə 0,2-3 mq şəkər götürüb onu 5 ml suda həll etdikdən sonra 0,25 N NaJO₄-lə oksidləşdiririk (belə məhlulun 1 ml-i 3,9 mq şəkəri oksidləşdirir).



Alınan qarışıq 100°C-də 20-40 dəqiqə qızdırılır. Soyutduqdan sonra sınaq şüşəsinə 0,2 ml NaOH üzərində qovulmuş etilenqlikol tökürük (periyodatın artığını parçalamaq üçün).

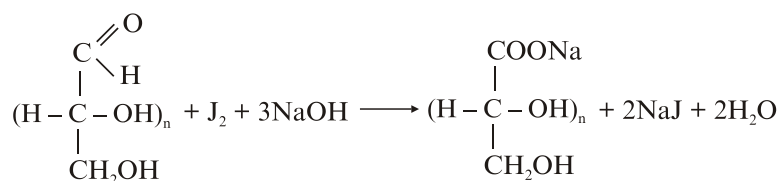
Məhlul qırmızı metil indikatorunun iştirakı ilə 0,01 N NaOH-la titrlənir. Titrləmənin nəticəsinə əsasən şəkərin pentoza, metilpentoza, aldoheksoza, 2-ketoheksoza siniflərinə aid olması müəyyən edilir. 1 mol. oksidləşən monoşəkərə pentoza və metilpentozalar 4 mol., aldoheksozalar - 5 mol., fruktoza və sorboza 3 mol. qarışıq turşusu əmələ gətirir.

İŞ 61

VİLŞTETTER VƏ ŞEDER ÜSULU İLƏ

ALDOZALARIN MIQDARCA TƏYİNİ

Üsul hipoyoditin qələvi məhlulun köməyiylə aldozaların aldon turşularına çevrilməsinə əsaslanır.



Tıxaclı 250 ml-lik kolbaya tərkibində 1%-dən çox aldoza olmayan 10 ml şəkər, 25 ml 0,1 N J₂ qarışdırma-qarışdırma 30 ml 0,1 N NaOH tökülür. Kolbanı bağlayıb 10-15 dəqiqə saxladıqdan sonra 4 ml 1 N H₂SO₄-lə məhlul turşulaşdırılır. Ayrılan J₂-ni 0,1 N Na₂S₂O₃-lə nişastanın iştirakı ilə titrləyirik. Aldozanın miqdarı (və ya aldehid qrupuna ekvivalent miqdar) əlavə olunan yodla (bizim misalda 0,1 N 25 ml J₂) ayrılan J₂-nin (titrləməyə əsasən) fərqinə görə hesablanır. Qələvinin artığı çox deyilsə oksidləşməyə dəqiq 2 q-ekvivalent J₂ sərf olunur.

Bu üsulla müxtəlif aldozaların miqdarını tez təyin etmək olar. Məhlulda saxaroza və fruktozanın olması aldozanın təyin olunmasına mane olur. Analizin dəqiqliyinə qeyri-üzvi duzlar çoxatomlu spirtlər təsir göstərmirlər.

İŞ 62

ŞƏKƏRLƏRİN XROMATOQRAFIYASI

(Analitik üsullar)

Müxtəlif şəkərlərin tədqiqi və sintezi xromatoqrafiyanın tətbiqindən sonra geniş inkişaf etməyə başlamışdır.

Aşağıda təsvir edəcəyimiz kağız və nazik təbəqəli xromatoqrafiya üsulları alınan maddələrin təmizliyini aşkar etmək və şəkər formalarını müəyyənləşdirmək üçün analitik kimyada istifadə olunan müasir üsullardır.

Şəkərlərin kağız üzərində xromatoqrafiyası

Bu üsulda kağız sellülozada adsorbsiya olunmuş qeyri mütəhərrik faza - suyun daşıyıcısı vəzifəsini görür. Mütəhərrik faza sifətilə su ilə üzvi həlledicilərin qarışıqları istifadə olunur. Şəkərlərin ayrılması üçün aşağıdakı həlledicilər tətbiq edilir:

1. Butanol sirkə turşusu : su (4:1:5)
2. Butanol : etanol : su (45:5:50)
3. Su ilə doydurulmuş fenol
4. Su ilə doydurulmuş butanol
5. Piridin : amil spirti : su (35:35:30)
6. Butanol : piridin : su (5:4:3)
7. Etilsirkə turşusu : sirkə turşusu : su (3:1:3)
8. Etilsirkə turşusu : piridin : su (4:2:4)
9. Butanol : etanol : su (4:1:1)
10. Butanol : sirkə turşusu : su(4:1:1)

Bəzi həlledicilərin hazırlanması üsulları.

Butanol : sirkə turşusu : su (4:1:5). Bu həlledici yuxarıya doğru hərəkət edən xromatoqrafiya üçün tətbiq edilir. Həlledicini 1,5 litrlik bölücü qıfda 400 ml n-butanol, 100 ml buzlu sirkə turşusu və 500 ml distillə suyunu yaxşı qarışdırmaqla hazırlayırlar. Bir qədər keçdikdən sonra qarışıq 2 fazaya ayrılır ki, fazanın aşağı qatı kənara boşaldılır. Qalan həlledici bulandıqda qıfa şəffaf rəng alınana qədər damla-damla sirkə turşusu

əlavə etmək lazımdır. Məhlul çox saxlandıqda qıfın dibində su təbəqəsi əmələ gəlir ki, onu da boşaltmaq lazımdır.

Etil sirkə turşusu : piridin : su (4:2:4). Bölücü qıfda 200 ml etilsirkə turşusu, 100 ml piridin və 200 ml distillə edilmiş su yaxşıca qarışdırılır. Təbəqələr ayrıldıqdan sonra aşağı təbəqə boşaldılır. Yuxarı təbəqə isə aşağıya doğru hərəkət edən xromatoqrafiya üçün tətbiq edilir.

Kağız. Şəkərləri ayırmaq üçün adətən 1 və 2 nömrəli xromatoqrafiya kağızı tətbiq edilir. Düzgün əməliyyat aparmaq üçün götürülmüş kağızda kapilyarların vəziyyətini təyin etmək lazımdır. Bunun üçün kağızın kənarlarından başlayaraq qarşılıqlı perpendikulyar istiqamətdə eni 4 mm, uzunluğu 70-75 mm zolaq kəsilir. Əgər kapilyarlar zolağın uzunluğuna, yəni perpendikulyar vəziyyətdə yerləşmişsə kənarından tutulmuş zolaq öz ağırlığı nəticəsində əyilmir. Kapilyar horizontal vəziyyətdə olduqda zolaq qövs şəklində əyilir.

Xromatoqrafiya zamanı maddənin əsas səciyyəvi xüsusiyyəti mütəhərriklik əmsali R_f -dir. R_f maddənin keçdiyi yolun həlledicinin keçdiyi yola nisbətini ifadə edir. Mütəhərriklik əmsalı, şəkərlərin quruluşu, həlledicinin tərkibi, kağızın keyfiyyəti, mühitin temperaturu və digər amillərdən asılıdır. Müxtəlif şəkərlər üçün R_f qiyməti aşağıdakı cədvəldə verilir.

Cədvəl 11

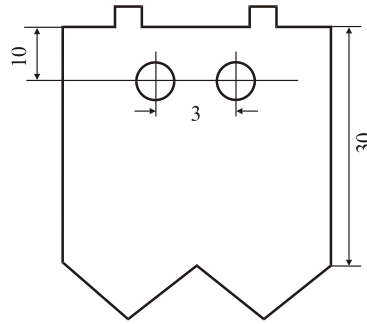
Müxtəlif qatışıqlarda monoqarlar üçün R_f -in qiymətləri

Mono-şəkərlər	Q a t ı ş ı q l a r	
	etilsirkə t : su : : piridin : su (2 : 1 : 2)	butanol : sirkə turşusu : su (4 : 1 : 5)
arabinoza	0,23	0,56
ksiloza	0,28	0,76
riboza	0,33	0,84
ramnoza	0,36	1,0
qalaktoza	0,175	0,41
qlükoza	0,195	0,49
mannoza	0,24	0,62
fruktoza	0,24	0,62

Ramnoza üçün 0,37-yə bərabər R_f vahid qəbul edilmişdir. Yarımşpirtlər üçün propanol : etilsirkə turşusu : su (7:1:2) qarışığı tətbiq edildikdə R_f 0,11 (inozit), 0,31 (sorbit, dulsit), 0,44 (arabit), 0,34 (mannit), 0,58 (qliserin) olur. Bir ölçülü yuxarıya doğru hərəkət edən xromatoqramma almaq üçün kapilyarları vertikal vəziyyətdə yerləşmiş

uzunluğu 40-50 sm olan xüsusi kağız götürülür. Kağızın eni onun üzərinə yerləşdirilmiş nümunələrin sayından asılıdır. Kağızın kənarından ensiz hissə boyu bir-birindən 2,5-3 sm aralı qara karandaşla (kimyəvi karandaş olmaz) başlanğıc (start) xətti çəkilir. Xromatoqrafiya üçün başlanğıc xətt üzərinə qatılığı 0,1-1% olan 0,01 ml şəkər məhlulu kapilyar pipetka ilə 1 damla yerləşdirilir. Şəkər 50-80% -li etanolda hazırlanır. Damla ləkəsinin diametri 5-6 mm-dən çox olmamalıdır. Ləkələr arasındakı məsafə 2-3 sm olur. Bu əməliyyatdan sonra kağız qurudulur. Sonra kağız dibində həlledici olan (məsələn, 60 ml butanol - sirkə turşusu - su 40:10:50 nisbətində) hermetik bağlı qaba yerləşdirilir. Bu zaman zolaq qabın divarlarına dəyməməli və ucu damcılar yerləşən xəttədən aşağı həllediciyə salınmalıdır. Kağızın kənarına qədər həlledicinin qalxmasına yol vermək olmaz. Proses adətən 15-20 saat davam edir. Sonra kağız zolağı qabdan çıxarılıb qurudulur və şəkərlər aşkar edilir.

Aşağı doğru hərəkət edən xromatoqrama almaq üçün kağız zolağını horizontal vəziyyətdə yerləşmiş kapilyarlar boyu uzununa kəsmək lazımdır. Nümunələr üzərinə kənarından 10 sm məsafədə yerləşdirilir. Kağızın aşağı hissəsi həlledicinin axması üçün dişciklər şəklində kəsilir (şəkil 7).



Şəkil 7

İri ölçülü şüşə silindr içərisinə kiçik başqa silindr yerləşdirib üzərinə həlledicisi olan Petri qabları qoyulur. Qabın içərisinə məhlula ensiz kəsikli ucları olan kağız salıb üzərinə saat şüşəsi yerləşdirilir (kağızın düşməməsi üçün). Nümunə nişanı qoyulmuş nöqtələr həllediciyə çatmamalıdır. İri silindrin dibinə içərisində həlledici olan stəkanlar yerləşdirilir. 1 nömrəli kağızda xromatoqrafiya 30-40 saat davam edir. Sonra kağız qurudulur və müəyyən üsulla tədqiq olunan maddələr aşkar edilir.

Mürəkkəb birləşmələri fraksiyalara ayırmaq üçün eyni kağız zolağına analiz olunan qarışıqda tapılacağı güman edilən maddələr (müəyyənləşdirici maddələr) damcı vasitəsilə yerləşdirilir. Müəyyənləşdirici (başqa sözlə, bu maddələr "şahidlər" də adlanır) tədqiq olunan maddə ləkələrinin hər iki tərəfindən çıxış xətti üzərinə damcı vasitəsilə yerləşdirmək məsləhətdir. Bəzi hallarda mürəkkəb maddə çətin ayrılırsa xromatoqrafiya əməliyyatı təkrarlanır. Bunun üçün birinci əməliyyatdan sonra kağız qurudulur (maddələr aşkar edilmədən), ikinci dəfə xromatoqrafiya əməliyyatı aparılır və yalnız bundan sonra şəkərlər aşkar edilir.

Reduksiyaedici və reduksiya etməyən karbohidratlar

üçün ümumi aşkaredicilər

Ammonium molibdenat: 3 ml qatı xlorid turşusu üzərinə qarışdıraraq-qarışdıraraq 20 ml 10%-li ammonium molibdenat əlavə etməklə reaktiv hazırlanır. Sonra reaktivə 5 q ammonium xlorid tökülür. 70°C-də 20 dəqiqə müddətdə qurudulur, nəticədə ağ fonda abı ləkələr alınır.

Şəkərlərin qurğuşun tetraasetatla aşkar edilməsi

Benzolda 1 q qurğuşun tetraasetat həll edilir. Lazım gəldikdə məhlul fəallaşdırılmış ağac kömürü vasitəsilə ksilol, sonra isə hazırlanmış məhlulla çilənir. Bir neçə dəqiqədən sonra qəhvəyi fonda ağ ləkələr əmələ gəlir.

$\text{KMnO}_4 - \text{NaJO}_4$ vasitəsilə aşkar edilmə.

2%-li NaJO_4 və 2%-li natrium karbonatın suda məhlulunda 1%-li KMnO_4 hazırlayıb iş zamanı məhlullar (4:1) nisbətində ($\text{KMnO}_4 - 1$ həcm, $\text{NaJO}_4 - 4$ həcm) qarışdırılır. Çiləndikdən sonra kağız otaq temperaturunda 10-15 dəqiqə saxlanılır. Nəticədə şəkərlərin sarı-yaşıl ləkələri əmələ gəlir.

Reduksiyaedici şəkərlər üçün ümumi aşkaredicilər

Gümüş nitratın amonyaklı məhlulu. 5%-li gümüş nitrat üzərinə damla-damla qatı NH_4OH əmələ gələn çöküntü həll olana qədər əlavə edilir. Məhlulu daim iş zamanı təzə hazırlayıb işin sonunda artığını tullamaq lazımdır. Əks halda məhlul uzun müddət qaldıqda partlayıcı fulminatlar əmələ gələ bilər. Yuxarıdakı qarışıqla xromatoqramı çiləyib kağızı quruducu şkafda 100-110°C-də 10-15 dəqiqə saxlayırlar. Nəticədə zəif qəhvəyi fonda tünd ləkələr əmələ gəlir.

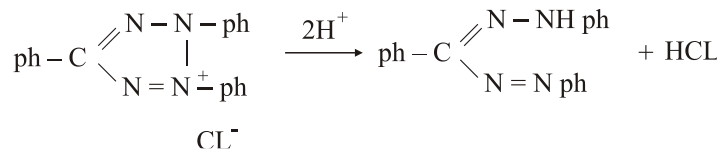
Gümüş nitrat və NaOH məhlulu. Xromatoqrammanı aşkar etmək üçün 2 məhlul hazırlanır:

1 məhlul - 20 ml asetona 0,1 ml gümüşün suda doymuş məhlulu töküüb üzərinə həll olana qədər damla-damla su əlavə edilir.

2 məhlul - 4 ml suda 2 q NaOH həll edilmiş məhluluna 100 ml etanol əlavə edilir.

Qurudulmuş xromatoqrama birinci məhluldan cəld keçirilərək qurudulur və ikinci məhlulla çilənir. Bərpa olunma qurtardıqdan sonra qismən nəm xromatoqrammanı 15 dəqiqə müddətinə 15%-li hiposulfit məhluluna salmaqla gümüş nitratın artığı çıxarılır. Sonra axar suda 1 saat müddətində xromatoqrama yuyulur. Əmələ gələn qəhvəyi və ya qara ləkələrin aydın olması üçün xromatoqrammanı H_2S məhluluna salmaq olar. Bu üsul həmçinin poliolları müşahidə etmək üçün də yararlıdır.

Trifeniltetrazolxlorid. Üsul trifeniltetrazolxloridin rəngsiz duzunun rəngli həll olmayan formazana qədər aşağıdakı tənlik üzrə reduksiya olunmasına əsaslanır.



Hər gün 1 N HCl-da təzə 0,5-2%-li trifeniltetrazolxlorid məhlulu hazırlanır. Xromatoqramma çilənir, 5 dəqiqə müddətində qararıqlıqda 100°C-də qızdırılır. Trifeniltetrazolxloridin artığı suda çoxlu yumaqla kənar edilir. Əmələ gələn rəng piridin vasitəsilə ekstrak-siya olunub intensivliyi 490 nm-də ölçülür (spektrofotometrde).

Anilinfalat. Su ilə doydurulmuş 100 ml etanol və ya butanolda 1,66 q ftal turşusu və 0,93 q qovulmuş anilin həll edilir. Alınmış məhlulla xromatoqramma çilənir, 20 dəqiqə ərzində 100°C-də qızdırılır, nəticədə aldopentozalar parlaq albalı-qırmızı, aldoheksozalar isə qırmızı-qəhvəyi rəng əmələ gətirirlər. Reaktiv, ketozalara nisbətən aldozalar üçün daha həssasdır.

Müxtəlif siniflərə məxsus şəkərlər üçün aşkaredicilər

Rezorsin nümunəsi. Etanolda həll edilmiş 1%-li rezorsinin 10 ml-i üzərinə 90 ml 2 N HCl əlavə edib qarışdırırıq. Xromatoqramma alınan məhlulla çilənib 85-90°C-də 10 dəqiqə qurudulur. Cəhrayı fonda ksiloza və arabinoza - göy, ramnoza - sarı, qalaktoza, qlükoza, mannoza - boz rəng verir.

Anizidin nümunəsi. 2 ml qatı sulfat turşusuna 0,5 q p-anizidin əlavə edib 50 ml spirtlə qarışdırırıq. Alınan qarışıqla xromato-qrammanı çiləyib, 3-5 dəqiqə ərzində 95°C-də qızdırırıq. Bu zaman aldopentozalar - tünd qəhvəyi, aldoheksozalar - zəif qəhvəyi, uron turşuları - qırmızı, heksulozalar - sarı limon rəngi verir.

β - naftilamin və dəmir ionu (Fe³⁺) nümunəsi. 50 ml 95%-li etanolda 100 mq β - naftilamin həll edib üzərinə 50 ml butanol, 0,4 ml 3,8 N HCl və 1 damla 10%-li dəmir sulfat əlavə edilir. Xromatoqrammanı çiləyib, 10 dəqiqə 160-170°C-də quruduruq. Fruktuza sarı, sarı-çəhrayı, pentozalar - çəhrayı-qırmızı, metilpentozalar - zəif sarı, heksozalar - açıq qəhvəyi rəng verir.

p-dimetilaminobenzaldehyd nümunəsi. 1%-li p-dimetilaminobenzaldehyd (etanolda) qatı HCl-da 4:1 nisbətində qarışdırılır. Alınan qarışıqla xromatoqramma çilənir və 30 saniyə müddətində 90°C-də qızdırılır. Dezoksişəkərlər və qlikanlar göy və ya boz rəngə boyanır. Qlikanlar adətən əvvəlcə çəhrayı rəng verir.

Hidroksilamin nümunəsi. 1 N hidroksilamin (turş xassəli) metil spirtində və 1,1 N KOH-ın, həmçinin metil spirtində məhlulların bərabər həcmdə qarışdırıb həmin qarışıqla xromatoqrammı çiləyir və havada 10 dəqiqə ərzində qurutduqdan sonra tərkibində 1% FeCl₃ və 1% HCl olan qarışıqla yenidən çiləyirik.

Əgər maddə sərbəst turşu halında olarsa əmələ gəlməzdən əvvəl onu eterifikasiya edirlər. Bunun üçün içərisinə diazometanın efir məhlulu qoyulmuş bağlı qabda xromatoqramma alınır. Metil efiri 10-15 dəqiqə ərzində əmələ gəlir. Laktonlar aldon və uron turşularının efirləri göy və ya al ləkələr əmələ gətirir.

Orsin nümunəsi. Su ilə doymuş 100 ml butil spirtində 0,5 q orsin (3,5 dioksitoluol) və 15 q 3-xlorsirkə turşusu həll edilir. Reaktiv soyuducuda 1 sutka qala bilər.

Xromatoqramma alınan məhlulla çilənib 20 dəqiqə ərzində 105°C-də qurudulur. Heptulozalar - göy, pentulozalar göy-yaşıl, heksulozalar sarı rəng əmələ gətirir. Aldoheksozalar, uron turşuları və oksiturşular rəng vermir.

Anilinüçxlorsirkə turşusu nümunəsi. 8,5 N 3-xlorsirkə turşusunun suda məhlulundan 32 ml və 50 ml soyudulmuş mibbi spirt götürüb qarışdırır və məhlulu buz üzərinə yerləşdirib üzərinə 8 ml soyudulmuş rəngsiz anilin əlavə edirik. Qarışığı 100 ml soyudulmuş tibbi spirtlə qarışdırırıq. Alınan məhlulla xromatoqramma çiləndikdə şəkərlər rəngli ləkələr əmələ gətirir. Poliollar isə rəng vermir. Nümunə poliolları ayırmaq üçün istifadə edilir.

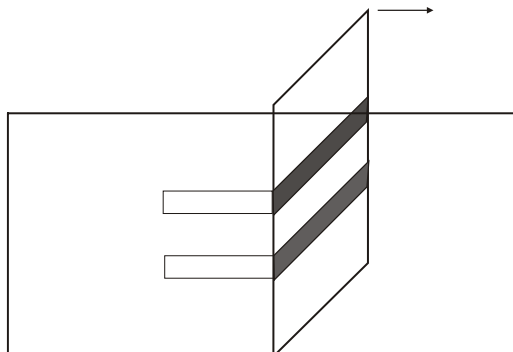
İŞ 63

ŞƏKƏRLƏRİN NAZIK QATLI

XROMATOQRAFIYASI

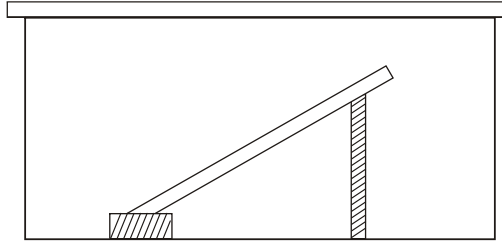
Son illər ərzində N.K.Koçetkov və əməkdaşları tərəfindən təklif olunan bu üsullar şəkərlərin kimyasının öyrənilməsində geniş tətbiq edilir.

Xromatoqrafiya uzunluğu 20 sm olan kənarları hamarlanmış şüşə lövhə üzərində aparılır. Lövhə üzərinə dörd qat məsaməli kaprondan ələnmiş 1 mm qalınlığında alüminium oksidi çəkilir. Hamar təbəqə (qat) almaq üçün üzərlərinə lazımı qalınlığı olan rezin həlqə keçirilmiş şüşə boru və ya lövhədən istifadə edilir (şəkil 8).



Şəkil 8

Xromatoqrafiya üçün Brokmana görə ikinci dərəcəli aktivliyə malik olan alüminium oksidindən istifadə olunur. Maddə lövhə üzərinə aşağı kənarlarından 3-4 sm, bir-birindən 1,5-2 sm aralı vəziyyətdə yerləşdirilir. Xromatoqrafiya əməliyyatını yuxarı doğru hərəkət etmə üsulu ilə aparırıq. Bunun üçün hermetik kamerada lövhə 15-20° bucaq altında qoyulur: həlledici bilavasitə kameraya tökülə bilər və ya Petri qabında yerləşdirilə bilər (şəkil 9).



Şəkil 9

Xromatoqrafiya əməliyyatı təxminən 20 dəqiqə çəkir. Sonra pulverizatorun köməyi ilə lövhə qatı H_2SO_4 -lə çilənib infraqırmızı lampa ilə qızdırılır. Alüminium oksidin açıq fonunda kömürlənmiş şəkərlərin tünd ləkələri əmələ gəlir. Bu üsulun dəqiqliyi 10 mq-a bərabərdir.

İş üçün aşağıdakı həlledicilər istifadə olunur:

- A. Petrolein efiri : benzol (1:1)
- B. Benzol
- C. Xloroform
- Ç. Xloroform : metanol (19:1)
- D. Xloroform : etanol (49:1)
- E. Benzol : xloroform (2:3)
- Ə. Benzol : metanol (9:1)
- F. Etilsirkə turşusu
- G. Xloroform : metanol (1:1)

Hidroksil qrupları tamamilə əvəz edilmiş şəkərlər üçün A və B həllediciləri tətbiq edilir. Tərkibində bir (OH) qrupu olan şəkərlər üçün C, Ç, D, E, Ə, 2 və çox hidroksili olan şəkərlər üçün isə C, Ç, F, G həllediciləri tətbiq edilir. Hidroksilləri tam əvəz edilmiş α formalar üçün B, C, Ç, D, merkaptanlar üçün A, B, C həllediciləri tətbiq edilir.

Sərbəst (OH) qrupu olan şəkərlər və törəmələri üçün xromatoqrafiya əməliyyatında aşağıdakı həlledicilər sistemi işlədilir.

1. Etilsirkə : n:propanol : su (10:2:1),
 2. Etilsirkə : n:propanol : su (20:7:4),
 3. Etilsirkə : n:propanol : su (10:5:3).
- Aşkaredici - qatı sulfat turşusudur.

Sellüloza üzərində nazik qatlı xromatoqrafiya

Əvvəlcə sellüloza tozu hazırlanır. Bunun üçün 800 q pambıq sellülozu tibbi etanolda hazırlanmış 5 l 10 %-li HCl məhlulunda 20-25 dəqiqə qaynadılır, əvvəlcə su ilə sonra metanolla yuyulub havada qurudulur.

Alınmış sellüloz poroşokundan 5 q götürüb, 0,3 q gips və 15 ml su ilə qarışdırıb pasta hazırlanır. Alınmış pasta ölçüsü 13x18 sm olan şüşə lövhə üzərinə çəkilib 5-10 saat ərzində otaq temperaturunda və 45 dəqiqə - 104-106°C qurudulur. Belə təbəqə çiləmə zamanı tökülmür. Rf-in kənarlanması 5 %-dən çox deyildir.

Aşağıdakı həlledicilər sistemi tətbiq edilir:

1. Tret-butanol : n-propanol : su (8:2:3)
2. Tret-butanol : etilsirkə : su (6:13:3)
3. Flüor-butanol : etilsirkə : su (8:12:3)
4. Propanol : 2-etilsirkə : su (25:65:11)
5. n-butanol : piridin : su (7:2:1)
6. Aseton : butanol : su (7:2:1)
7. Propanol : etilsirkə : su (15:2:3)

Çoxatomlu spirtlərin qarışığı yuxarıdakı sistemlərdə və aşağıdakılarda yaxşı ayrılırlar:

1. n-butanol : 25 %-li NH₄OH : su (15:1:2)
2. n-butanol : piridin : su (6:4:3)
3. n-butanol : etanol 25 %-li : NH₄OH : su (8:3:1:8).

Aldozaları aşkar etmək üçün: 1.Anilinfталat. 2.Anilin-difenilaminfosfor turşusu işlədilir.

Silikagel üzərində nazik qatlı xromatoqrafiya

KSK (150-200 Meş) markalı silikagelin 6 q-ın 0,35 q gips və 15 ml su ilə qarışdırılaraq pasta hazırlanır. Pasta şüşə lövhəyə sürtülüb 6-12 saat havada (otaq temperaturunda) və 40 dəqiqə 104-106°C-də qurudulur.

Ayrırma əməliyyatını aşağıdakı həlledicilər sistemində aparırlar:

1. Metanol : xloroform (1:9)
2. Etanol : su (95:5)
3. Etanol : ammoniyak : su (15:1:3)

1-ci sistem çoxatomlu spirtləri, 2-ci və 3-cü isə mono- və disaxaridləri, həmçinin polioksiturşuları ayırmaq üçün tətbiq edilir.

Aşkaredici kimi kağız xromatoqrafiyasında tətbiq edilən reagentlər:

1. AgNO₃-un ammoniyaklı məhlulu
2. Kalium permanqanat : natrium-peryodat
3. Qurğuşun tetrasetat (sonradan rozanilinlə işlənmiş)
4. Kalium peryodat benzidinlə (qeydə bax)

QEYD: Xromatoqramma metaperiodatın suda məhlulu ilə işlənir. 6 dəqiqə saxladıqdan sonra 0,1 M benzidinin 50 %-li metanol : aseton : 0,2 N HCl qarışığında (10:2:1) işlənir. Sərbəst α-qlikol qrupları birləşmələr xromatoqrammada göy fonda ağ ləkələr əmələ gətirir.

Şəkərlərin gips üzərində nazik qatlı

xromatoqrafiyası

Çini həvəngdə 10 q közərdilmiş kalsium sulfat və 20 ml distillə edilmiş su 5-7 dəqiqə ərzində homogen kütlə alınana qədər əzilir. Alınan pasta 6x18 sm ölçülü şüşə lövhəyə nazik qatla sürtülür və otaq temperaturunda 20 saat qurudulur. Bu yolla alınmış gips təbəqəsi möhkəm olur.

Monoşəkərlər üçün xloroform : metanol (19:2), xloroform : metanol (19:3), disaxaridlər üçün xloroform-metanol (19:5) qarışıqları tətbiq edilir.

Süni yolla hazırlanmış şəkər qarışıqları gips lövhələrində yaxşı ayrılır. Bunun üçün şəkərlərin spirtdə 1%-li məhlullarını 1:1 nisbətində qarışdırmaq olar.

D-qlükoza : L-ramnoza

L-arabinoza : D-qalaktoza

D-arabinoza : D-qalaktoza

L-ramnoza : D-mannoza

Qarışıqları xloroform : metanol (19:2) həlledicisi ilə ayıraraq natrium metaperiodat və kalium permanqanatın qələvi məhlulları vasitəsilə aşkar edirlər.

10 ml 2 %-li natrium karbonatın suda məhluluna 40 ml 2%-li natrium metaperyodat töküb alınan qarışıqda 0,5 q kalium permanqanat həll edilir. Çiləndikdən sonra xromatoqramma otaq temperaturunda 15-20 dəqiqə ərzində saxlanılır. Nəticədə sarı fonda sadə şəkərlərin sarı ləkələri əmələ gəlir.

III BÖLMƏYƏ AID SUALLAR

1. Müəkkəb maddələrin tərkibindəki karbohidratları hansı reaksiya ilə aşkar etmək olar? Reaksiyanın tənliyini yazın.
2. Şəkərlərin reduksiyaetmə qabiliyyəti nə deməkdir?
3. Hansı şəkərlər reduksiyaetmə qabiliyyətinə malikdirlər və nə üçün?
4. Trommer sınağının mahiyyəti nədən ibarətdir?
5. Seqnet duzu və Felinq mayelərinin iştirakı ilə sadə şəkərlərin reduksiyaetmə tənliyini yazın.
6. Hansı reaksiya ilə monoşəkərləri disaxaridlərdən ayırmaq olar?
7. Nilander və gümüş güzgü reaksiyalarının tənliyini yazın.
8. Selivanov reaksiyası hansı şəkərlər üçün xarakterikdir? Bu reaksiyanın tənliyini yazın.
9. Pentozalara aid hansı xarakterik reaksiyaları bilirsiniz?
10. Nə üçün saxaroza reduksiya etmir? İnversiya nə deməkdir?
11. Hansı reaksiya yalnız monoşəkərlər üçün xarakterikdir?
12. Şəkərlərin qələvi və törəmələrinin turş mühitdə kondensə reaksiyalarına misal göstərin.
13. Tollens və dinitrobenzolda reaksiyaların mahiyyəti nədir?

14. İkinci dərəcəli poliozalar hansılardır?
15. Nişastanın hidroliz məhsulları hansılardır? Bu məhsulları necə müşahidə etmək olar?
16. Qlikogen və inulini necə aşkar etmək olar?
17. Fenilhidrozin sınağının tənliklərini yazın.
18. Tindal hadisəsini hansı şəkərlərdə və necə müşahidə etmək olar?
19. Qıcqırma nədir və onu hansı təcrübə ilə müşahidə etmək olar?
20. Qıcqırmanı necə tormozlandırmaq və bərpa etmək olar?
21. Optiki aktivlik nə deməkdir və onu necə müşahidə etmək olar?
22. Mutarotasiya nədir? Bu hadisəni göstərən təcrübəni təsvir edin.
23. Şəkərlərin aralıq mübadiləsində əmələ gələn metabolitlərin bioloji mənası nədir? Bu metabolitlər hansılardır?
24. İnsan orqanizmində nişasta necə həzm olunur?
25. Uffelman nümunəsi təcrübəsini təsvir edin.
26. Süd turşusunun əmələ gəlməsini hansı təcrübə ilə müşahidə etmək olar?
27. Şəkərləri miqdarca təyin etmək üçün hansı üsullar sizə məlumdur və bu üsulların mahiyyəti nədən ibarətdir? Bertran üsulunun mahiyyətini izah edin.
28. Müxtəlif şəkər formalarını mikroüsulla necə aşkar etmək olar?
29. Aldozalara aid miqdarı analizin mahiyyəti nədir?
30. Hansı xromatoqrafiya üsulları müvcuddur və onların mahiyyəti nədən ibarətdir?
31. Reduksiya edən və reduksiya etməyən karbohidratlar üçün xarakterik aşkaredicilərə misal göstərin.
32. Şəkərlərin digər siniflərinə aid aşkar edicilərə misal göstərin.
33. Şəkərlərin nazik qatlı xromatoqrafiyasına aid analitik üsullar hansılardır?

IV BÖLMƏ

LIPIDLƏR

Lipidlər - yağlar və yağabənzər (lipoid) maddələri bir-ləşdirən termin olsa da, lipidlərin təsnifatı bir çox cəhətdən çətinlik törədir və müxtəlif növ təsnifat növünün meydana çıxmasına səbəb olmuşdur. Lakin lipidlər aşağıdakı mühüm tələblərə cavab verməlidir. 1. Bioloji mənşəli olmalı. 2. Qeyri-polyar mayelərdə həll olmalı, suda isə həll olmamalıdır. Başqa sözlə, lipidlər hidrofob maddələrdir. 3. Lipidlərə yüksək alkil radikallar və ya karbosikllərin olması səciyyəvidir. Eyni zamanda lipidlərin struktur, fiziki-kimyəvi və bioloji və ya fizioloji təsnifatları da mövcuddur.

Mövzunun geniş olduğunu və təqdim olunan praktikumda lipidlərə az yer verməli olduğumuzu nəzərə alsaq, lipidlərin təsnifatı burada müzakirə olunmur. Təkcə onu qeyd edək ki, lipidlərin mühüm tərkib hissəsi (asil lipidlərin) olan yağ turşularının (200-dən çox) özü əsas və ya doymuş, iki qrupa bölünən ikinci dərəcəli yağ turşuları (mono- və polien) və qeyri-adi yağ turşularına bölünür.

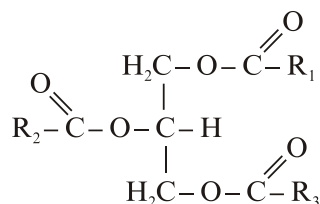
II böyük qrup neytral lipidlər - qliserol (trihidroksi spirt və ya qliserin) və yağ turşularının efirləri olan asilqliserollardır.

Neytral lipidlərə yüksək qeyri-polyar lipidlərin mürəkkəb qarışığından ibarət olan mumlar da aiddir. Bu quruluşda çox atomlu spirtlər, yüksəkmolekullu üzvi turşular və yüksəkmolekullu karbohidrogenlər, bəzən turşular və sərbəst spirtlər də daxildir.

III böyük qrup polyar lipidlərə fosfolipidlər, qlikolipidlər daxil edilir. Lipidlər sinfinə steroidlər və terpenləri də daxil edirlər. Beləliklə, lipidlər sinfi çox geniş yayılmış həddən ziyadə çoxlu birləşmələri əhatə edir. Təkcə, 200-dən çox yağ turşusunun əmələ gətirdiyi 600 yağ növünün mövcud olduğunu demək, lipidlərin necə yayıldığına sübutdur. Onlardan 420-si bitki yağı, 80-i quruda yaşayan heyvanların, 100-ü isə su heyvanlarının yağı kimi məlumdur.

Lipidlərin bioloji rolu, onların hüceyrə membranının mütləq komponentlərindən biri olması, membran strukturuna malik bütün hüceyrədaxili quruluşların tərkibinə daxil olması, energetik, ehtiyat, müdafiə və s. funksiyaların daşınması ilə müəyyən olunur. Təbiətdə geniş yayılmış trihidroksispirt (qliserol və ya qliserin) və yağ turşularının efirlərindən ibarət olan neytral lipidlərdən (onlar adətən yağlar adlanır) triasilqliserolların kimyəvi xassələri və bioloji funksiyaları yağların tərkibinə daxil olan yağ turşularının təbiəti ilə müəyyən olunur.

Yağların ümumi quruluşunda R_1 , R_2 və R_3 radikalları yağ turşularının qalıqlarıdır və onlar



əksər hallarda müxtəlif olur. Başqa sözlə, triasilqliserollarda maksimal müxtəliflik qanunu mövcuddur. Yağ turşularının $\text{R}_1\text{R}_1\text{R}_2$ olması az, $\text{R}_1\text{R}_1\text{R}_1$ isə çox nadir haldır.

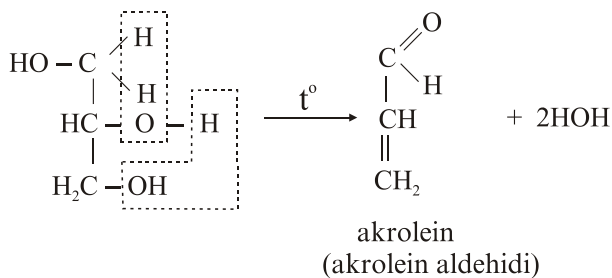
Yağlar müxtəlif amillərin təsirindən tez xarab olur və acılaşırlar. Bu amillərə havanın oksigeni, su, işıq, temperatur və s. daxildir. Həmin amilləri kənar etməklə yağları uzun müddət dəyişmədən və keyfiyyətini itirmədən saxlamaq mümkündür. Acılaşan yağlarda qliserin tədricən ayrılaraq toplanır və eyni zamanda yağ turşuları ayrılır. Müvafiq təcrübə vasitəsilə onları aşkar etmək mümkündür. Bu reaksiyalardan biri də xarab olmuş yağda qliserini müşahidə etmək üçün tətbiq olunan akrolein sınağıdır. Digər sınaq vasitəsilə bitki yağları aşkar edilir.

İŞ 64

LIPIDLƏRƏ AID TƏCRÜBƏLƏR

1. Akrolein sınağı

Bu təcrübə qliserinin yüksək temperaturda iki molekul su itirib akrolein adlanan doymamış aldehidə çevrilməsinə əsaslanır. Reaksiya aşağıdakı kimi gedir.



Tərkibində qliserin olmayan lipidlər və digər maddələr (mumlar, steridlər, sterinlər və s.) bu sınağı vermir.

İşin gedişi

Təmiz quru sınaq şüşəsinə azacıq (2-3 damcı) yağ salınır, üzərinə 0,5 mq quru kalium hidrosulfat və ya KHSO_4 , H_3BO_3 , MgSO_4 , NaHSO_4 və s. su udan maddə əlavə edib ehmalca açıq alovda qızdırılır. Bu zaman ağ rəngli buxarın ayrılması və qıcıqlandırıcı (göz yaşardıcı) qoxu, akroleinin əmələ gəldiyini göstərir. Bu təcrübə qliserinlə də müsbət olur. Lakin mum və sairə ilə nəticə alınmır.

Gümüşün ammonyaklı məhlulunda isladılmış filtr kağızını buxar üzərinə tutsaq kağızın qaralmasını görürük.

2. Belye sınağı

Bu təcrübə ilə adətən bitki yağlarının mənşəyi bilinir. Bu isə təmiz bitki yağlarının turş mühitdə (qatı HCl turşusu ilə birlikdə) rezorsinin benzoldakı məhlulu ilə birlikdə qarışdırıb (çalxalayıb) saxladıqda yaşıl göy və ya bənövşəyi rəng əmələ gətirmələrinə əsaslanır.

İşin gedişi

Bir neçə təmiz quru sınaq şüşəsinin hərəsinə bir qədər (1-2 ml) yağ salınır. Üzərinə o qədər də qatı xlorid turşusu tökülür, sonra hərəsinə 1-2 ml rezorsin əlavə edib, bərk çalxalanır və sərbəst buraxılır; bu zaman əmələ gələn rənglərə fikir verilir:

- a) pambıq yağı, küncüt yağı, xaş-xaş yağı və s. bənövşəyi və ya göy;
- b) zeytun yağı, kokos yağı və s. yaşıl rəng verirlər.

Yağlar suda həll olmur. Bunu belə yoxlayırlar: bir neçə təmiz sınaq şüşəsinə eyni miqdar hərəsinə 2-3 ml yağ götürülür. Üzərlərinə eyni miqdar (4-5 ml) müxtəlif həlledici: birinə su, digərinə spirt, üçüncüyə xloroform, dördüncüyə karbon dörd xlorid və sairə əlavə edib ayrı-ayrı qarışdıraraq həll olmalarına fikir verilir. Yağlar suda heç həll olmadığı halda axırıncılarda daha yaxşı həll olur.

3. Emulsiyalaşma təcrübəsi.

Emulsiya biri-digərinə qarışmayıb məhlulda həll olacaq maye maddə hissəciklərinin asılı vəziyyətdə qalaraq dispers sistemi əmələ gətirməsinə deyilir. Başqa sözlə, emulsiya - maye halda olan dispers fazanın maye dispers mühitdə asılı vəziyyətdə olmasına deyilir. Buna süd misal ola bilər. Emulsiyanın yaxşı və hissəciklərinin daha da kiçik olmasına bir çox təbii maddələr kömək edir ki, bunlara *emulqator* (emulsiyalaşdırıcı) deyilir. Məsələn, zülallar, sabun məhlulu, qələvilər (soda və sair) yaxşı emulqatorlardır.

Emulqatorlar həlledici ilə yağ kürəcikləri arasındakı səthi gərginliyi azaldaraq emulsiyanın sabitləşməsinə kömək edir.

İşin gedişi

Bir neçə təmiz sınaq şüşəsinin hərəsinə 2-3 ml yağ və o qədər də birinci sınaq şüşəsinə soda məhlulu, ikinciyə sabun məhlulu, üçüncüyə qələvi (KOH) məhlulu əlavə edib axırıncıya isə yağ və sudan başqa heç bir şey əlavə etməyib sınaq şüşələrinin hamısı bir neçə dəqiqəyə isti su hamamına qoyulur, sonra sınaq şüşə-lərində emulsiyanın vəziyyətinə diqqət yetirilir və nəticədə hansı sınaq şüşəsində yaxşı emulsiya əmələ gəldiyi müşahidə edilir.

Qeydlər: a) emulsiyalaşma təcrübəsi üçün götürülən yağların hamısı bitki yağı, yeni duru yağ olduqda təcrübə isti su hamamına qoymadan da aparıla bilər. b) Təcrübə aparıldığı müddətdə, alovdan alışıq maddələrin qorunması üçün o müddətdə laboratoriyada elektrik cihazları və qaz yanmamalıdır (təcrübə üçün isti su, ya digər otaqdan gətirilməli və ya qabaqcadan hazırlanmalıdır).

İŞ 65

YAĞ ƏDƏDLƏRİNİN TƏYİNİ

Yağların ətraflı öyrənilməsi, onların bir sıra xassələrlə bərabər konstantlarının da öyrənilməsinə tələb edir. Yağlar bir sıra ərimə dərəcəsi, donma dərəcəsi, refraksiya və sairə ilə bərabər mühüm kimyəvi konstantlara da malikdir. Ona görə də yağların bir sıra kimyəvi konstantlarının da öyrənilməsi çox vacibdir.

A. Turşuluq ədədi və ya yağların turşuluğu

Turşuluq ədədi bir qram yağın tərkibindəki sərbəst turşuların neytrallaşmasına lazım olan qələvinin (KOH) milliqramlarla miqdarına deyilir. Turşuluq ədədi bitki yağlarında heyvani yağlara nisbətən daha çox olur və bitkidə heyvan orqanizminə nisbətən daha çox dəyişəndir.

İşin gedişi

Təmiz quru kolbaya (və ya stəkana) 3-5 qr yağ götürülür. Üzərinə 30 ml (əvvəlcədən neytrallaşdırılmış) efir və spirt qarışığı (bərabər həcmli qarışıq) və 1-2 damla fenolftalein töküüb həll edilir. Büretkadan 0,1 N KOH-ın spirtde məhlulu ilə çəhrayı rəng alınana qədər titrlənib aşağıdakı tənlik üzrə turşuluq ədədi hesablanır.

$$x = \frac{a \cdot 5,6T}{N}$$

burada: a - 0,1 N titrləməyə sərf olan KOH, ml-lə,

N - yağın miqdarı, qr-la,

T - KOH-ın düzəliş əmsalı,

5,6 - 1 ml 0,1 N KOH-da olan qələvinin miqdarı mq-la (və

ya KOH-ın titri).

B. Sabunlaşma ədədi

Bir qram yağın tərkibində sərbəst və birləşmiş halda olan bütün yağ turşularının neytrallaşmasına sərf olunan qələvinin (KOH) milliqramlarla miqdarına sabunlaşma ədədi deyilir.

İşin gedişi

Təmiz quru kolbaya 2 qrama qədər yağ götürülür. Üzərinə 25 ml 0,5 N KOH (spirtde məhlulu), ikinci kolbaya isə yağ əvəzinə o qədər (2 ml) təmiz su alıb (kontrol), hər iki kolba havasoyuducusu ilə birləşdirilib qaynar su hamamında bir saata qədər sabunlaşma aparılır. Damcı sınağından istifadə edərək sabunlaşmanın tamamlığı müəyyən edilir. Sonra kolbaların hərəsinə 1-2 damla indikator (fenolftalein) əlavə edib HCl-un 0,5 N məhlulu ilə rəng dəyişilənə qədər titrlənib aşağıdakı tənlik üzrə sabunlaşma ədədi hesablanır:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 28,055 \cdot T}{N}$$

burada: a - kontrola (suya) sərf olunan HCl-un miqdarı ml-lə,

b - 0,5 N HCl -un əsas təcrübəyə (yağa) sərf olunan miqdarı,

ml-lə

T - HCl- un düzəliş əmsalı,

N - yağın miqdarı, qr-la,

28,055 – 1 ml 0,5 N KOH təfavüt edən HCl-un mq-la miqdarı.

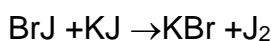
C. Efir ədədi

Bir qram yağın tərkibində birləşmiş halda olan yağ turşularının neytrallaşmasına sərf olunan qələvinin (KOH) milliqramlarla miqdarına efir ədədi deyilir. Bu konstantı əməli surətdə təyin etməyə ehtiyac yoxdur. Çünki efir ədədi yağın sabunlaşma ədədindən turşuluq ədədinin çıxılma fərqidir və bu yolla da hesablanı bilər.

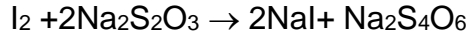
Ç. Yod ədədi

Yod ədədi, lipidlərin tərkibindəki doymamış turşuların miqdarını göstərir. Ona görə də yüz qram yağın tərkibindəki doymamış turşuların doymasına sərf olacaq yodun qramlarla miqdarına yod ədədi deyilir. Müxtəlif yağların yod ədədi də çox müxtəlif olur. Məsələn, günəbaxan yağı 120-140, pambıq yağı - 100-110, zeytun yağı - 80-90 və s. Bir sözlə, yod ədədini öyrənmək, onları səciyyələndirmək üçün daha vacibdir. Yod ədədi iki yolla təyin edilir.

a) BrJ vasitəsilə yod ədədinin təyini (Qanus üsulu), BrJ yodun bromla sirkə turşusu mühitində birləşməsi nəticəsində alınır. BrI doymamış yağ turşularında ikiqat rabitə yerlərinə birləşir. Reaksiyaya daxil olmayan BrJ artığı KJ-la aşağıdakı kimi reaksiyaya girir.



Burada ayrılan yod isə tiosulfit vasitəsilə titrlənir.



Reaktiv və ləvazimat:

1. Bitki yağı
2. Qanus reaktiv; 13 q kristallik J_2 100 ml buzlu sirkə turşusunda (1 litrlik kolbada) həll edilir. Məhlulə 8,2 q Br əlavə edib həcmi litrə çatdırılır. Məhlul rəngli qabda saxlanılır (qonur rəngli). Məhlulu sorucu şkafda hazırlamaq lazımdır.
3. 20 % KJ iş zamanı hazırlar
4. 0,1 N natrium tiosulfit
5. 1 %-li nişasta
6. Xloroform

İşin gedişi

250-300 ml-lik konusvari kolbaya 0,2-0,3 q yağ analitik tərəzidə çəkib 10 ml xloroformda həll edildikdən sonra tökülür. İkinci eyni ölçülü kolbaya yağsız 10 ml xloroform götürülür (kontrol), hər iki kolbaya 25 ml Qanus reaktiv əlavə edilir. Qabları tıxacla möhkəm bağlayıb çalxalayaraq və 1-1,5 saat müddətində qaranlıqda yerləşdiririk. Sonra hər iki kolbaya 10 ml 20 %-li KJ və 50 ml su töküüb ayrılan yodu $Na_2S_2O_3$ -lə zəif sarı rəng alınana qədər titrləyirik. Sonra məhlulə 10-12 damla nişasta əlavə edib rəngsizləşənə qədər titrləməni davam etdiririk. Nəzərdə tutmaq lazımdır ki, 1 ml 0,1 N $Na_2S_2O_3$ 1 ml 0,1 N J_2 -a uyğun gəlir. Yod ədədi aşağıdakı tənliklə hesablanır.

$$U = \frac{(C - O)K \cdot 0,1269 \cdot 100}{N}$$

Burada: U- yod ədədi,

C - kontrolə sərf olunan $Na_2S_2O_3$, ml-lə,

O - təcrübə variantına sərf olunan $Na_2S_2O_3$, ml-lə,

K - 0,1 N tiosulfitin düzəliş əmsalı,

0,1269 - yoda görə tiosulfitin titri,

N - yağın çəkisi q -la.

b) Yod ədədinin Qyubl üsulu ilə təyini daha dəqiq olsa da çox zəhərli $HgCl_2$ (civə xlorid) tətbiqi ilə əlaqədardır. Ona görə də kiçik praktikum məşğələləri üçün bu üsul məsləhət görülmür. Yuxarıdakı Qanus üsulu isə tez başa gələn əlverişli üsuldur.

İŞ 66

YAĞLARIN BİXROMAT ÜSULU İLƏ TƏYİNİ

(Mikroüsul)

Bu üsul, turş mühitdə kalium bixromatın iştirakilə yağın karbon qazı və ya suya qədər oksidləşməsinə əsaslanır.

Reaktivlər:

1. Oksidləşdirici qarışıq: 25 ml təmiz suda 5 q AgNO_3 həll edib onu 50 ml suda həll olmuş 5 q $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ilə qarışdırır, əmələ gələn çöküntü sentrifüqalanır və təkrar yuyulur. Alınan pasta 500 ml qatı H_2SO_4 -də həll edilib oksidləşdirici olaraq işlədilir.

2. 10 %-li KJ

3. 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4. 1 %-li nişasta

İşin gedişi

Tərkibindəki yağın miqdarını təyin etmək üçün müəyyən miqdar 20-40 mq sınaq çəkisi götürülür. Xırda kolbada üzərinə 110-212 ml oksidləşdirici əlavə edib 1-1,5 saat müddətində ekstraksiya aparılır. Sonra ekstrakt süzülür və 5 ml efir ilə yuyulub ekstrakta əlavə edilir, efir isə su hamamında tamamilə buxarlandırılır. Əsasən yağdan ibarət olan qalığın üzərinə 10 ml oksidləşdirici qarışıq (1) əlavə edirlər. Sonra hər iki qabdakı maddə (ekstrakt) soyudulur və hərəsi ayrılıqda 50 ml -ik kolbaya keçirilir. Hər iki kolbaya hərəsinə 30 ml 10 %-li KJ məhlulu əlavə edilir. 1-2 damcı nişasta (indikator) əlavə edib sərbəstləşən yod $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ilə titrlənir.

IV BÖLMƏYƏ AID SUALLAR

1. Lipidlərin əsas xassələri hansılardır?
2. Akrolein və Belye sınaqlarını nə üçün tətbiq edirlər?
3. Emulsiya məhlulları nədir və hansı emulqatorları tanıyırsınız?
4. Yağ ədədləri hansılardır və onların təyini necə aparılır?
5. Yağların miqdarca təyini nəyə əsaslanır?

II. HİSSƏ. İMMUNOLOGİYA
VI BÖLMƏ
TƏCRÜBİ MODELƏR
(HEYVANLARLA İŞLƏMƏ ÜSULLARI)

Onurğalılarda immun sistemin öyrənilməsi əksər hallarda qarşıya qoyulmuş məqsədin həlli üçün uyğun olan eksperimental (təcrübi) modelin seçimindən asılıdır. Əgər müəyyən antigenə qarşı antizərdabın böyük miqdarda alınması tələb olunursa, bu halda təcrübə üçün kifayət qədər iri heyvanlardan (dovşan, keçi, qoyun və ya at) istifadə edilir. İnsan üçün effektiv protektiv peyvəndlərin alınması məqsədi ilə immun sistemləri insanın immun sisteminə ən yaxın olan heyvanlardan istifadə edirlər. Lakin, əgər infeksiya agentin böyüməsi insan və ya primatlarda mümkündürsə, bu halda peyvəndlərin istehsalı üçün şimpanze və ya babuinlərdən istifadə olunması tələb olunur. İmmunologiya sahəsində aparılan fundamental tədqiqatların əksəriyyəti üçün ən rahat təcrübi obyekt siçanlardır: onlar genetik nöqtəyi nəzərdən yaxşı xarakterizə olunmuşlar və sürətli inkişaf dövrünə malikdirlər. Siçanların immun sistemi digər heyvan növlərinə nisbətən daha geniş öyrənilmişdir və məhz siçanlar üzərində insanın müxtəlif immun vəziyyətlərinə uyğun olan çoxsaylı modellər işlənib hazırlanmışdır. Bu modellər orqanizmin bütövlüyünü pozan müxtəlif agentlərə qarşı immun cavabın inkişafının həm fundamental, həm də tətbiqi aspektlərinin öyrənilməsinə imkan verir. İmmunoloqlar əsasən siçanların təmiz xətləri ilə işləyirlər. Bunlar yaxınqohum çarpazlaşma nəticəsində alınmış transplantasiya antigenlərinə görə genetik cəhətdən identik olan heyvanlardır. Siçanlarda dölün inkişafı 19-21 gün davam edir; bir siçan 10-12 bala verə bilər; artıq 2-3 aydan sonra balalar yetkin yaşa çatırlar və özləri çoxalma qabiliyyətinə malik olurlar. Bacılar və qardaşlar arasında təkrarlanan çarpazlaşma zamanı 20 generasiyadan sonra heyvanların genotipində 98% homoziqot allellər müşahidə olunur. Bu heyvanları singen adlandırırırlar. Hal-hazırda siçanlarda xassələrinə görə fərqlənən 150-dən çox genetik təmiz (inbred) xətt məlumdur. Siçanlardan savayı siçovulların, dəniz donuzlarının, dovşanların, ev quşlarının və itlərin də təmiz xətləri alınmışdır. Belə heyvanlar adi heyvanlarda və insanda müşahidə olunan əsas histoloji uyğunluq genlərinin nisbətən sabitliyi şəraitində immun cavabı öyrənməyə imkan verir. Yalnız inbred xətlərdən istifadə edərək hüceyrə və toxumaların müəyyən xətti bir heyvandan digərinə köçürülməsini həyata keçirmək mümkündür. Singen immun siçanlarının limfositlərinin müşahidəsi göstərmişdir ki, immuniteti intakt singen siçanlara passiv şəkildə keçirmək olar.

Cədvəl 13

İmmunoloji tədqiqatlarda istifadə olunan
inbred siçan xətləri

Xətt (qaplonöv)	Xəttin qısa işar.	Subxətlər	Xarakterləri
----------------------------------	--	------------------	---------------------

1	2	3	4
A (H-2 ^a)	A	A He A J	Bəzi subxətlərdə süd vəzisinin spontan şişlərinin yüksək səviyyəsi
AKR (H-2 ^k)	AK	AKR J AKR N	Leykemiyanın yüksək səviyyəsi
BALB c (H-2 ^d)	C	BALB cj BALB c AnN	Şüalanmaya qarşı həssasdırlar
CBA (H-2 ^k)	CBA	CBA J CBA H CBA N	Retinal degenerasiyaya səbəb olan <i>rd</i> genini daşıyırlar X-xromosomu ilə əlaqədar immunodefisitə səbəb olan <i>xid</i> genini daşıyırlar
C3H (H-2 ^k)	C3	C3H He C3H HeJ C3H HeN	Retinal degenerasiyaya səbəb olan <i>rd</i> geni mövcuddur; əksərə subxətlər süd vəzisinin spontan şişlərinin yüksək indeksinə malikdirlər
C57BL 6 (H-2 ^b)	B6	C57BL 6J C57BL 6By C57BL 6N	Çox aqressivdirlər, şüalanmanın təsirinə həssasdırlar
C57BL 10 (H-2 ^b)	B10	C57BL 10J C57BL 10ScSn C57BL 10N	B6-dan ən azı 2 lokusa görə fərqlənirlər; adətən kongen siçanların alınması üçün C57BL 6-nın partnyoru kimi istifadə olunur
C57BR (H-2 ^k)	BR	C57BRcdj	Hipofiz və qaraciyerin spontan şişlərinin yüksək səviyyəsi
C57L	L	C57L J	Təcrübi autoimmun ensefalitin induksiyasına həssasdırlar, hipofizin

		C57L N	spontan şişləri
DBA 1 (H-2 ^d)	D 1	DBA 1J DBA 1N	Çox fəaldırlar
DBA 2 (H-2 ^d)	D 2	DBA 2J DBA 2N	Çox fəaldırlar; II növlü pnevmokokk polisaxaridinə aşağı səviyyəli cavab
NZB (H-2 ^d)	NZB	NZB BINJ NZB N	Autoimmun hemolitik anemiyanın və nefritin yüksək səviyyəsi; NZW ilə çarpazlaşma nəticəsində F ₁ -də sistem qırmızı qurdeşənəyinə (SQQ) analoji olan autoimmun xəstəlik yaranır
NZW	NZW	NZW N	NZB ilə çarpazlaşma nəticəsində alınmış F ₁ -də autoimmun SQQ müşahidə olunur
P	P	PJ	Leykemiyanın yüksək səviyyəsi
SJL (H-2 ^s)	S	SJLJ	Çox aqressivdirlər, adətən məhv olana qədər vuruşurlar, xüsusilə də erkəklər; autoimmun xəstəliklərin yaranmasına həssasdırlar
SWR	SWR	SWR J	Autoimmun xəstəliklərin yaranmasına həssasdırlar

Heyvanların vivariumda saxlanması ilə xüsusi ədəbiyyatlarda daha ətraflı tanış olmaq olar. Biz isə, gənc tədqiqatçılar üçün zəruri olan məlumatlarla kifayətlənəcəyik.

Təcrübələrdə bir qayda olaraq müəyyən çəkiyə malik (18-22 q) yetkin siçanlar istifadə olunur. Heyvanları tinglikdən aldıqdan sonra qabaqcadan etiketləri hazırlayaraq onları qəfəslərə (5-10 ədəd) və ya çənlərə (30-100 ədəd) yerləşdirirlər. Əgər siçanları uzun müddətli təcrübələrdə istifadə edirlərsə, bu halda mümkün olan xəstəliklərin qarşısını almaq üçün onları adətən quru çiçək peyvəndlərinin su məhlulu ilə peyvənd edirlər. Məhlul şüşə çubuq ilə tükü qabaqcadan ehtiyatla təmizlənmiş quyruğun əsasında yerləşən kiçik dəri hissəsinə çəkilir. Peyvənddən sonra heyvanları 21 sutka ərzində karantində saxlayırlar. Bir ampula 50 siçanın peyvənd olunmasına kifayət edir.

Təcrübə məqsədi ilə istifadə olunan hər heyvan qrupuna nömrə verilir və qrupun bütün fərdləri xüsusi nişanlayıcı alət vasitəsilə nişanlanır. Nişanlar qulaqlarda və ya barmaqlarda yerləşdirilir.

Dəniz donuzlarını, dovşanları, siçovulları, qoyunları əksər hallarda zərdabın alınmasında qan donorları kimi istifadə edirlər. Bu heyvanları da həmçinin nişanlamaq mütləqdir.

ETİKETLƏRİN NÜMUNƏLƏRİ

İntakt heyvanlar üçün

50 яд СВА (еркякляр) ♂
Алыныб: 01.10.2005

Təcrübi heyvanlar üçün

Тяръцбя № 1
Груп 1

SIÇANLARA ANTİGENİN YERİDİLMƏSİ

ÜSULLARI

Təcrübənin məqsədlərindən asılı olaraq antigenlərin siçanlara yeridilməsinin müxtəlif üsullarından istifadə olunur: venadaxili (v/d), peritondaxili (qarın boşluğu divarlarını və üzvlərini örtən serroz qişa) (p/d), dalaqdaxili (d/d), əzələdaxili (ə/d), dərialtı (d/a), dəridaxili (də/d), dəriüstü (d/ü), peroral – ağızdan (per os). Praktikumun bu bölməsinin. Məqsədi antigenin müxtəlif daxil etmə üsulları ilə tanışlıq və praktiki təcrübənin əldə edilməsidir. Prosedurların düzgün icrasına çoxsaylı təkrarlar vasitəsilə nail olmaq olar.

Reaktiv və ləvazimat:

- Şprislər (1,0 ml, 2,0 ml və 5,0 ml-lik); şprislərə inyeksiya üçün iynələr
- Steril fizioloji məhlul
- Steril cərrah göz alətləri (qaycılar, skalpellər, pinsetlər, sapla iynələr)
- Efir
- Heyvanların narkotizasiyası üçün qapaqlı qab

İŞ 76

VENADAXİLİ YERİDİLMƏ

Həll olan antigenləri və hüceyrələr məhlulunu (miqdarı 120 mln/siç-a qədər) 0,2-dən 1,0 ml-ə qədər həcmdə siçanlara venadaxili yeridirlər. Yeridilmənin bu üsulunu antigenin qan dövranına dərhal düşməsi və dalağa çatdırılması, yəni humoral immunitetin tərkib hissələrinin fəallaşdırılması məqsədilə tətbiq edirlər. Siçanların dalağında anticisimcik əmələgətirən hüceyrələrin maksimal miqdarı antigenin yeridilməsindən 4 gün sonra müşahidə olunur.



Şəkil 10. Siçanın quyruğunun yan venasına məhlulların venadaxili yeridilməsi

Yeridilmə yan (sol və ya sağ) quyruq venası ilə aparılır (şək.10). Venaya düşməni asanlaşdırmaq üçün əvvəla quyruğu su hamamında 40-50°C temperatur şəraitində qızdırırlar, sonra siçanı kiçik qaranlıq kameraya (qutu tipli) yerləşdirirlər, quyruğunu isə, kameranın xaricində saxlayırlar (bu stress hərəkət fəallığının qarşısının alınmasına imkan verir).

Əgər müvafiq kamera yoxdursa, təcrübəçi siçanı əlində saxlayan assistentin köməyindən istifadə edə bilər. Əgər yeridilmə alındısa, bu halda rəngi tünddən açığa dəyişən vena ilə məhlulun asan hərəkəti müşahidə olunur, şprisin porşeni isə asanlıqla hərəkət edir. Bu zaman siçanın quyruğunun qalınlığı dəyişmir venadan iynəni çıxardıqdan sonra isə, qan damlası əmələ gəlir.

DİQQƏT! *Əgər iynə venaya düşməyibsə, məhlul şprisdən çıxmır və ya çox çətinliklə sıxılıb çıxarılır, quyruq isə xeyli şişir.*

İŞ 77

PERİTONDAXİLİ YERİDİLMƏ

Bu üsul ya antigenlərin yeridilməsi, ya da assitlərin alınması üçün tətbiq edilir. Peritondaxili yeridilmə zamanı da antigen immun cavabın humoral bəndini stimullaşdıraraq qan dövranına düşür, lakin dalaqda anticisimcik əmələgətirən hüceyrələrin maksimal miqdarı yeridilmənin yalnız 5-ci günü müşahidə olunur. Siçanlara peritondaxili 0,2-dən 8,0 ml-ə qədər maye daxil etmək olar.



Şəkil 11. Siçanlara məhlulların peritondaxili yeridilməsi

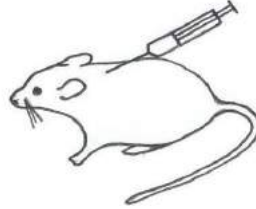
Peritondaxili yeridilmə üçün köməkçi siçanın arxa ayaqlarını bir az aralayaraq qarın divarını dartılmış vəziyyətə gətirməklə başı aşağı (baş-ayaq) tutur və səthi spirtlə dezinfeksiya edirlər. Yeridilmə yeri – çanaq-bud oynağı sahəsidir (şək.11).

DİQQƏT! Dərini və qarın əzələlərini iynə ilə deşərək sidik kisəsinə toxunmamaq vacibdir, məhlul bilavasitə qarın boşluğuna daxil olmalıdır. Düzgün yeridilmə zamanı iynə yerində nə dərinin şişməsi, nə də qan damlası müşahidə olunmur. İynəni çıxardıqdan sonra yaranı spirtlə təmizləyirlər.

İŞ 78

DƏRIALTı YERİDİLMƏ

Antigenin bu üsulla çatdırılması sayəsində immunitetin hüceyrəvi bəndi fəallaşır, çünki antigen yaxınlıqda yerləşən limfa düyünlərinə düşür. Daxil edilən maddənin həcmi 0,5 ml-ə qədər ola bilər.



Şəkil 12. Siçanlara məhlulların dərialtı yeridilməsi

DİQQƏT! Şprisin iynəsi heyvanın boyun nahiyəsinə «ziqzaq» şəklində (məhlulun kənara tökülməməsi məqsədilə) yeridilir. Yeridilmədən əvvəl və sonra yeridilmə yeri spirtlə təmizlənir. Dəri altında əmələ gələn möhkəm şiş 1 sutkadan sonra çəkilir. Dərialtı yeridilmə sitotoksiki reaksiyanın və gecikən hiperhəssaslıq reaksiyasının induksiyası üçün tətbiq edilir (şək.12).

SİÇANLARDAN İMMUN SİSTEMİ ORQANLARININ VƏ HÜCEYRƏLƏRİNİN AYRILMASI

Hal-hazırda immün sistemi orqanlarına hüceyrələrin əmələ gəlməsi və yetişməsi prosesləri baş verən mərkəzi limfoid orqanları (sümük iliği, embrional qaraciyər, timus) və immün cavabı həyata keçirən periferik limfoid orqanları (dalaq, limfa düyünləri, qrupşəkilli limfa follikulları, badamcıqlar, selikli qişə ilə assosiasiya olunmuş limfoid hüceyrələr yığılı), həmçinin dəri və qan aid edilir. Lakin bu bölgü kifayət qədər şərti xarakter daşıyır. Belə ki, qanın formalı elementlərinin, o cümlədən limfositlərin mənbəyi olan sümük iliği bir tərəfdən T- və B-limfositlərinin sələflərini formalaşdıran mərkəzi limfoid orqandır, digər tərəfdən isə, B-limfositləri üçün yetişmə və fəaliyyət məkanı olub periferik limfoid orqanın funksiyasını yerinə yetirir. Bundan başqa, hal-hazırda T-sələflərin yetişməsində – onların timusdan kənarda yetkin T-limfositlərinə çevrilməsində dərinin rolu müzakirə olunur. Yəni periferik orqan müəyyən şəraitdə mərkəzi orqanın funksiyalarını yerinə yetirə bilər. Buna baxmayaraq, sümük iliği humoral immuniteti

təmin edən B-limfositlərin əsas mənbəyi sayılır. Embrional dövrdə qanyaradıcı orqanın funksiyalarını qaraciyər yerinə yetirir (yəni B-hüceyrələrini hasil edir). Timus T-limfositlərin differensiasiyasını həyata keçirir. O, mərkəzi limfoid orqandır və hüceyrə immunitetinə cavabdeh olan yetkin T-hüceyrələrin mənbəyidir. Limfositlərin yetişməsi zamanı onlar mərkəzi limfoid orqanlarından immun cavabın inkişafı, yəni antigenin tanınması, bu antigenə spesifik reaksiya və ona qarşı immunoloji yaddaşın yaranması prosesləri baş verən periferik limfoid orqanlarına miqrasiya edirlər. Bu səbəbdən periferik limfoid orqanları yetkin T- və B-limfositlərinə malikdirlər.

Limfoid hüceyrələrinin *in vivo* və *in vitro* şəraitində qarşılıqlı təsiri üzrə tədqiqatların aparılması üçün əksər hallarda siçanların müxtəlif limfoid orqanlarından hüceyrələrin ayrılması tələb olunur. Onlarda T- və B-limfositlərin faiz nisbəti praktiki olaraq insandakı kimidir.

Cədvəl 14

İnsanın limfoid orqanlarında T- və B-limfositlərin miqdarı, %

(A.A.Yarilina görə)

Orqanlar və toxuma mayesi	B-limfositlər	T-limfositlər
Sümük iliği	10-12	1-4
Timus	0	96-98
Dalaq	40-50	25-35
Limfatik düyünlər	35-40	55-65
Badamcıqlar	40-55	25-50
Qrupşəkilli limfatik follikullar	30-40	25-30
Qan	13-18	60-70

Reaktiv və ləvazimat:

- Efir və ya xloroform
- Heyvanların yatızdırılması üçün qapaqlı banka
- Cərrahiyyə masası və iynələr
- Spirt, pambıq
- Steril göz cərrah alətləri (qayçılar, pinsetlər, skalpellər), ülgüc
- 1,0-5,0 ml tutumu olan steril şprisler, iynələr
- Steril mühit 199 və ya RPMİ 1640
- Steril plastik və ya şüşə qablar (5-10 ml tutumu olan sınaq şüşələri, 5-10 ml tutumu olan pipetkalar, qıflar, Potter homogenizatoru, Petri qabları, kapilyarlar)
- Steril kapron süzgeçləri

- Buz
- Qoryayev kamerası
- Rezin armud №1
- Qanın konservantları (heparin, Olsver məhlulu)
- Soyuduculu sentrifuqa
- İşıq mikroskopu
- Seroloji tədqiqatlar üçün maili ştativ

İŞ 79

SÜMÜK İLİYİNDƏN HÜCEYRƏLƏRİN AYRILMASI

İşin gedişi

1. Siçanları efir və ya xloroform vasitəsilə huşsuz vəziyyətə gətirirlər.
2. Arxa ayağını bolluca spirtlə təmizləyirlər. Ayağı pinsetlə saxlayaraq ayaq darağı ətrafı dəridə qayçı vasitəsilə dairəvi kəsik edirlər. Digər pinsetlə dəri «corabı» buda qədər çıxarırlar.
3. Diz oynaqının ətrafında yerləşən əzələləri qayçı ilə kəsib sümüyü açirlar. Skalpel vasitəsilə əzələləri buda qədər ayırırlar.
4. Bud oynaqında qayçı ilə ayağı bədənədən ayırırlar, diz oynaqında isə, budu baldır və pəncədən kəsib ayırırlar.
5. Bud sümüyünü əzələ qalıqlarından skalpel ilə təmizləyib diz və bud oynaqları tərəfindən epifizləri kəsərək Petri qablarına yerləşdirirlər.
6. Sümük iliyini şpris vasitəsilə sümükdən çəkərək steril mühitdə həll edib sınaq şüşəsinə yığırlar və onu içərisində buz olan stəkana yerləşdirirlər.
7. Ayrılmış sümük iliyini Potter homogenizatorunda xırdalayirlar, hüceyrələr suspenziyasını 4-qatlı steril kapron süzgəcdən süzürlər.
8. Hüceyrələri Qoryayev kamerasında sayirlar (bax iş 85).
9. İntakt siçanın iki baldır sümüyündən ayrılmış sümük iliyinin limfoid hüceyrələrinin (B-limfositlərin) miqdarı adətən 20 mln təşkil edir.

DİQQƏT! *Yadda saxlamaq lazımdır ki, alınmış hüceyrələr suspenziyasında az miqdarda T-limfositləri mövcuddur. B-limfositlərin daha həmcins populyasiyası 14-15-günlük siçan embrionlarının qaraciyərindən alına bilər: bir embriondan 50 mln-a qədər B-hüceyrə alınır.*

İŞ 80

TİMUSDAN T-HÜCEYRƏLƏRİN AYRILMASI

İşin gedişi

1. Efirlə huşsuz vəziyyətə gətirildikdən sonra siçanı cərrahiyyə stolunda beli üstünə uzadırlar. Qarın tərəfini spirtlə təmizlədikdən sonra bədən boyunca ortadan dərini kəsirlər.
2. Bədənin qarın tərəfinin əzələ səthini açaraq dərini iynələrlə fiksə edirlər.
3. Döş qəfəsinin orta xətti boyunca aşağı qabırğaların sol və sağ tərəfindən təxminən körpücük sümüyünə qədər qayçı ilə iki kəsik edirlər. Kəsiklər arasında olan məsafə 3-4 mm-ə yaxın olmalıdır.
4. Kəsilmiş əzələ qruplarını pinsetlə aralayaraq döş qəfəsini açırırlar. Ürək üzərində yerləşən ağımtıl timusun iki uzunsov paycığı aydın görünür. Yuxarı hissədə timusu pinsetin köməyi ilə ehtiyatla toxumadan ayırırlar. Bu zaman qan damarının kəsilməməsi vacibdir, çünki belə halda timusun ayrılması çətinləşəcək.
5. Ayrılmış timusu buz üzərində yerləşən steril Petri qablarına yerləşdirirlər. Skalpel və pinset vasitəsilə timusu birləşdirici kapsuladan təmizləyirlər, bu zaman o 2 paycığa bölünəcək.
6. Timusu soyudulmuş steril mühitdə homogenizasiya edirlər və alınmış suspenziyanı 4-qatlı kapron süzgecdən keçirirlər.

DİQQƏT! *Timus hüceyrələrinin suspenziyasını hazırlayarkən diqqətli olmaq lazımdır ki, orada toxuma qalıqları olmasın, çünki siçanlar timositlərin yeridilməsinə çətinliklə dözürlər.*

7. Timus hüceyrələrinin sayılması Qoryayev kamerasında aparılır. Adətən bir intakt siçandan 80 mln-a qədər timosit almaq olar.

SİÇAN VƏ DOVŞANLARDAN QANIN ALINMASI

Təcrübənin məqsədindən asılı olaraq heyvanlardan qanı zərdabın və ya eritrositlərin ayrılması üçün alırlar. Heyvanlardan qanın hamısını almaq üçün onları öldürürlər. Sağ heyvandan qanın az miqdarda götürülməsi üçün ağrısızlaşdırmanı tətbiq edirlər; bu üsuldən istifadə edərkən iri heyvanlara üstünlük verilir. Eritrositlərin və zərdabın alınması üçün seçilmiş sağlam donor uzun müddət ərzində istifadə edilir. Qanın sağlam heyvanlardan götürülməsi eləcə də immun heyvanlarla aparılan işlərdə istifadə olunur. Bu vaxt yüksək spesifik antizərdabın alınmasından sonra limfoid yaddaş hüceyrələrinin fəaliyyəti nəticəsində qan zərdabında anticisimciklərin titrinin kəskin artması üçün onları az miqdarda antigenlərlə stimullaşdırmaq kifayət edir. İmmun heyvanlar həmçinin təkrar istifadə olunurlar.

İŞ 81

SAĞLAM SIÇANLARDAN QANIN GÖTÜRÜLMƏSİ

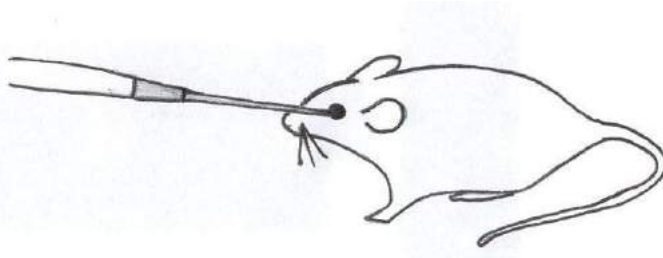
Bu üsul hibridoma texnologiyasında immun limfositlərin və miyelom hüceyrələrinin birləşməsindən əvvəl immun siçanın spesifik anticisimciklərinin titrini öyrənmək məqsədi ilə tətbiq edilir (şək.13).

İşin gedişi

1. Siçanı efirle huşsuzlaşdırırlar. Dərin yuxunun göstəricisi heyvanın nizamsız hərəkətlərinin dayanmasıdır. Xloroformdan istifadə etmək məsləhət edilmir, çünki bu halda artıq doza heyvanın məhvinə gətirib çıxara bilər.
2. Qanı götürmək üçün kapilyarı ona taxılmış rezin armudla birgə sağ ələ götürürlər. Sol əl ilə siçanı boyun nahiyəsindən götürüb stolun səthinə bir qədər sıxırlar. Qabaqcadan rezin armudu bir qədər sıxaraq kapilyarın ucunu sağ gözün retroorbital sinusuna daxil edirlər.

DİQQƏT! *Rezin armudu elə buraxmağa başlayırlar ki, kapilyarda təzyiq dəyişdikcə qan kapilyar vasitəsilə yuxarı qalxmağa başlasın. Prosedurdan sonra heyvan ayılır. Qanı 50 mkl-dən artıq götürmək olmaz, əks halda heyvan məhv ola bilər.*

3. Alınmış qan damlasını sınaq şüşəsinin kənarına daxili tərəfdən yerləşdirirlər. Ayrılmış zərdabın dibə çökməsi üçün sınaq şüşəsinin seroloji tədqiqatlarda istifadə olunan xüsusi maili ştativə yerləşdirirlər. Bu zaman qan laxtası sınaq şüşəsinin yuxarısında qalır. Zərdabı əvvəlcə 30 dəqiqə ərzində termostatda (37°C), sonra isə, 12-20 saat ərzində soyuducuda (4°C) saxlayırlar.



Şəkil 13. Siçanın retroorbital sinusundan qanın götürülməsi

DİQQƏT! *Zərdabın qurumaması üçün sınaq şüşəsinin ağzı parafilmə bağlanmalıdır.*

İŞ 82

ÜMUMİ QANIN GÖTÜRÜLMƏSİ

Bütün prosedurlar tez aparılmalıdır, çünki qan qısa bir müddətdə laxtalana bilər.

A. Zərdabın alınması məqsədilə qanın götürülməsi

İşin gedişi

1. Siçanı efirlə öldürüb cərrahiyyə stolu üzərinə beli üstə yerləşdirirlər; qarın tərəfini spirtlə təmizləyirlər, bütün bədən boyunca dərinin orta xətt üzrə kəsirlər.
2. Dərinin qıraqlarını iynələrlə fiksə edirlər. Bədənin qarın tərəfinin əzələ qatı açılır.
3. Aşağı qabırğalardan başlayaraq təxminən körpücük sümüyünə qədər orta xətt boyunca sol və sağ tərəfdən döş qəfəsini qayçı ilə iki yerdən kəsirlər. Kəsiklər arasında olan məsafə təxminən 3-4 mm olmalıdır. Kəsilmiş hissəni pinsetlə aralayırırlar və döş boşluğunu açırırlar. Timus, ürək, ürəkdən çıxan və diafraqmadan qarın boşluğuna daxil olan qarın aortası aydın görünür.
4. Qayçı ilə qarın aortasını kəsirlər, ürəyi yarırlar və bir neçə dəfə pinsetlə qaraciyəri basırırlar. Tökülən qan bütün döş boşluğunu doldurur.
5. Qanı rezin armud birləşmiş kapilyarla tez götürüb sınaq şüşəsinə keçirdirlər. Bir intakt siçandan 1,0-1,2 ml-ə qədər qan almaq mümkündür.

DİQQƏT! *Sınaq şüşəsinə **pambıq tıxacla** bağlayırlar və 30 dəqiqə müddətinə termostata (36°C) yerləşdirirlər.*

6. Əmələ gələn qan laxtasını sınaq şüşəsinin divarlarından kapilyar vasitəsilə ayırırlar, yenidən pambıq tıxacla bağlayırlar və 12 saat müddətinə soyuducuya (4°C) yerləşdirirlər (gecə ərzində).
7. Alınmış zərdabı 5 dəqiqə müddətində 5000g sürəti ilə sentrifüqada fırladırlar. Çöküntüdən ayrılmış zərdab sarı rəngli və şəffaf olmalıdır (onun cəhrayı rəngi zərdabda lizisə məruz qalmış eritrositlərin mövcudluğunu göstərir).
8. Bir intakt siçandan 0,5-0,6 ml zərdab almaq olar.
9. Zərdabı -20°C-dən yuxarı olmayan temperaturda saxlamaq zəruridir. Əridilmə zamanı zərdabın fəallığı xeyli azalır, bu səbəbdən onu kiçik porsiyalarla (0,2-0,5 ml) saxlayırlar və təcrübələrdə tələb olunduqca istifadə edərək bir dəfə əridirlər.

B. Eritrositlərin alınması məqsədilə qanın götürülməsi

Eritrositlərin alınması məqsədilə trombon əmələ gəlməsinin qarşısını almaq üçün qanın konservantlarından (heparin və ya Olsver məhlulu) istifadə edirlər. Qanla konservantın nisbəti 5:1 olmalıdır.

İşin gedişi

1. «Zərdabın alınması məqsədilə qanın götürülməsi» işinin 1-3 bəndlərini təkrarlayırlar.
2. Döş qəfəsi boşluğuna kapilyar vasitəsilə 0,3-0,5 ml heparin əlavə edirlər.
3. Qarın aortasını qayçı ilə kəsib ürəyi yarırlar. Bir neçə dəfə pinsentlə qaraciyərin üstündən basırırlar. Qan döş qəfəsi boşluğunu dolduracaqdır.

4. Döş boşluğunda qanla heparini kapilyarın köməyi ilə qarışdırırlar.
5. Qanı üzərinə rezin armud taxılmış kapilyar vasitəsilə sorub içərisində heparin olan sınaq şüşəsinə keçirirlər. Konservantla qarışmış qanı sınaq şüşələrində soyuducuda 4°C şəraitində saxlayırlar: bu şəraitdə o 1,5 ay ərzində saxlanıla bilər.

DİQQƏT! Saxlanma müddətində qan olan sınaq şüşələrinin ağzı mütləq **pambıq tıxacla bağlanmalıdır**.

Eritrositləri təcrübədə istifadə etməzdən əvvəl onları sentrifugada 5000g sürətdə 5 dəqiqə ərzində fizioloji məhlulda bir dəfə yuyurlar. Çöküntüdə 10 mlrd eritrosit ola bilər. Eritrositləri fizioloji məhlulla lazımı qatılığa qədər çatdırmaqla durulaşdırırlar.

İŞ 83

DOVŞANDAN QANIN GÖTÜRÜLMƏSİ

İntakt dovşandan alınmış zərdab təcrübələrdə sitotoksiki reaksiyalar zamanı komplement qismində istifadə edilir. Bundan başqa, immun antizərdablarının alınması üçün adətən dovşanlardan istifadə olunur. İntakt və təcrübi dovşanlar 2 ilə qədər donor ola bilərlər. Qan onların qulaq seyvanının kənar venasından götürülür.

İşin gedişi

1. Qulağın daxili səthində ortadan kənar venanın yerləşdiyi sahənin 1x1 sm ölçüdə tükünü təmizləyirlər və açılmış dərinini spirtlə dezinfeksiya edirlər.
2. **DİQQƏT!** *Ülgüclə venanı üzdən köndələn çətirirlər. Kəsik yerinin altına sınaq şüşəsinə tuturlar və onu quru steril pambıqla silirlər.*
3. Əgər prosedür düzgün aparılıbsa və dovşan sakitdirsə, qan damla-damla sınaq şüşəsinə töküləcək. Dovşanı istidə saxlamaq məqsədilə onun üstünə dəsmal örtmək məsləhətdir.
4. Qlükoza və fizioloji məhlulu daxil etmədən adətən 10-20 ml qan götürürlər. Əgər daha çox miqdarda qan tələb olunursa (50 ml), bu halda qanı götürdükdən sonra itirilmiş mayenin bərpa olunması üçün fizioloji məhlulun venadaxili yeridilməsi zəruridir.
5. Zərdabın alınması üçün yuxarıda təsvir edilmiş prosedurları yerinə yetirirlər (bax «Zərdabın alınması məqsədilə qanın götürülməsi», 6-10-cu bəndlər).
6. Eritrositlərin alınması üçün qanı içərisində heparin olan sınaq şüşəsinə yığırlar.

İŞ 84

HÜCEYRƏ SUSPENZİYALARININ HAZIRLANMASI

Hüceyrə suspenziyalarının keyfiyyəti hüceyrələrin həyat qabiliyyəti və hüceyrə suspenziyasında aqreqatların olmaması ilə müəyyənləşdirilir. Buna qismən yuxarıda nəzərdən keçirilən müvafiq tələblərin yerinə yetirilməsi sayəsində nail olmaq olar. Bu tələblərin vacibliyini nəzərə alıb bir daha onlara diqqət yetirək.

DİQQƏT! Orqan və hüceyrələrin ayrılmasını aseptik şəraitdə və soyuqda aparırlar.

Reaktiv və ləvazimat:

- Steril göz cərrah alətləri (qayçılar, pinsetlər, skalpellər).
- Steril mühit 199 və ya RPMİ 1640.
- Steril plastik və ya şüşə qablar (tutumu 5-10 ml olan sınaq şüşələri, 2-10 ml-lik pipetkalar, qıflar, Potter homogenizatoru, Petri qabları, kapilyarlar).
- Steril kapron süzgəcləri.
- Buz.
- Qoryayev kamerası.
- Soyuduculu sentrifuqa.
- Işıq mikroskopu.

İşin gedişi

1. Orqanların ayrılmasını steril alətlərlə aparırlar.
2. Alınmış orqanları buz üzərindəki steril Petri qablarına yerləşdirirlər.
3. Orqanları birləşdirici və əzələ toxumalarından təmizləmək lazımdır.
4. Ayrılmış orqanları soyuq mühitdə (+4-7°C) homogenizə edirlər.
5. Alınmış hüceyrə suspenziyasını bir və ya iki dəfə 4-qatlı steril kapron süzgəcdən keçirtmək lazımdır.
6. Hüceyrə suspenziyası ilə sınaq şüşələrini içərisində buz olan stəkana yerləşdirmək lazımdır.
7. Hüceyrələri 5 dəqiqə ərzində 1500-2000 g sürətlə çökdürürlər.
8. Supernatantı atırlar, müəyyən qatılıqlı hüceyrə suspenziyasının alınması üçün çöküntüyə lazımi miqdarda soyudulmuş mühit (2-5 ml) əlavə edirlər.
9. **DİQQƏT!** Kapilyarlara çəkilmiş hüceyrə suspenziyasını digər nazik uzun ağızlı kapilyardan keçirməklə əmələ gəlmiş aqreqatları suspenziyadan kənarlaşdırmaq mümkündür.
10. Alınmış hüceyrə suspenziyasını Qoryayev kamerasında hesablayırlar.

İŞ 85

QORYAYEV KAMERASINDA HÜCEYRƏLƏRİN SAYILMASI

Qoryayev kamerası qanın formalı elementlərinin və hüceyrə suspenziyalarının hesablanması üçün nəzərdə tutulub. Qoryayev kamerası müəyyən dərinliyə malik olan və dibi dəqiqliklə böyük və kiçik kvadratlara bölünmüş xüsusi əşya şüşəsidir. Kameranın iş meydançasını əhatə edən novçalar mayenin artığının yığılmasına xidmət edir. Qoryayev kamerası – dəqiq ölçücü cihazdır və ehtiyatla yanaşma tələb edir. Kameranın dərinliyi 0,1 mm təşkil edir. Böyük kvadratın sahəsi 1/25 mm², kiçiyin – 1/400 mm²-ə bərabərdir. Beləliklə, böyük kvadratın üstündəki mayenin həcmi 4·10 mkl, kiçiyin üstündəki mayenin həcmi 0,25·10 mkl təşkil edir.

DİQQƏT! *Limfoid hüceyrələrin hesablanması üçün hüceyrə suspenziyasının az miqdarını limfoid hüceyrələrini zədələmədən 3%-li sirkə turşusu ilə durulaşdırmaq lazımdır. Bu zaman, həmçinin suspenziyada olan eritrositlər lizisə uğrayırlar.*

Hüceyrə suspenziyasının başlanğıc qatılığından asılı olaraq suspenziyanı 20, 50 və ya 100 dəfə durulaşdırırlar. Bunun üçün suspenziyadan 10 mkl götürüb üzərinə 190 mkl (20 dəfə durulaşdırılma), 490 mkl (50 dəfə) və ya 990 mkl (100 dəfə) 3%-li sirkə turşusu əlavə edirlər. Sonra hesabat aparırlar.

Reaktiv və ləvazimat:

- Işıq mikroskopu
- Tutumu 1 ml, 200 mkl, 10 mkl olan avtomatik pipetkalar
- Qoryayev kamerası
- Tədqiq olunan hüceyrələr suspenziyası
- 3%-li sirkə turşusu

İşin gedişi

1. Təmiz əşya şüşəsini (kameranı) örtücü şüşə ilə örtürlər və onu ehtiyatla qıraqlardan sıxırırlar.

DİQQƏT! *Örtücü şüşənin ortasından basmaq qəti qadağandır, çünki bu onun korlanmasına səbəb ola bilər.*

Örtücü şüşənin qıraqları üzrə interferensiya halqalarının əmələ gəlməsi kameranın düzgün yığılmasının göstəricisi ola bilər.

2. Kameranı tədqiq olunan suspenziya ilə doldururlar. Bunun üçün damlanı yan kənara yaxınlaşdırmaq kifayət edir. Kapilyar qüvvələrinin təsiri altında maye öz-özünə kameraya dolacaq.

3. Hüceyrələri və şəbəkə xətlərini aydın görmək üçün işıqlanmanı və böyüdülməni seçməklə mikroskopu işçi vəziyyətə gətirirlər. Kameranın doldurulmasından bir qədər vaxt keçdikdən sonra hüceyrələr çökür.
4. Hüceyrələri bir neçə kvadratda sayırlar. Bu zaman kvadratın yuxarı və sol tərəflərində yerləşən hüceyrələr nəzərə alınır, lakin aşağı və sağ tərəflərdə yerləşən hüceyrələr nəzərə alınmır. Adətən hüceyrələri iyirmi beş böyük kvadratda, yeni bir şaquli sütunda yerləşən bütün kvadratlarda (15 kvadrat) və qonşu sütunun ştrixlənmiş kvadratlarında (10 kvadrat) hesablanır. Suspenziyanın 100 dəfə durulaşdırılması zamanı alınmış rəqəm millionlarla ifadə edilən qatılığına uyğun gəlir (mln/ml).

Nəticələrin statistik işlənməsi

Hüceyrələrin qatılığının təyini üçün lazım olan kvadratların miqdarı suspenziyanın müxtəlifcinsli olması ilə və tələb olunan dəqiqlik ilə müəyyənləşdirilir. Hesabatın 25 kvadratda aparılması mütləq deyil, kvadratların sayını azaltmaq olar. Üsulun dəqiqliyinin təyini üçün orta kvadratik kənarlanmanı və orta qiymətin standart səhvini hesablayırlar. Hüceyrələrin qatılığının hesablanması zamanı standart səhv 0,2-dən (20%-dən) artıq olmamalıdır. Əgər, o, ehtimal edilə bilən qiymətlərdən artıqdırsa, bu halda hesaba alınan kvadratların sayının artırılması və suspenziyanın həmcinsliliyinin artırılması üçün müəyyən tədbirlərin görülməsi zəruridir. Ehtiyac duyulduqda hüceyrə suspenziyasını durulaşdırırlar və ya (nadir hallarda) sentrifuqa vasitəsilə qatılaşdırırlar.

Nəticələrin statistik işlənməsi zamanı aşağıdakı düsturlardan istifadə etmək olar:

- orta arifmetik
$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n};$$

burada

x_i – ayrı-ayrı variantlar;

n – variantların sayı.

- orta kvadratik kənarlanma

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}} \quad \text{və ya}$$

burada

x_i – ayrı variantlar;

$\sum x_i$ – variantların cəmi;

n – variantların sayı.

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}};$$

- orta arifmetik qiymətin standart səhvi

$$S_{\bar{x}} = \frac{\sigma_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}.$$

Nəticələri cədvəl və qrafik şəklində tərtib edirlər.

İŞ 86

ANTİZƏRDABLARIN ALINMASI

Müxtəlif mənşəli antigenlərə qarşı heyvanların yüksək spesifikli immun antizərdablarının alınması 2-3 ay müddətində baş verə bilən kifayət qədər uzunmüddətli bir prosesdir. Bunun müqabilində tədqiq olunan antigenə qarşı uzun müddət ərzində anticisimciklər sintez edən heyvanlar alınır. Antigenin az (testləşdirici) dozasının daxil edilməsindən 6-7 gün sonra onların qanında anticisimciklərin titri kəskin dərəcədə artır.

Yüksək spesifikli (yüksək affinli) antizərdabların

alınmasının əsas şərtləri

- Antizərdabın alınması üçün heyvan və antigenin düzgün seçimi tələb olunur. Onlar bir-birindən genetik cəhətdən nə qədər uzaq olsalar, bir o qədər immunizasiya üçün az vaxt tələb olunacaq və yüksək spesifikli antizərdabın alınması asanlaşdırılacaq. Genetik qohumluğun mövcudluğu zamanı antizərdabın alınması çətinləşir və bu proses daha uzunmüddətli olur.
- Ətraflı düşünülmüş immunizasiya sxemləri tərtib olunmalıdır. İmmunitetin humoral və ya hüceyrəvi bəndinin stimulyasiyası üçün antigenin daxil edilməsinin daha əlverişli üsullarını; onların yeridilmələri arasında olan vaxt intervalları; heyvanda anticisimciklərin ən yüksək sintezinə səbəb olan antigenin optimal dozalarını müəyyən etmək lazımdır. Antigenin optimal dozası hər təcrübədə həm heyvanın immun sistemi, həm də antigen üçün seçilir. Bir antigenin eyni dozası siçanların müxtəlif xətlərində haploid xromosom dəstindən asılı olaraq anticisimciklərin müxtəlif səviyyədə əmələ gəlməsinə səbəb ola bilər. Məlumdur ki, korpuskulyar antigenlər daha immunogendir, ona görə də fundamental tədqiqatlarda eritrositlərə üstünlük verilir. Həll olan antigenlər də yüksək immunogen ola bilər (məs., öküz zərdab albumini), lakin onlar tezliklə orqanizmdən kənarlaşdırılırlar və effektiv immun cavabın inkişafı üçün onların orqanizmdə zəruri qalma vaxtını uzatmaq məqsədilə adyuvantlardan (neytral mineral yağlar) istifadə edilir. Əgər antigenin molekulyar çəkisi 100 kDa-dan çoxdursa, bu halda o yaxşı immunogen sayılır. Antigenin molekulyar çəkisi 5-10 kDa-dan az olduğu halda istifadə edilən antigenə qarşı immun cavabın yaradılması məqsədilə antigeni inert daşıyıcılara (məs., lateks) birləşdirərək onun molekulyar çəkisini artırırırlar. Belə antigenlərə haptənlər deyilir. Əksər hallarda optimal dozadan bir qədər fərqlənən antigenin makro- və mikrodozaları toleranlığın yaranmasına, yeni daxil edilmiş antigenə qarşı cavabın yaranmasına gətirib çıxarır.

İmmun cavabın yaranması üçün antigenin daxil edilmə üsulu böyük əhəmiyyət kəsb edir, çünki bu halda antigen immunitetin müxtəlif bəndlərini fəallaşdırır. Venadaxili, peritondaxili, dalaq daxili yeridilmə ilk növbədə humoral cavabı – spesifik B-limfositlər klonunun formalaşmasını stimullaşdırır. Bundan əlavə yaddaş B-hüceyrələri əmələ gəlir. Dərialtı və dəridaxili yeridilmə ilk növbədə hüceyrəvi immunitetin yaranmasına gətirib çıxarır. Daxil edilmiş antigen yaxınlıqda yerləşən limfa düyünlərinə çatdırılır ki, burada yetkin T-hüceyrələri T-effektor hüceyrələrə çevrilir. T-yaddaş hüceyrələri əmələ gəlir. Yaddaş hüceyrələri antigenin təkrar daxil edilməsi zamanı daha tez və effektiv immun cavabın yaranmasına kömək edirlər. İmmunizasiya sxemini tərtib edərkən bütün sadalanan cəhətləri nəzərə almaq lazımdır.

- Antizərdabın alınması üçün qanı sonuncu immunizasiyadan 6-7 gün keçdikdən sonra götürürlər, zərdabı inaktivləşdirirlər, yəni komplement sisteminin zülallarını parçalayırlar. Bunun üçün zərdabı 30 dəqiqə ərzində 56°C temperatur şəraitində qızdırırlar. Sonra alınmış antizərdabın yalnız seçilmiş antigenə qarşı spesifik olması məqsədilə onu donorun transplantasiya antigenlərinin tam yığımina malik olan hüceyrələrlə tam absorbsiyaya məruz qoyurlar. Adətən bunun üçün eritrositlərdən, qan zərdabından, qaraciyər hüceyrələrindən istifadə edirlər. Antizərdabın spesifikliyinə və absorbsiyanın təmliyinə nəzarət hemaqqlütinasiya reaksiyası və sitotoksiki reaksiya ilə həyata keçirilir.
- Antizərdabı porsiyalarla steril ampulalara (0,2-1,0 ml) doldururlar, bir il və daha artıq müddət ərzində -20°C... - 70°C-də maye azotda və ya soyuducuda saxlayırlar.

DİQQƏT! Zərdabı *əritmək qətiyyəən olmaz, çünki bu halda o öz fəallığını itirir.*

İMMUN VƏ TOLERANT SIÇANLARIN ALINMASI

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, immun və ya tolerant heyvanların alınması üçün müvafiq immunizasiya sxeminin seçilməsi xüsusi əhəmiyyət kəsb edir.

Reaktiv və ləvazimat:

- Tutumu 1,0 ml, 2,0 ml və 5,0 ml olan şprisler, iynələr
- Steril fizioloji məhlul
- Qoyun eritrositləri (QE)
- Siklofosfamid
- Soyuduculu sentrifuqa

İŞ 87

İLKİN İMMUN CAVABIN ALINMASI

İlkin immun cavabın öyrənilməsi üçün siçanları bir dəfə antigenin optimal dozası ilə immunizə edirlər. Antigenin optimal dozasını müəyyən etmək üçün adətən bir-birilərdən qatılıqlarına görə 10 dəfə fərqlənən üç dozayı yoxlayırlar. Məs., QE ilə aparılan təcrübədə 4 heyvan qrupundan istifadə edirlər: birinci qrupa 10 mln/siçan, ikinci qrupa 100 mln/siçan, üçüncü qrupa 1 mlrd/siçan antigen daxil edirlər, dördüncü qrup nümunədir. Hər qrupa üç siçan daxil edilir.

İşin gedişi

1. QE göstərilən miqdarlarda fizioloji məhlulun 0,2 ml həcmində daxil edilir.
2. V/d yeridilmədən 5 gün və ya p/d yeridilmədən 6-7 gün sonra heyvanların dalağında İgM sinfinin anticisimciklərini sintez edən plazmatik hüceyrələrin ən böyük miqdarı müşahidə olunur. Onları komplementlə inkubasiya etməklə QE-nin aqarda lokal hemolizi üsulu ilə qeydə almaq olar.
3. Üç qrupun nəticələrini müqayisə edirlər və optimal dozanı müəyyən edirlər. QE üçün optimal doza 100 mln/siçana bərabərdir.

İŞ 88

İKİNCİLİ İMMUN CAVABIN ALINMASI

İkincili immun cavabın öyrənilməsi üçün siçanları ən azı iki dəfə immunizə edirlər. Birinci inyeksiya (sensibilizasiyaedici doza) kiçik ola bilər, immun sistemin fəallaşdırılacaq bəndindən asılı olaraq yeridilmə ya venadaxili, ya da dərialtı aparılır. İkinci inyeksiya (testləşdirici doza) 4-7 gündən sonra və həmçinin təcrübənin məqsədindən asılı olaraq ya peritondaxili (humoral immunitetin öyrənilməsi üçün), ya da dəridaxili yeridilmə (hüceyrəvi immunitetin öyrənilməsi üçün) tətbiq edilir. Nəticələrin qeydi 4-cü gün aparılır. Qeyd etmək lazımdır ki, antigenin təkrar yeridilməsi zamanı immun cavab yaddaş T- və B-hüceyrələrinin sayəsində daha effektiv olur.

İşin gedişi

1. 0,2 ml fizioloji məhlulda v/d 1mln QE daxil edirlər.
2. 4 gündən sonra 100 mln QE p/d yeridirlər.
3. 4 gündən sonra immun siçanların dalağında əsasən İgG sintez edən hüceyrələrin maksimum miqdarı müşahidə edilir. Nəticələrin qeydini komplementlə inkubasiya etməklə QE-nin aqarda lokal hemolizi üsulu vasitəsilə aparırlar.

İŞ 89

TOLERANT SIÇANLARIN ALINMASI

Antigenə qarşı tolerant olan siçanların alınması üçün müxtəlif sxemlər mövcuddur. Lakin onların hamısı ümumi qaydaya tabe olurlar. Əvvəla, immunogenə (effektiv immun cavaba səbəb olan antigenə) qarşı spesifik immunoloji tolerantlıq almaq çox çətinidir. Antigenin tez-tez təkrarlanan kiçik dozalı inyeksiyaları ilə aşağızonalı tolerantlıq, onun böyük dozalı inyeksiyaları ilə isə, yüksəkzonalı tolerantlıq əldə etmək olar. İmmunogen antigenlərə qarşı tolerantlığın alınması üçün immunodepressiv agentlərdən də istifadə edirlər. Aşağıda immunoloji tolerantlığın alınması sxemlərindən birini təqdim edirik.

İşin gedişi

1. QE-ni 6,2 mlrd/siçan dozasında p/d yeridirlər. Bu zaman bütün ehtiyat limfoid hüceyrələrinin güclü fəallaşması baş verir və onlar proliferasiya edirlər.

2. 48 saatdan sonra 200 mq/kq dozada SF (proliferasiya olunan hüceyrələrə təsir edən alkülləşdirici immunodepressant) yeridirlər. QE-nə spesifik reaksiya verən limfosit klonları fəal proliferasiyaya başladıkları üçün eliminasiyaya məruz qalırlar.
3. 1 həftə keçdikdən sonra təcrübi və kontrol (intakt və ya yalnız SF alan) siçanlara QE-nin testləşdirici dozasını (100 mln/siçan) v/d yeridirlər.
4. 4 gündən sonra dalağın plazmatik hüceyrələrini komplementlə inkubasiya etməklə QE-nin aqarda lokal hemolizi reaksiyasında hesablayırlar. Təcrübi siçanlarda plazmatik hüceyrələr aşkar edilmir, kontrol heyvanlar QE-nin testləşdirici dozasına normal immun reaksiya ilə cavab verirlər.
5. Bu tolerantlıq vəziyyəti təxminən 1 ay davam edir, sonra QE-nə qarşı immun reaktivlik bərpa olunur.

VI BÖLMƏYƏ AİD SUALLAR

1. Singen heyvanlar nə deməkdir?
2. İmmunitetin humoral və hüceyrəvi bəndlərini stimullaşdırmaq məqsədilə antigenləri heyvan orqanizminə hansı yollarla yeritmək olar?
3. İmmun sistemin mərkəzi və periferik orqanlarına hansıları aid olunur?
4. Təcrübi heyvanlarda ilkin və ikincili immun cavabı hansı tədqiqatlar vasitəsilə öyrənmək olar?

VII BÖLMƏ

İMMUNOFERMENT ANALİZİ

İmmunof ferment analiz (İFA) üsullarının əsas xüsusiyyəti analiz zamanı nişan qismində fermentlərin – funksional fəal bioloji molekulların istifadə olunmasıdır. Üsulun prinsipi ondan ibarətdir ki, İFA üçün immunoreagentlərin - antigen (AG) və ya anticisimciklərin (AC) ferment molekulları ilə komplekslərindən istifadə edilir. Ferment molekulunun immunoreagentlə (AG və ya AC) kompleksi **konyuqat** adlanır. Konyuqatın hər iki komponenti: immunoreagent və ferment – öz funksional fəallıqlarını itirmirlər, yəni müvafiq olaraq, immun komplekslərini əmələ gətirə və substratı parçalaya bilirlər. İFA-nın xarakterik xüsusiyyətləri bunlardır:

1) AG-AC reaksiyalarına xas olan yüksək spesiflik;

2) sərbəst ferment molekulları kimi, konyuqasiya olunmuş ferment molekullarının asanlıqla aşkar olunan məhsullar əmələ gətirərək substratı parçalamaq qabiliyyəti hesabına əldə edilən yüksək həssaslıq. İFA zamanı analizin nəticələri reaksiyanın rəngli məhsullarının optik sıxlığına əsasən təyin edilir. Optik sıxlığın ölçülməsi üçün xüsusi spektrofotometrlərdən və ya İFA-riderlərdən istifadə olunur.

1970-ci illərin əvvəllərindən hal-hazırədək İFA-nın aparılmasının müxtəlif variantları işlənilib hazırlanmışdır. Hazırda homogen və heterogen İFA növləri ayırd edilir.

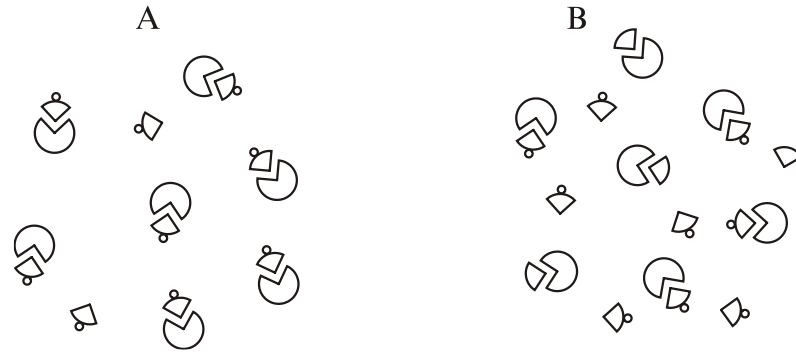
Homogen İFA-nı, həmçinin komponentləri ayırmadan aparılan İFA adlandırırlar (EMIT – ing. Enzyme multiplied immunoassay technique). İFA-nın homogen variantının əsas mahiyyəti ondan ibarətdir ki, bu zaman immunoreagentlərin qarşılıqlı təsiri nəticəsində fermentin fəallığı tormozlana və ya induksiya oluna bilər. Hər bir fermentin katalitik fəallığı onun çoxsaylı q/kovalent və disulfid rabitələrin köməyi ilə formalaşan fəza quruluşundan asılıdır. Lakin q/kovalent kimyəvi rabitələr möhkəm deyillər və müxtəlif amillərin təsiri nəticəsində asanlıqla parçalanır və ya xeyli zəifləyirlər. Onlardan biri ferment molekulunun fəza quruluşunun və nəticə etibarilə onun katalitik fəallığının dəyişməsinə səbəb olan əlavə q/kovalent qarşılıqlı təsirlərdir. Əgər AC ilə birləşmiş fermentlə nişanlanmış AG-lərin fəallığı sərbəst nişanlanmış AG-lərin fəallığından nəzərə çarpacaq dərəcədə fərqlənirsə, bu halda tədqiq olunan nümunənin fermentativ fəallığını sərbəst və AC ilə birləşmiş nişanlanmış AG-ləri ayırmadan ölçmək olar. Homogen İFA-nın aparılmasının prinsipal sxemi 14-cü şəkildə göstərilib.

Homogen İFA-da fermentlərdən başqa nişan qismində indikator fermentin fəallığını dəyişdirə bilən modulyatorlar da (ingibitorlar və ya induktorlar) istifadə edilə bilər. Homogen İFA əsasən bioloji mayelərdə (qan, limfa, sidik, tüpürcək) kiçikmolekullu AG-lərin (toksinlərin, steroid hormonların, haptənlərin və dərman preparatlarının) qısa bir müddətdə təyini üçün istifadə olunur.

Heterogen və ya bərkfəzalı İFA, və ya başqa sözlə desək fermentdən asılı immunosorbent analizi (ELISA – ing. Enzyme-linked immunosorbent assay) zamanı isə, immunoreagentlər (AG və ya AC) bərk fəza üzərində fiksə olunurlar. Bu analiz zamanı reaksiyanın birləşməmiş komponentləri analizin hər mərhələsindən sonra mütləq

yuyulmaqla kənarlaşdırılırlar. Heterogen İFA-nı, həmçinin komponentlərin ayrılması ilə həyata keçirilən analiz adlandırılır. Prosesin sadəliyi və ultrahəssaslığı sayəsində bərkfazlı İFA tibbi-bioloji tədqiqatlarda çox geniş tətbiq edilir. Bərkfazlı immunoferment sistemləri xüsusilə virus və infeksiya xəstəliklərinin kütləvi diaqnostikasında, immun komplekslərin aşkarlanmasında, anticisimciklərin izotiplərinin müəyyənləşdirilməsində və s. əlverişlidir.

İFA-nın aparılması üçün bərk faza qismində polistirol, polivinilxlorid, polipropilen, dekstran, poliakrilamid, aqaroza gəlləri, sellüloza, nitrosellüloza, neylon və s. materiallardan istifadə olunur. Bərk faza sınaq şüşəsi, mikrotitrlemə üçün planşetlər, kürəciklər, nazik təbəqələr və s. şəklində ola bilər. Lakin, hal-hazırda əsasən yastı dibə malik olan titrləmə üçün 96 oyuqlu plastik planşetlərdən istifadə olunur. Bu cür planşetlər həm alınmış nəticələrin Multiscan tipli İFA-riderlərində qiymətləndirilməsi, həm də ümumiyyətlə istifadə üçün çox əlverişlidir.



Şək.14. Homogen İFA-nın prinsipi. Əgər tədqiq olunan nümunədə AG yoxdursa (A), bu halda fermentlə nişanlanmış AG (AGF) müvafiq AC-lərlə birləşəcək və AC-AGF kompleksin tərkibinə daxil olan ferment öz katalitik fəallığını itirəcək. Əgər nümunədə tədqiq olunan AG mövcuddursa (B), bu halda AG və AGF arasında AC ilə birləşmək uğrunda rəqabət gedəcək. Bu zaman AGF-in bir qismi məhlulda birləşməmiş vəziyyətdə qalacaq və substratın parçalanmasını kataliz edəcək. Bu halda AGF-in fermentativ fəallığı tədqiq olunan nümunədə sərbəst AG-nin miqdarına düz mütənasibdir.

Şəkillər üçün şərti işarələr:

- ◇ - tədqiq olunan nümunədə AG;
- ◇ - fermentlə nişanlanmış ferment (AGF);
- ◇ - müəyyən AG-ə uyğun olan AC;
- ◇ - ferment öz fəallığını itirdiyi AC-AGF immun kompleksi;
- ◇ - bərk faza üzərində AC;
- ◇ - bərk faza üzərində AG;
- ◇ - sərbəst AC;

- bir epitopa malik olan sərbəst AG;
- iki epitopa malik olan sərbəst AG;
- fermentlə nişanlanmış AC (konyuqatlar);
- konyuqatda istifadə olunan fermentin substratı.

Müxtəlif təbiətli (zülallar, nuklein turşuları, peptidlər, polisaxaridlər, lipopolisaxaridlər) AG-lərin və AC-lərin əksəriyyəti plastik səthində öz-özünə adsorbsiya edirlər. Adsorbsiyanın dərəcəsi molekulun fiziki-kimyəvi xassələrindən, qatılığından, birləşmə sahəsinin daxil edilmiş nümunənin həcminə olan nisbətindən, inkubasiya müddətindən və temperaturdan asılıdır. Zülallar pH-in yüksək qiymətlərində yaxşı adsorbsiya edirlər. Bu səbəbdən adətən AG və AC-nin hopturulması üçün 0,05M karbonat-bikarbonat buferindən (pH 6,0) istifadə edirlər. Sensibilizasiya üçün təmiz zülal immunoreagentlərinin optimal qatılığı 1-10 mkq/ml təşkil edir. Bunun üçün immunoreagent məhlulunun 50-100 mkl-ni oyuğa daxil edirlər. Məhlulu 12-14 saat ərzində 4°C-də soyuducuda inkubasiya edirlər. Plastik səthində adsorbsiya olunmuş AG və ya AC-lər adətən tərkibində detergent olan buferlə yuyulurlar, bərk faza ilə birləşməmiş molekul isə, yuyulma zamanı oyuqlardan asanlıqla ayrılırlar.

Heterogen İFA-nı korpuskulyar AG-lərlə (bakteriya və eukariot hüceyrələri, viruslar, xromosomlar və s.) aparılan işlərdə də istifadə etmək olar. Bakteriya hüceyrələri plastik səthə qurudulma ilə bərkidilir. Belə rəbitənin möhkəmləndirilməsi üçün birləşmiş hüceyrələri 0,1-0,25%-li qlutar aldehidi məhlulu ilə fiksasiya etmək olar. Bu cür fiksasiya zamanı epitoplara kiçik hissəsi denaturasiyaya uğraya bilər.

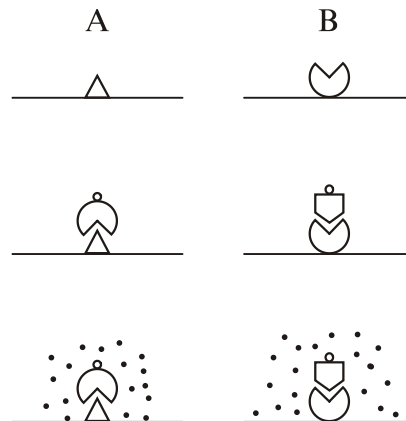
İFA-da istifadə edilən ən geniş yayılmış marker-fermentlər qıtıqotunun peroksidazası və qələvi fosfatazalarıdır. Bu fermentlər üçün həll olan substratlar isə, müvafiq olaraq ortofenilendiamindihidrokslorid (OFD) və qələvi N-p-nitrofenilfosfatdır (PNFF).

AG və AC-lərin aşkarlanması və vəsfi təyini üçün onların bərk fazada adsorbsiyası üsulu ilə aparılan heterogen İFA-nın aşağıdakı iki variantından istifadə olunur. **Ardıcıl** və ya **q/rəqabətli** və **rəqabətli** analiz üsulları. Praktikada ardıcıl heterogen İFA-nın müxtəlif variantları daha geniş istifadə olunur.

Ən sadə variantlardan biri ikiqat immun komplekslərin əmələ gəldiyi **birbaşa İFA** üsuludur. Birbaşa İFA-nın aparılması zamanı planşetin oyuqlarını AG və AG ilə sensibilizə edirlər. Bərk fazada boş qalmış yerləri bloklaşdırırlar, sonra isə fermentlə nişanlanmış AC və ya AG-ləri oyuqlara əlavə edirlər. Bu zaman tərkibində ferment olan immunoreagentlə sərbəst immunoreagentlər bir-birilə komplementar olduqda bərk faza ilə birləşir. 15-ci şəkildə İFA-nın birbaşa variantının sxemi göstərilib. İFA-nın bu variantı bərk fazada (A) adsorbsiya olunmuş nümunədə AG-nin aşkarlanması üçün, həmçinin fermentlə nişanlanmış AC-lərin (B), məs. antiqlobulinlərin keyfiyyətinə nəzarət üçün istifadə olunur. Axırncı halda oyuqların üzərinə standart spesifik AG-i adsorbsiya edirlər və sensibilizasiyadan, bloklaşmadan və yuyulmadan sonra analiz olunan konyuqatı oyuqlarda titrləyirlər. Birləşməmiş komponentlərin inkubasiyası və yuyulmasından sonra oyuqlara substrat məhlulunu əlavə edirlər. Fermentativ reaksiya başa çatdıqdan sonra alınmış nəticələri konyuqatın ilkin nümunəsi ilə müqayisə edirlər.

Bərkfazlı İFA-nın dolay üsulu 70-ci illərin əvvəlində işlənilib hazırlanmışdır. İFA-nın bu variantı əksnövlü konyuqatların istifadəsi ilə aparılır. Bu üsulla əksnövlü immunoferment konyuqatların məhdud yığılmasına malik olmaqla müxtəlif xəstəliklərin serodiagnostikasını asanlaşır. Bundan başqa, siçanın immunoqlobulinlərinə qarşı spesifik olan konyuqatdan istifadə edərək spesifik monoklonal AC-lərin müəyyənləşdirilməsi məqsədilə hibridomaların kultural mayesinin gündəlik analizi zamanı da İFA-nın bu variantından istifadə edirlər. Bərkfazlı İFA-nın dolay variantının aparılmasının sxemi 16-cı şəkildə göstərilib.

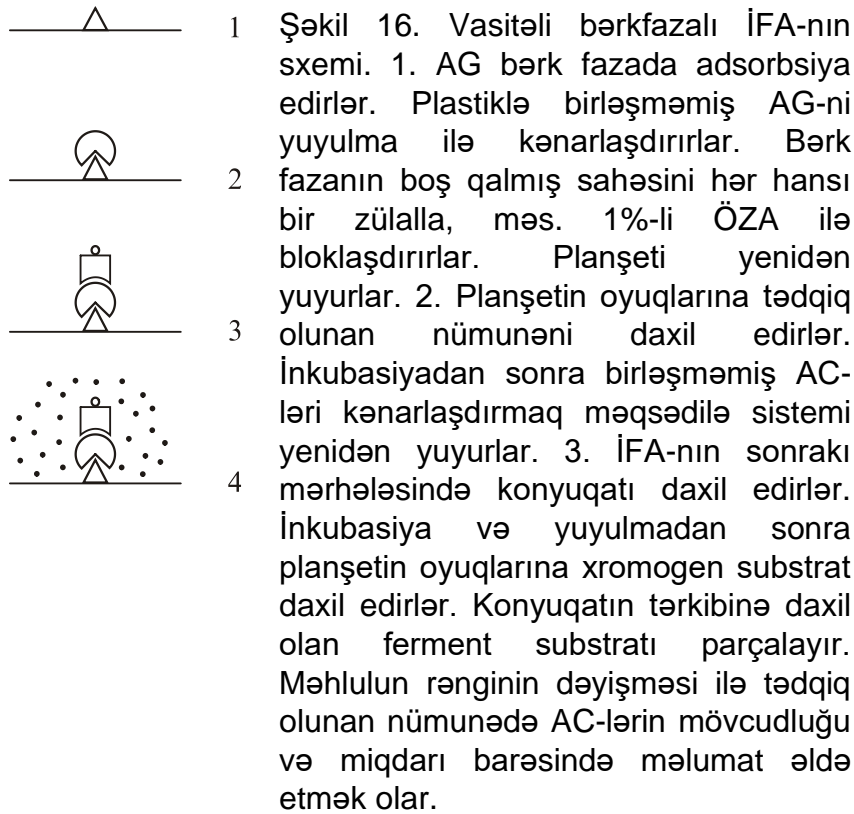
AG və immun komplekslərin nümunələrdə təyin edilməsi üçün İFA-nın «sendviç» variantı geniş istifadə olunur (şək. 17).



Şəkil 15. AG (A) və AC-lərin (B) bərk fazaya adsorbsiyası ilə aparılan birbaşa bərkfazlı İFA-nın prinsipal sxemi. İFA-nın ardıcıl mərhələləri (yuxarıdan aşağı): AG (A) və ya AC-nin (B) bərk faza üzərinə adsorbsiyası; spesifik konyuqatın əlavə edilməsi; hər bir analizin son mərhələsi substratın əlavə olunmasıdır. Analizin hər bir mərhələsindən sonra aparılan yuyulma proseduru və bərk fazanın blokladılması mərhələsi şəkildə göstərilməyib.

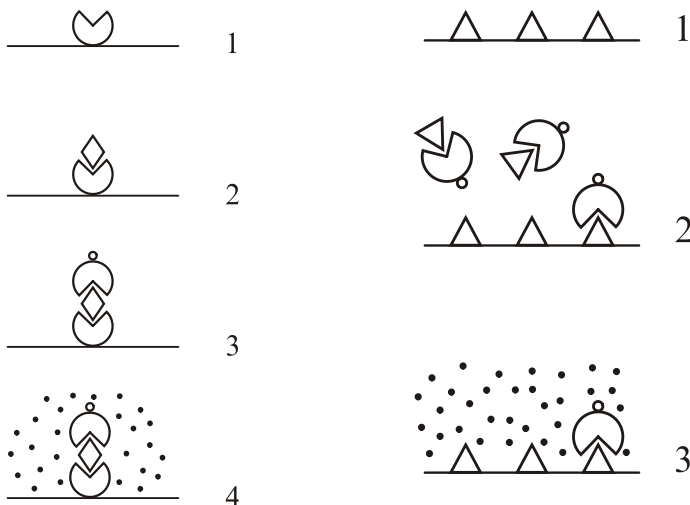
Yadda saxlamaq lazımdır ki, bərkfazlı İFA-nı apararkən hər mərhələ yuyulma proseduru ilə başa çatır.

İFA-nın «sendviç» variantı aşağıdakı sxem üzrə aparılır. Yüksək affinli və ya monoklonal AC-lər bərk fazaya adsorbsiya olunurlar, plastikə boş qalmış səthini isə blokladırırlar. Sonra tədqiq olunan materialı, müsbət və mənfi kontrolleri oyuqlara daxil edirlər. İnkubasiya və yuyulmadan sonra oyuqlara konyuqat (həmin AG-ə qarşı fermentlə nişanlanmış AC) daxil edirlər. Sonra substratı əlavə edərək rəngli reaksiyanın gedişini müşahidə edirlər. İş zamanı tələb olunan AG AC molekulları arasında «sıxılmış» vəziyyətdə olur. İFA-nın bu variantının «sendviç» adı da elə buradan götürülmüşdür. «Sendviç» variantda tədqiq olunan AG ən azı iki oxşar epitopa malik olmalıdır.



«Sendviç» variantın digər növü AC və immun komplekslərin aşkarlanması məqsədi ilə aparılan analizdir. Bu halda nişan-fermentini AG ilə qarşılıqlı təsirdə olan AC-ə yox, immun komplekslərin tərkibinə daxil olan AC-lərlə əlaqəyə girən antiqlobulin reagentinə birləşdirirlər.

Burada həmçinin İFA-nın antigenin tormozlanmasına əsaslanan variantını da qeyd etmək lazımdır (şək. 18). Bu üsul məhlulda AC-lərin aşkarlanması və miqdarı təyini üçün istifadə olunur.



Şəkil 17. Antigenin aşkar edilməsi üçün İFA-nın «sendviç»

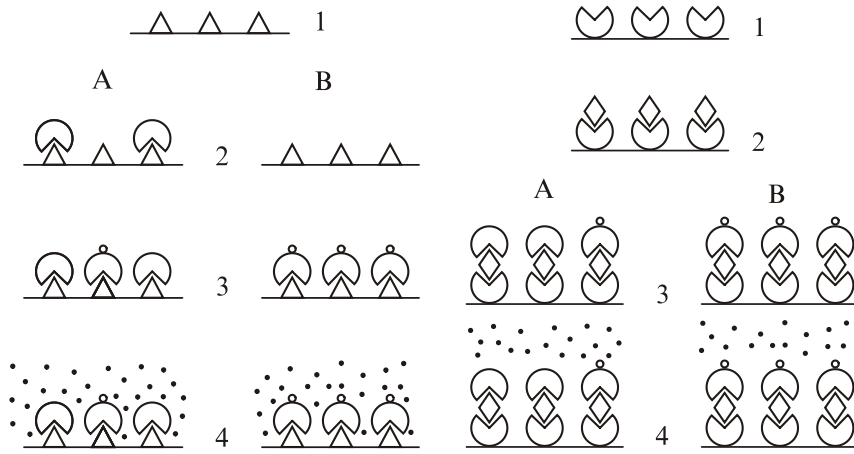
Şəkil 18. İFA-nın antigenlə ingibirləşdirilməsi üsulünün

variantı: 1. bərk fazanın anticisimciklərlə sensibilizasiyası; 2. antigenin daxil edilməsi; 3. spesifik konyuqatın əlavə edilməsi; 4. substratın əlavə edilməsi.

1. bərk fazanın sensibilizasiyası; 2. tədqiq olunan nümunə ilə inkubasiya edilmiş optimal qatılıqlı konyuqatın əlavə olunması. Sərbəst AG-lərin nişanlanmış AC-lərlə birləşməsi bu AC-lərin bərk fazada AG ilə birləşməsinə maneçilik törədir. Bu, analizin son mərhələsində fermentativ reaksiyanın zəifləməsinə səbəb olur. 3. substratın əlavə edilməsi.

Standart AG-i planşetin oyuqlarında adsorbsiya edirlər və konyuqatın optimal qatılığını müəyyənləşdirirlər. Optimal qatılıqlı konyuqata AG məhlulunun hətta minimal miqdarının əlavə edilməsi nişanlanmış AC-lərin bərk faza üzərində adsorbsiya olunmuş AG ilə qarşılıqlı təsirini ingibirə edir. Bu zaman ingibirləşmə dərəcəsi məhlulda olan AG-nin miqdarına düz mütənasib olur ki, bu da məhlulda AG-nin miqdarını təyin etməyə imkan verir. Beləliklə, əgər optimal qatılıqlı konyuqatı AG-nin ardıcıl qatılıqlı nümunələri ilə inkubasiya etsək, sonra isə bu qarışıq adsorbsiya edilmiş AG olan oyuğa daxil etsək, bu zaman sərbəst AG nişanlanmış AC-lərlə birləşərək bu AC-lərin bərk faza üzərindəki AG-lərlə birləşməsinin qarşısını alar. Deməli, konyuqatın tərkibinə daxil olan fermentin nisbətən az miqdarı bərk faza ilə birləşəcək, bu da analizin son mərhələsində fermentativ reaksiyanın zəifləməsinə səbəb olacaq.

İFA-nın şəkl. 19 və 20-də təsvir olunmuş variantları birləşmə yeri uğrunda rəqabət prinsipinə əsaslanırlar. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, burada da əvvəla immunoreagentlərin optimal qatılıqlarını təyin etmək lazımdır. Sonra isə təcrübi material tədqiq edilir. Tədqiq olunan nümunələrin fermentlə nişanlanmış AC ilə qarışdırmaq və inkubasiya etməklə reaksiyanı aparırlar. Nümunədə bərk fazada adsorbsiya olunmuş AG-lərlə homoloji olan AC-lərin mövcudluğu şəraitində bu AC-lər AG ilə birləşmə uğrunda konyuqatla rəqabət aparacaqlar. Nümunədə sərbəst AC-lərin qatılığı nə qədər yüksək olsa, konyuqatın tərkibinə daxil olan ferment molekullarının bir o qədər az miqdarı bərk faza ilə birləşəcək və fermentativ fəallıq mütənasib olaraq azalacaqdır. Şəkl. 20-də təqdim olunmuş variantda oyuqları homoloji AG-lər birləşdirilmiş AC-lərlə sensibilizə edirlər.



Şəkil 19. Adsorbsiya edilmiş
AG-lərlə aparılan rəqabətli
İFA-nın sxemi.

Şəkil 20. Adsorbsiya edilmiş
AC-lərlə aparılan rəqabətli
İFA-nın sxemi.

- A. Tədqiq olunan nümunədə homoloji AC-lərin mövcudluğu zamanı,
B. tədqiq olunan nümunədə homoloji AC-lərin olmaması şəraitində;

1. AG və ya AC ilə bərk fazanın sensibilizasiyası; 2. tədqiq olunan nümunənin və ya spesifik AC-nin oyuqlara daxil edilməsi; 3. konyuqatın və ya nümunə və konyuqatın daxil edilməsi; 4. substratın əlavə olunması.

İŞ 90

İFA-NIN APARILMA SXEM

İşin gedişi

- İFA-nın bütün variantları üçün birinci mərhələdə bərk fazanın (titrləmə planşetinin oyuqlarının) AG və ya AC ilə sensibilizasiyası aparılmalıdır. Hər təcrübə zamanı müsbət və mənfi kontroller nəzərdə tutulmalıdır. Müsbət kontrolu AG və ya AC-lərin standart nümunələri ilə sensibilizə olunan oyuqlarda, mənfi kontrolu isə tərkibində spesifik immunoreagent olmayan məhlullarla sensibilizə olunan oyuqlarda aparırlar. Bundan başqa bir qayda olaraq konyuqatın q/spesifik birləşməsinin aşkarlanması məqsədilə konyuqat kontrolu və substrat kontrolu (İFA-riderdə onu sıfır qismində istifadə edirlər) üçün bir neçə oyuq ayırırlar.
- Sensibilizasiyadan sonra bərk fazanın sərbəst səthinin blokləşdirilməsi aparılır. İmmunoreagentin adsorbsiyasından sonra İFA-nın sonrakı mərhələlərində q/spesifik birləşmənin qarşısını almaq məqsədilə bərk fazada boş qalan yerləri blokləşdirirlər. Blokləşdirmə üçün müxtəlif zülallardan (adətən öküz zərdab albumininin 1%-li məhlulu) və q/ion detergentlərdən (triton X-100, tvin 20: 0,05 – 0,5%-li məhlulları) istifadə olunur.

3. İFA-nın birbaşa variantının icrası zamanı sensibilizasiyadan və bloklanmadan sonra sistemə fermentlə nişanlanmış immunoreagenti – konyuqatı daxil edirlər. İnkubasiyanın şəraiti və vaxtı empirik olaraq müəyyənləşdirilirlər.
4. İnkubasiyadan və yuyulmadan sonra planşetin oyuqlarına istifadə olunan ferment üçün spesifik substratı daxil edirlər və müsbət kontrollu oyuqlarda optimal rənglənmə alındıqdan sonra reaksiyanı dayandırirlar və İFA-riderdə müvafiq dalğa uzunluğunda məhlulların optik sıxlığını ölçürlər.

İŞ 91

VASİTƏLİ İFA-NIN APARILMASI

Təcrübənin məqsədi. İFA-nın vasitəli variantı vasitəsilə bərk fazanın sensibilizasiyası üçün AG-nin optimal qatılığını təyin etmək, AC-ləri aşkar etmək və AG-ə qarşı dovşan antizərdabının titrlərini müəyyən etmək olar.

Reaktiv və ləvazimat:

- Dovşanı immunizasiya edən AG zülalı (qatılığı Louri üsulu ilə təyin olunmalıdır)
- AG-ə qarşı tədqiq olunan dovşan antizərdabı
- Dovşan qanının normal zərdabı (mənfi kontrol)
- Konyuqat – qıtıgotu peroksidazası ilə nişanlanmış dovşan immunoqlobulinlərinə qarşı keçirici AC-ləri
- Öküz zərdab albumini (ÖZA)
- Bufer məhlulları:(əlavələr, 1)
 - Fosfat bufer məhlulu (FBM): 0,1M; pH 7,4
 - Karbonat-bikarbonat bufer məhlulu (KBM):0,2M; pH 9,5
 - Sitrat (substrat) bufer məhlulu: 0,15M; pH 5,0
- Substrat qarışığı (bilavasitə istifadədən əvvəl hazırlanmalıdır): (əlavələr, 2)
- Rəngli fermentativ reaksiyanı dayandıran məhlul: (əlavələr, 3)
- Həcmi tənzimlənən avtomatik pipetkalar: P-10, P-200, P-1000 və onlar üçün bir dəfəlik ucluqlar
- Həcmi tənzimlənən çoxkanallı avtomatik pipetka (50-200 mkl-lik) və bir dəfəlik ucluqlar.
- Spektrofotometr (ışığı filtrin dalğa uzunluğu 492 nm-dir, çünki nişan qismində qıtıgotunun peroksidazası istifadə olunur, substrat OFD-dir və fermentativ reaksiyanı sulfat turşusu ilə dayandırirlar)
- Soyuducu
- 37°C-li termostat
- Tərəzi.
- Maqnit qarışdırıcı.
- pH-metr və indikator kağızının zolaqları.
- Laboratoriya üçün şüşə qab-qacaq.
- Titrləmə üçün yastı dibli 96-oyuqlu planşetlər.

İşin gedişi

1. Aşağıdakı kontrolları nəzərə alaraq, iş dəftərində təcrübənin aparılması sxemini çəkirlər:
 - bərk fazada spesifik AG-nin, yeni immun kompleksin ardıcıl qurulması üçün «özülün» olmaması; bunun üçün planşetin birinci sırasının oyuqlarını (1A-1H) sensibilizə etmirlər, yeni AG məhlulunun yerinə oyuqlara tvinin FBM-də məhlulunu əlavə edirlər;
 - substrat kontrolu – sensibilizə olunmuş oyuqlara 2A-2H yalnız substrat qarışığını, aralıq mərhələlərdə isə dovşan zərdabının və konyuqatın yerinə tvinin FBM-də məhlulunu daxil edirlər;
 - konyuqat kontrolu – sensibilizə olunmamış oyuqlarda 3A-3H dovşan zərdabını tvinin FBM-də məhlulu ilə əvəz edirlər; kontrol konyuqatın AG ilə q/spesifik birləşməsini aşkar edir;
 - mənfi kontrol – dovşan qanının normal zərdabını tvinlə FBM-də 1:100 – 1:800 nisbətində durulaşdırırlar (4-cü cərgədə hər qatılıqdan iki oyuq).
2. Bərk fazanın sensibilizasiyası üçün AG-nin KBM-də 0,05M, pH 9,5 məhlullarını hazırlayırlar. Bu məqsədlə səkkiz təmiz sınaq şüşəsi götürürlər və nömrələyirlər. 1 №-li sınaq şüşəsində AG-nin KBM-də 2,4 ml həcmli və 40 mkq/ml qatılıqlı məhlulunu hazırlayırlar. AG-nin 0,3 mkq/ml qatılığına qədər ardıcıl ikiqat durulaşdırılmanı aparırlar. 2-8 №-li sınaq şüşələrinin hər birinə 1,2 ml KBM əlavə edilir. 1 №-li sınaq şüşəsindən AG məhlulunun 1,2 ml-ni 2 №-li sınaq şüşəsinə keçirirlər. Məhlulu pipetka vasitəsilə qarışdırırlar. 2 №-li sınaq şüşəsindən alınmış AG məhlulunun 1,2 ml-ni 3 №-li sınaq şüşəsinə keçirirlər və s. (cədvəl 15). 8 №-li sınaq şüşəsində AG-nin qatılığı 0,3 mkq/ml olacaq.

Cədvəl 15

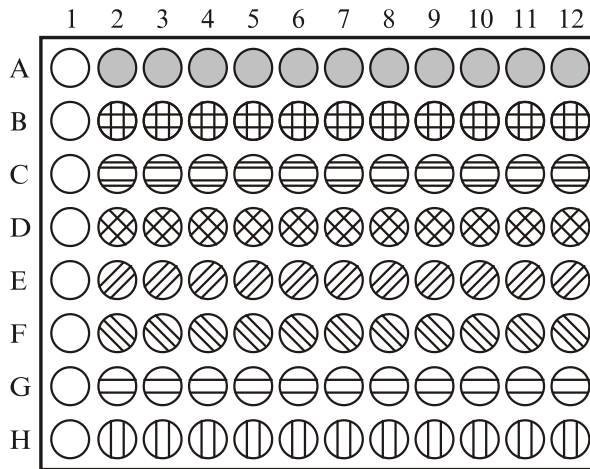
AG məhlulunun durulaşdırılması

İnqrediyentlər	Sınaq şüşəsinin nömrəsi						
	2	3	4	5	6	7	8
KBM, ml	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
AG-nin KBM-də 1 №-li sınaq şüşəsindən məhlulu, ml	1,2 →	1,2 →	1,2 →	1,2 →	1,2 →	1,2 →	1,2 →
AG-nin qatılığı, mkq/ml	20	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3

3. Planşetin oyuqlarına AG məhlullarının 100 mkl-ni əlavə edirlər: 1 №-li sınaq şüşəsindən – A cərgəsinin 2-12 oyuqlarına; 2 №-li sınaq şüşəsindən – B cərgəsinin 2-12 oyuqlarına və s., H cərgəsinə qədər. A-H cərgələrinin birinci sütunun

oyuqlarının hər birinə 100 mkl FBM daxil edirlər (şək. 21). Sonra sistemi 16-18 saat ərzində 4 °C-də soyuducuda inkubasiya edirlər.

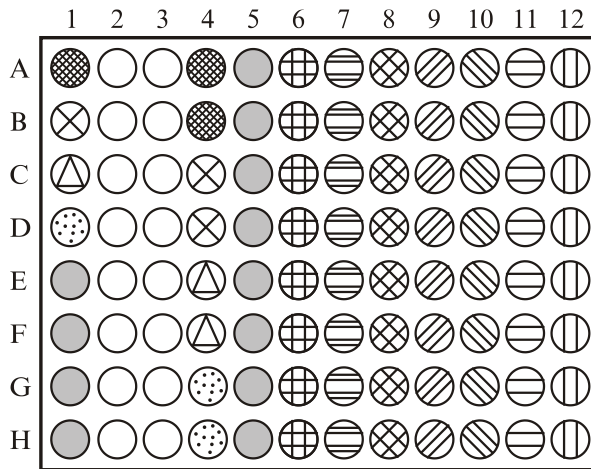
4. İnkubasiyadan sonra AG məhlulunu sürətli hərəkətlə oyuqlardan kənarlaşdırırlar və planşet oyuqlarının hər birinə 200 mkl tvinlə fosfat buferi tökməklə oyuqları 3 dəfə yuyurlar.
5. Blokləşdirici məhluldan (tvinlə FBM-də 1%-li ÖZA) 14,5 ml hazırlayırlar və planşetin hər bir oyuğuna 150 mkl daxil edirlər. 37°C şəraitində 1 saat ərzində termostatda inkubasiya edirlər. İnkubasiyadan sonra yuyulma proseduru təkrarlayırlar (bax bənd 4).
6. İnkubasiya aparılan vaxt ərzində tədqiq olunan zərdabı tvinlə FBM-də ikiqat ardıcıl durulaşdırılırlar. Səkkiz sınaq şüşəsi götürürlər. Birinci sınaq şüşəsinə tədqiq olunan zərdabın 1:100 nisbətində durulaşdırılmış məhlulun 2 ml-ni daxil edirlər, qalan 7 sınaq şüşəsinin hər birinə isə, 0,8 ml tvinlə FBM əlavə olunur. Sonra birinci sınaq şüşəsindən ikinciyə 0,8 ml zərdab keçirirlər və yaxşıca qarışdırırlar. İkinci sınaq şüşəsindən 0,8 ml zərdabdan götürüb üçüncüyə keçirilər və s. Nəticədə səkkizinci sınaq şüşəsində tədqiq olunan zərdabın 1:12800 nisbətində durulaşdırılması alınır. Dovşanın tvinlə FBM-də 100 dəfə durulaşdırılmış normal zərdabından 0,6 ml götürüb və ardıcıl olaraq 1:800 nisbətə qədər ikiqat durulaşdırma aparırıq.
7. Planşetin oyuqlarının hər birinə aşağıdakı sxem üzrə tədqiq olunan zərdabdan 100 mkl daxil edilir (bax şək.): birinci sınaq şüşəsindən zərdabı (1:100) 5-ci sütunun (5A-5H) oyuqlarına və 1-ci sütunun 4 oyuğuna (1E, 1F, 1G, 1H) daxil edirlər; ikinci sınaq şüşəsindən zərdabı (1:200) 6-cı sütunun oyuqlarına daxil edirlər; üçüncü sınaq şüşəsindən – 7-ci sütunun oyuqlarına və s. 100 dəfə durulaşdırılmış normal zərdabı 1A, 4A və 4B oyuqlarına daxil edirlər; 200 dəfə durulaşdırılmış normal zərdabı 1B, 4C və 4D oyuqlarına; 800 dəfə durulaşdırılmış zərdabı 1D, 4G və 4H oyuqlarına daxil edirlər. Planşetin 2-ci və 3-cü sütunlarının oyuqlarının hər birinə 100 mkl yuyucu buferdən (FBM-tvin) daxil edirlər (şək. 22). 1 saat ərzində 37°C-də inkubasiya edirlər. Birləşməmiş komponentlər yuyulma ilə kənarlaşdırılırlar (bənd 4).



Şəkil 21. Məhlullarla sensibilizasiya məqsədilə planşetin oyuqlarının doldurulması.

- | | | | | |
|---|---|------|---|---------------------|
| ● | 1 | №-li | ⊘ | 5 №-li nümunələrdən |
| ⊕ | nümunələrdən | | ⊙ | 6 №-li nümunələrdən |
| ⊖ | 2 | №-li | ⊗ | 7 №-li nümunələrdən |
| ⊗ | nümunələrdən | | ⊚ | 8 №-li nümunələrdən |
| | 3 | №-li | | |
| | nümunələrdən | | | |
| | 4 | №-li | | |
| | nümunələrdən | | | |
| ○ | tvinin FBM-də məhlulu (yuyulma üçün məhlul) | | | |

8. 2-ci sütundan (2A-2H) savayı qalan bütün oyuqların hər birinə tvn-FBM ilə durulaşdırılmış konyuqatın (dovşan immunoqlobulinlərinə qarşı qıtıgotu peroksidazası ilə nişanlanmış keçi anticisimcikləri) 100 mkl-ni daxil edirlər. 2A-2H oyuqlarının hər birinə 100 mkl yuyucu bufer əlavə edirlər. 1 saat ərzində 37°C-də inkubasiya etdikdən sonra planşetin oyuqlarını yuyurlar (bənd 4).
9. 8-kanallı avtomatik pipetkadan istifadə edərək planşetin bütün oyuqlarına 100 mkl substrat qarışığını daxil edirlər, planşetin üstünü folqa və ya qara kağızla örtürlər və otaq temperaturu şəraitində 20-30 dəqiqə ərzində inkubasiya edirlər.
10. Oyuqların hər birinə 50 mkl H₂SO₄ (2 mol/l) əlavə etməklə reaksiyanı dayandırırırlar.



Şəkil 22. Planşetin oyuqlarının zərdab məhlulları ilə doldurulması.

- | | | | |
|---|--------------|---|---------------------|
| ● | 1 №-li | ⊖ | 7 №-li nümunələrdən |
| ⊕ | nümunələrdən | ⊚ | 8 №-li nümunələrdən |
| ⊖ | 2 №-li | ⊗ | 1:100 qatıl. normal |
| ⊗ | nümunələrdən | ⊗ | zərdab |
| ⊘ | 3 №-li | ⊕ | 1:200 qatıl. normal |
| ⊙ | nümunələrdən | ⊗ | zərdab |
| | 4 №-li | | 1:400 qatıl. normal |
| | nümunələrdən | | zərdab |
| | 5 №-li | | 1:800 qatıl. normal |

nümunələrdən zərdab

6 №-li

nümunələrdən

tvinin FBM-də məhlulu

11. İFA-riderdə $\lambda = 492$ nm dalğa uzunluğunda optik sıxlığı ölçülər (optik sıxlığı ölçməzdən əvvəl oyuqlarda spektrofotometrin göstəricilərinə təsir edən və təcrübənin nəticələrini təhrif edə bilən hava qabarcıqlarının olub-olmamasını yoxlamaq lazımdır).

Nəticələrin qiymətləndirilməsi

Aparılmış analizin nəticələri əsasında zərdabın bir qatılığı üçün optik sıxlığın sensibilizə edən antigenin qatılığından asılılığı qrafiki, eləcə də antigenin sabit qatılığı şəraitində optik sıxlığın tədqiq olunan zərdabın qatılığından asılılığı qrafiki qurulmalıdır.

VII BÖLMƏYƏ AİD SUALLAR

1. İFA-nı xarakterizə edin.
2. İFA-nın birbaşa variantının aparılması sxemini təsvir edin.
3. İFA-nın vasitəli variantının aparılması sxemini təsvir edin.

VIII BÖLMƏ

İMMUNOQLOBULİNLƏR:

ONLARIN AYRILMASI VƏ ANALİZİ

Mürəkkəb antigen qarışıqlarının təmizlənməsi və analizi üçün universal reagent qismində yüksək spesifikliyə və affinliliyə malik olan anticisimciklərdən istifadə olunur. Anticisimciklərin istifadəsinə əsaslanan üsullar təkəcə immunologiyada yox, həmçinin hüceyrə biologiyasında, biokimyada, molekulyar biologiyada, embriologiya və müxtəlif tibbi-bioloji tədqiqatlarda geniş tətbiq olunurlar. Hal-hazırda biotexnoloji kompaniyalar bazarı minlərlə monoklonal anticisimciklərlə və poliklonal antizərdablarla təchiz edirlər. Buna baxmayaraq, konkret tədqiqatların əsas məsələlərindən biri fərqi, orijinal, poli- və monoklonal anticisimciklərin alınmasından və sonrakı istifadə məqsədilə onların təmizlənməsindən ibarətdir. Bu səbəbdən anticisimciklər preparatlarının ayrılması və təmizlik dərəcəsinin analizi üsulları artıq çoxdan immunoloji laboratoriyaların arsenalına daxildirlər və ən müxtəlif istiqamətli bioloji və tibbi laboratoriyalar üçün zəruridirlər.

Laboratoriya heyvanlarının immunizasiyası zamanı əmələ gələn anticisimciklərin mənbəyi qan zərdabı və ya antizərdabdır. Anticisimciklər zərdabın immunoqlobulin fraksiyasının tərkibinə daxil olduqlarına görə, onun təmizlənməmiş preparatlarından antigenlərlə aparılan müxtəlif reaksiyalarda istifadə etmək olar.

Müxtəlif sinflərin immunoqlobulinləri (İg) bir-birindən və di-gər zərdab hüceyrələrindən su-duz məhlullarında və üzvi həlledicilərdə həll olmalarına, molekulların ölçülərinə, ümumi yükünə və izoelektrik nöqtələrinə görə fərqlənirlər. İmmunoqlobulinlərin fiziki-kimyəvi xassələrində mövcud olan bu cür fərqlər onların təmizlənməsi və preparativ ayrılması məqsədilə istifadə oluna bilər. Bundan başqa, immunoqlobulinlərin müxtəlif sinfləri müəyyən zülallarla, məs. İgG-stafillokokk A zülalı ilə q/kovalent və dönən birləşə bilirlər. Onların bu xassəsi təmizlənmə üçün istifadə oluna bilər.

İŞ 92

İMMUNİZƏ OLUNMUŞ DOVŞANIN QAN ZƏRDABINDAN

QLOBULİN FRAKSİYASININ AYRILMASI.

QAN ZƏRDABI ZÜLALLARININ DUZLAŞDIRMA

İLƏ FRAKSİYALARA AYRILMASI

Duzlaşdırma ilə fraksiyalaşdırılma bir sıra üstünlüklərə malikdir. Alınan preparatların təmizlik dərəcəsi yüksək olmasa da, bu üsul sadə və əlverişlidir. Təmizlənmənin birinci mərhələsində bu üsulun istifadəsi məqsədəuyğundur. Sonradan daha mükəmməl üsullar tətbiq edilir. Qan zərdabı zülallarının qlobulin və albuminlərə ayrılması yüksəkqatılıqlı duz məhlullarında onların müxtəlif dərəcədə həll olma qabiliyyətinə əsaslanır. Digər zərdab zülallarından fərqli olaraq, immunoqlobulinlər duzların daha aşağı qatılıqları şəraitində həll olma qabiliyyətini itirirlər.

Məhlulda duzların qatılığının artırılması suyun hidratlaşmış formada birləşməsinə, nəticədə hidrofob qarşılıqlı təsirlərin güclənməsinə və zülal molekullarının aqreqasiyasına səbəb olur. Zülal molekullarının aqreqasiyası həll olmayan çöküntünün (presipitatın) əmələ gəlməsinə gətirib çıxarır. Duzun qatılığının artırılması nəticəsində əmələ gələn zülal çöküntüsünü məhluldan sentrifuqa vasitəsilə ayırmaq olar. Əksər hallarda həll olmaq qabiliyyətinin itirilməsi döənən xarakter daşıyır. Zülalların duzlaşdırma ilə ayrılması üsulu bu prinsipə əsaslanır. Bundan başqa, ayrı-ayrı zülalların həll olması onların yükündən asılıdır və pH-in izoelektrik nöqtəsinə yaxın olan qiymətlərində daha az olur. Yüksək qatılıqlı duz məhlullarında zülalların presipitasiyası denaturasiyaya əhəmiyyətli dərəcədə təsir etmir və zülalların bioloji fəallıqlarının saxlanılmasına mane olmur.

Zərdab zülallarının duzlaşdırma üsulu ilə ayrılması üçün adətən ammonium sulfatın doymuş məhlulundan istifadə olunur. Ammonium sulfatla çökdürülmə qan zərdabından qlobulin fraksiyasının alınması üçün geniş tətbiq olunur.

Qan zərdabının qlobulin fraksiyasının tərkibinə daxil olan immunoqlobulinlər artıq 35-40%-li doyma şəraitində həll olma qabiliyyətini itirirlər, lakin maksimal çıxış 50%-li doyma zamanı müşahidə olunur. Duzun qatılığının sonrakı artırılması çökdürülən immunoqlobulinlərin çıxışının gözə çarpan qədər artırılmasına səbəb olmur, lakin əmələ gələn çöküntünün tərkibində zərdab albumininin və digər zülalların olma ehtimalını artırır. Əgər immunoqlobulinlərin daha təmiz preparatının alınması tələb olunursa və ayrılma zamanı zülal itkiləri ilə barışmaq mümkündürsə, bu halda 40%-li qatılıqda əmələ gələn çöküntünü yığırlar.

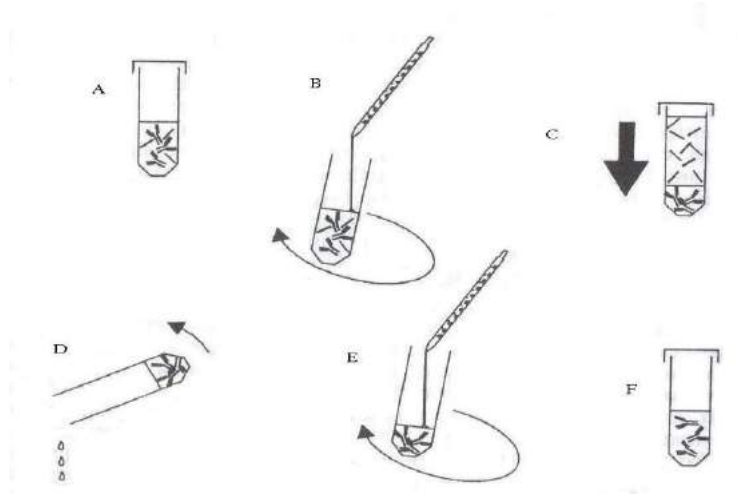
Reaktiv və ləvazimat:

- İmmunizə olunmuş dovşanın qan zərdabı
- Ammonium sulfatın doymuş məhlulu: (əlavələr, 4)
- Fosfat-duz bufer məhlulu – FDB: (əlavələr, 5)
- Barium xloridin ($BaCl_2$) 1%-li məhlulu
- Maqnit qarışdırıcı
- Buz
- 10000g sürətə qədər fırlanan sentrifuqa
- Qabaqcadan 0,02M EDTA- Na_2 məhlulunda qaynadılan dializ torbaları
- Ultrabənövşəyi diapazonda (dalğa uzunluğu – 280 nm) işləyən spektrofotometr
- Spektrofotometr üçün kvarts küvetlər

İşin gedişi

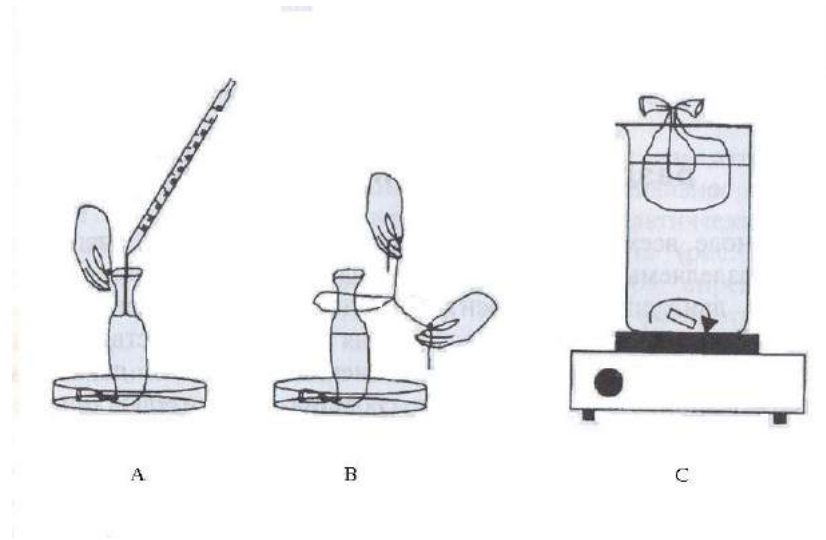
1. Soyuq ($4^{\circ}C$) qan zərdabına bərabər həcmdə soyuq FDB əlavə edirlər.
2. Durulaşdırılmış zərdaba damla-damla eyni həcmdə ammonium sulfatın doymuş məhlulunu əlavə edirlər. Nəticədə məhlulun qatılığını 50%-ə düşür. Bu proseduru buz üzərində daimi qarışdırmaqla aparırlar (şək.23, A, B).
3. 1 saatdan az olmamaq şərti ilə soyuqda qarışdırırlar və ya gecə ərzində $4^{\circ}C$ -də saxlayırlar.

4. 30 dəqiqədən az olmamaq şərti ilə 5000g (və ya artıq) sürətlə sentrifüqalaşdırırlar (şək. 23, C).
5. Supernatantı sınaq şüşəsinin kənarından axıdıb kənarlaşdırırlar (şək. 23, D), sınaq şüşəsinə çevirərək divarlar üzərində qalan damlları filtr kağızı ilə qurulayırlar.



Şəkil 23. Ammonium sulfatın presipitasiyası ilə qan zərdabından qlobulin fraksiyalarının ayrılması. A. İmmunizasiya olunmuş dovşanın qan zərdabı. B. Ammonium sulfatın doymuş məhlulunun bərabər həcmdə zərdaba əlavə edilməsi. C. Sentrifüqalaşdırılma. D. Sentrifüqalaşdırılmadan sonra supernatantın kənarlaşdırılması. E. Çöküntünün həll edilməsi. F. Dovşanın qan zərdabının immunoqlobulin fraksiyası.

6. Çöküntünü ammonium sulfatın yarıdoymuş məhlulunda yenidən həll edirlər (qabaqcadan ammonium sulfatın doymuş məhlulunu və FDB-i bərabər həcmdə qarışdırırlar).
7. 4-cü bəndi təkrarlayırlar.
8. 5-ci bəndi təkrarlayırlar.
9. Çöküntüyə FDB əlavə edirlər (zərdabın ilkin həcmnin 1/20 hissəsi) və qan zərdabının qlobulin fraksiyasını həll edirlər (şək. 23, E, F).
10. Sulfat ionlarının tamamilə mühitdən kənarlaşmasına qədər FDB-ə qarşı dializ aparırlar (şək. 24). Bunun üçün qabaqcadan EDTA-Na₂ məhlulunda islanmış və qaynadılmış dializ torbasından istifadə edirlər. Əvvəlcə torbanın bir ucunu bağlayaraq, ona immunoqlobulinlərin məhlulunu yerləşdirirlər (şək. 24, A, B). Torbanın uclarını bir neçə dəfə uzununa qatlayıb möhkəm sapla sıx bağlayırlar. Torbanın hermetikliyini yoxlayırlar: havada asılmış hermetik torbanın bağlı ucları quru olmalıdır. Sonra torbanı bufer məhlulunun (məs., FDB) 1000 dəfə artıq olan həcmində yerləşdirirlər və bu məhlula qarşı dializ aparırlar. Dializi bufer məhlulunu 3 dəfə dəyişərək soyuqda (4°C) maqnit qarışdırıcı üzərində daimi qarışdıraraq ən azı 3 gün ərzində aparırlar (şək. 24, C).



Şəkil 24. Zülal məhlulunun dializi. A. Dializ torbasının zülal məhlulu ilə doldurulması. B. Dializ torbasının ucunun hermetik bağlanması. C. Zülal məhlulu ilə doldurulmuş hermetik bağlanmış dializ torbasının daimi qarışdırılan bufer məhluluna yerləşdirilməsi.

11. Dializin təmizliyini yoxlayırlar. Bunun üçün barium sulfat çöküntüsünün əmələ gəlməsi ilə nəticələn 1%-li barium xloridlə keyfiyyət reaksiyasını aparırlar. Təmiz şüşə üzərində 1%-li $BaCl_2$ damlasını zülal məhlulunun bir damlası ilə qarışdırırlar. Südlü-ağ çöküntünün əmələ gəldiyi halda dializi davam etdirirlər.
12. Həll olunmamış materialı sentrifuqa vasitəsilə kənarlaşdırırlar (4-cü bəndi təkrarlayırlar).
13. Supernatantı yığırlar və spektrofotometrik üsulla 280 nm dalğa uzunluğunda udma qabiliyyətinə əsasən zülalın qatılığını təyin edirlər. Zülalın qatılığını qlobulin fraksiyasında təyin edərək aşağıdakı nisbəti qəbul edirlər: İgG-nin qatılığı 1mq/ml olan məhlul üçün 1,4 optik vahidin udulması uyğundur.

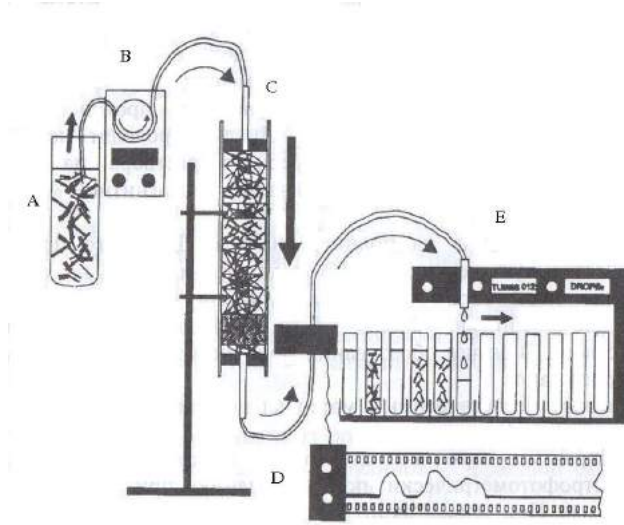
İMMUNOQLOBULİNLƏRİN XROMATOQRAFİK

ÜSULLA AYRILMASI

Bütün xromatoqrafik üsulların əsasında hərəkətsiz fazaya (daşıyıcıya) nisbətən ayrılan maddələrin hərəkətli fazada (həll edicidə) paylanması durur. Maddələr həlledicinin sərhəddi ilə irəliləyərək daşıyıcıya qarşı uyğunluqlarına müvafiq olaraq onunla qarşılıqlı təsire girib hərəkət sürətini dəyişdirirlər. Xromatoqrafik fraksiyalaşdırma molekulların ölçüləri, adsorbsiya xassələri, onların hidrofobluq dərəcəsi, elektrik yükü və digər molekullara bioloji uyğunluğu kimi fiziki-kimyəvi xassələrinə əsaslanma bilər.

Xromatoqrafiya zamanı fraksiyalara ayrılacaq zülal məhlulu silindrik sütunda məsaməli sorbent qatında həlledicinin axını ilə və zülalların sorbentə uyğunluğundan asılı olaraq müxtəlif sürətlə hərəkət edirlər. Bu proses **elyusiya**, həlledici – **elyuent**, alınmış məhsul isə **elyuat** adlanır.

Elyusiya prosesinin uzunmüddətli olması ilə əlaqədar avtomatikleşdirmə məqsədilə xüsusi avadanlıqdan istifadə etmək məqsədəuyğundur (şək.25). Adətən elyuentin bərabər verilməsinin



Şəkil 25. Zülalların ayrılması məqsədilə aparılan maye-sütun xromatoqrafiyasının standart avadanlığı. A. Ayrılmalı zülalların məhlulu. B. Peristaltik nasos. C. Xromatoqrafik sütun. D. Ultrabənövşeyi detektor. E. Fraksiyalar kollektoru.

təmin edilməsi üçün peristaltik nasosdan (şək. 25, B), elyuatın müəyyən həcmliyinin yığılması məqsədilə fraksiyaların avtomatik kollektorundan (şək. 25, D) və 280 nm diapazonunda (aromatik qruplara malik olan amin turşularının udma sahəsi) fotometrik detektordan (şək. 25, E) istifadə olunur. Ayrılan zülallar udma qabiliyyətinə görə müəyyən olunurlar və xromatoqrama diskret və ya bitişik piklər şəklində olur (şək. 25, E).

İŞ 93

İONMÜBADİLƏ XROMATOQRAFIYA ÜSULU VASİTƏSİLƏ İMMUNİZƏ OLUNMUŞ DOVŞANIN QAN ZƏRDABININ QLOBULİN FRAKSİYASINDAN İgG-FRAKSİYASININ ALINMASI

Laboratoriya heyvanlarının təkrar immunizasiyası nəticəsində baş verən ikincili immu cavab zamanı əmələ gələn anticisimciklər əsasən İgG sinfinə (izotipə) aiddirlər. Adətən tərkibində digər sinfilərin, məs. İgM, qarışığı olmayan İgG-nin təmiz preparatlarının alınması zəruridir. Zülal məhlulunun pH-ı neytral qiymətə yaxın olduğu halda immunoqlobulinlərin izotipləri bir-birindən molekulun yükünə görə fərqlənilir; bu xassə onların ayrılması məqsədilə istifadə olunur.

İonmübadilə xromatoqrafiya üsulu əks yük daşıyan məsaməli sorbent (ionmübadiləedici) üzərində müəyyən yükə malik olan molekulların seçici elektrostatik adsorbsiyasına əsaslanır. Zülalların ionmübadiləedici ilə qarşılıqlı təsirinin gücü məhlulun pH-dan asılı olan bioloji makromolekulun ümumi yükünün qiyməti ilə müəyyənleşir.

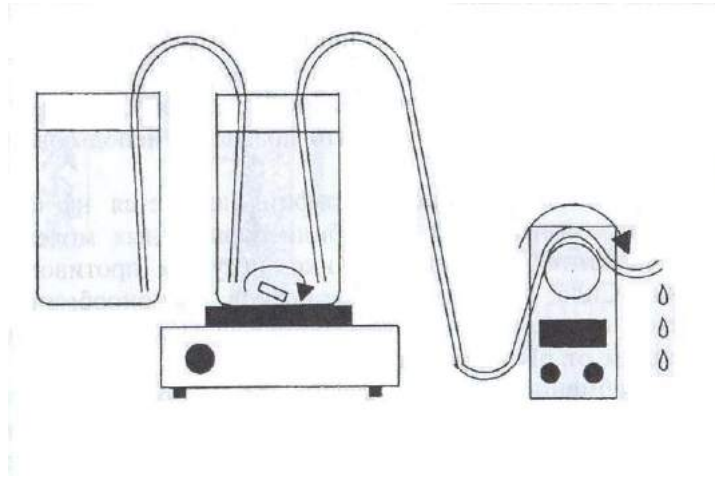
İonmübadilə xromatoqrafiya zamanı maddələr qarışığının komponentlərinin fraksiyalaşdırılmasının səbəbi onların ümumi yükünün fərqlənməsidir. Elyusiyanın

müəyyən şəraitində qarışığın bu və ya digər komponentinin ümumi yükü (ionmübadiləedicinin yükünə əks olan) nə qədər çox olsa, bir o qədər, o, sütun boyu yavaş hərəkət edəcək.

İonmübadilə xromatoqrafiyasında istifadə olunan sorbentləri yüklənmiş ionogen qrupların xarakterinə görə iki əsas qrupa bölmək olar. Kationmübadiləedicilərdə ionmübadiləedici qruplar mənfi yükləniblər və məhlulun müsbət yüklü kationlarını birləşdirirlər. Anionmübadiləedicilərdə ionogen qruplar müsbət yük daşıyırlar və hərəkətli fazadan mənfi yüklü anionları birləşdirirlər. İonmübadiləedici ilə birləşmiş zülalların elyusiyasını əsasən iki üsulla aparmaq olar:

1. həlledicinin ion qüvvəsinin artırılması: məhlulda yüklənmiş ionların qatılığının artması ilə onlar ionmübadiləedicinin yüklənmiş qrupları ilə birləşmə uğrunda rəqabət aparırlar;
2. həlledicinin pH-nın dəyişdirilməsi: həlledicinin pH-nı zülalın izoelektrik nöqtəsinin qiymətinə qədər dəyişməsi zamanı onun ümumi yükü sıfıra yaxınlaşır və ionmübadiləedici ilə elektrostatik əlaqə zəifləyir.

İonmübadilə xromatoqrafiyasını həm sütunlarda, həm də birləşməmiş komponentləri sorbentdən süzməklə ayıraraq aparmaq olar. Sütunda aparılan ayrılma zamanı həlledicinin pH-nın və ya ion qüvvəsinin qradientinin tədricən və ya pilləli dəyişməsi ilə gedən elyusiyanı tətbiq etmək mümkündür. Ayrılmanın bu variantı üçün standart xromatoqrafik avadanlıqdan istifadə olunur (şək. 25).



Şəkil 26. Birləşmiş qabların vasitəsilə xətti elyusiya qradientinin yaradılması. A. «Bağlayıcı» bufer məhlulu ilə qab. B. Maqnit qarışdırıcı üzərində «başlanğıc» bufer məhlulu ilə qab. C. Peristaltik nasos.

NaCl-un qatılığının 0 mM-dan 500 mM-ə qədər artırılması şəraitində pH 8,0 olan 10 mM tris-HCl bufer sistemində İgG digər zərdab zülallarından fərqli olaraq sütundan daha tez elyusiya olunacaq və DEAE-sefaroza anionmübadiləedicisi ilə birləşmiş qan zərdabının digər komponentlərindən ayrılacaq.

Elyuentin xətti qradientini iki birləşmiş qablar sistemindən ibarət standart qarışdırıcılar vasitəsilə yaradırlar. Başlanğıc bufer olan birinci qaba (şək. 26, B) ikinci qabdan bağlayıcı bufer (şək. 26, A) daxil olur və onların daimi qarışdırılması baş verir.

Nəticədə bufer məhlullarının sütundan kənarlaşması ilə onların bir-biri ilə bərabər qarışığı əmələ gəlir və sütundan çıxış yerində xətti artan qatılıq qradienti yaranır.

Reaktiv və ləvazimat:

- 10 mM tris-HCl bufer məhlulu, pH 8,0 (B1): (əlavələr, 6)
- Tərkibində 500 mM NaCl olan 10 mM tris-HCl bufer məhlulu, pH 8,0 (B2): (əlavələr, 6)
- İmmunizə olunmuş dovşanın qan zərdabının B1-ə qarşı dializ edilmiş qlobulin fraksiyası
- 1,0 M HCl
- Dietilaminoetil sefaroza (DEAE-Sepharose), Pharmacia istehsalı, İsveç
- Fraksiyalar kollektoru (şək. 25, E)
- Peristaltik nasos (şək. 25, B)
- Qradient qarışdırıcısı (şək. 26)
- Axarlı ultrabənövşəyi detektor (şək. 25, D)
- Xromatoqrafik sütun (uzunluq/diametr nisbəti 5/1-dən 10/1-ə qədər) (şək. 25, B)
- Ultrabənövşəyi diapazonda işləyən spektrofotometr (dalğa uzunluğu – 280 nm)
- Spektrofotometr üçün kvarts küvetlər

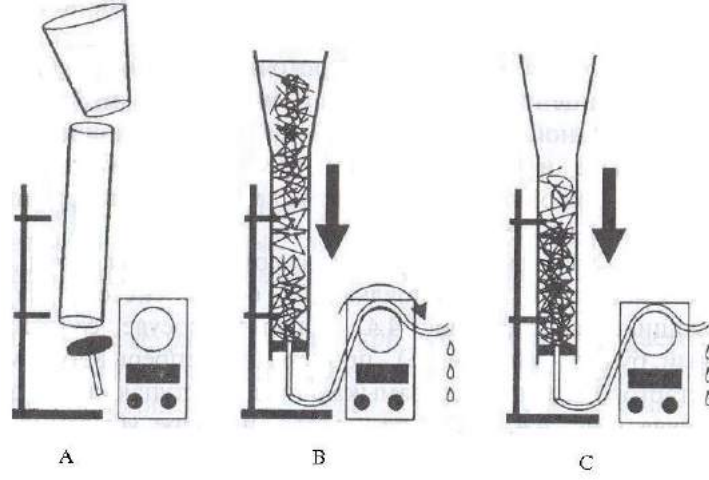
İşin gedişi

1. İmmunizə olunmuş dovşanın qan zərdabının qlobulin fraksiyasını (bax iş 92) B1 məhluluna qarşı (həcmi 1:1000 nisbətində) dializ edirlər.
2. İonmübadiləedici ilə doldurulmuş sütunun hazırlanması: 100 mq zülalə 10 ml gel:
 1. ionmübadiləedicini B1 buferində qarışdırırlar;
 2. gel hissəciklərinin çökməsindən sonra dibə yatmış gel qranullarından maye hissəni ehtiyatla ayırırlar;
 3. 1-ci və 2-ci bəndləri iki dəfə təkrarlayırlar;
 4. geli B1-lə qarışdırıb (100 ml gelə 500 ml B1) suspenziyanı 1,0 M HCl-la pH 8,0-ə qədər titrləyirlər;
 5. 1-ci və 2-ci bəndləri təkrarlayırlar;
 6. suspenziyanın pH-nın dəqiq 8,0 olmasında əmin olmalı; ehtiyac duyulduqda 4-cü bənddən başlayaraq təkrarlayırlar;
 7. geli B1-in bərabər həcmi ilə qarışdırırlar və alınmış 50%-li gel suspenziyasını vakuum kolbaya yerləşdirirlər; bağlı kolbanı yan ötürücü vasitəsilə vakuum nasosa birləşdirərək 1 dəqiqə ərzində qazsızlaşdırırlar;
 8. vakuumu ehtiyatla ayırırlar və məhz bundan sonra nasosu söndürürlər (**DİQQƏT! Bu əməliyyatların ardıcılığını pozmaq olmaz!**);
 9. sütunu ştativdə dəqiq şaquli vəziyyətə bərkidirlər (kontrol üçün şaquldan – sapdan asılmış çəkiddən istifadə edirlər) (şək. 27, A); sütunun hündürlüyünün diametrinə nisbəti 5/1-dən 10/1-ə qədər olmalıdır;

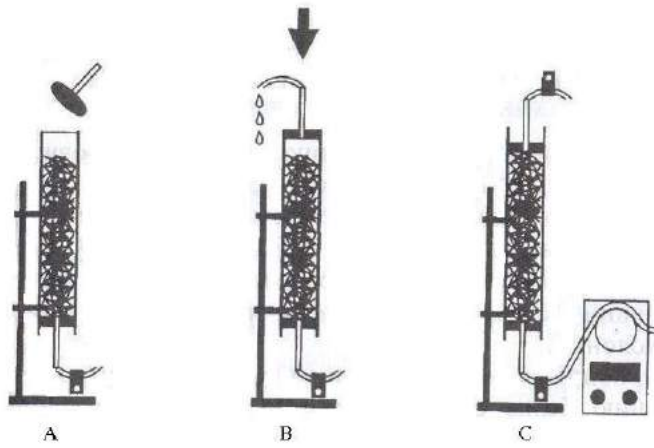
10. sütünun alt adaptorunu hermetik olaraq qururlar və xromatoqrafik boru ilə birləşmiş şpris vasitəsilə aşağıdan yuxarıya doğru B1 bufer məhlulunu təzyiqlə vuraraq adaptoru doldururlar (hava qovuqcuqları qalmamalıdır); sütunu sıxac vasitəsilə aşağıdan bağlayırlar;
11. sütünun yuxarı ucunda qıf yerləşdirirlər və 1-2 ml saxlamaqla B1 bufer məhlulunun artığını sütundan kənarlaşdırırlar; sütunu aşağıdan sıxacla bağlayırlar;
12. sütunu qazsızlaşdırılmış 50%-li gel suspenziyası ilə doldururlar (sütünun 2 həcmindən az olmamaq şərti ilə);
13. alt adaptora peristaltik nasos birləşdirirlər və onu boşaldılmaya qoşurlar (şək. 27, B); sütünun doldurulma sürəti onun kəsiyinin 1 sm^2 sahəsinə 20 ml-dən çox olmamalıdır;

Qeyd: Sütünun kəsiyinin sahəsi = πr^2 . Sütünun həcmi sahənin hündürlüyə hasilinə bərabərdir. Boşalma sürəti (ml/saat) nasosla birləşmiş pipetkanın dolmasına görə saniyəölçənlə təyin olunur.

14. gelin sıx yuxarı sərhədi formalaşdıqdan sonra (şək. 28, A), nasosu dayandırirlər, sütunu aşağıdan bağlayırlar və sütünun daxilinə hava qovuqcuqlarının daxil olmasına yol verməyərək üst adaptoru hermetik yığırlar (şək. 28, B, C); sıxac vasitəsilə üst adaptoru bağlayırlar (şək. 28, B, C);
 15. sütuna hava qovuqcuqlarının daxil olmasına yol verməyərək cihazları 25-ci şəkildə göstərilən qaydada birləşdirməklə sistemi yığırlar; bütün cihazları qoşurlar və qızmağa imkan verirlər.
3. İmmunizə olunmuş dovşanın qan zərdabının dializə məruz qalmış fraksiyasını kolonkaya əlavə edirlər.
 4. Hər iki rezervuara B1 və B2 bufer məhlullarını bərabər həcmdə əlavə edərək sütunu qradiyent qarışdırıcısı ilə birləşdirirlər (bax şək. 26). Bu zaman başlanğıc rezervuarda B1; bağlayıcı rezervuarda B2 olmalıdır. B1 və B2 bufer məhlullarının ümumi həcmi sütünun ümumi həcmindən 10-20 dəfə artıq olmalıdır.
 5. Ultrabənövşəyi detektor vasitəsilə 280 nm dalğa uzunluğunda zülalın qatılığını nəzarətdə saxlayaraq NaCl-un xətti qradiyenti ilə elyusiya aparırlar. Elyusiyanın sürəti 1 saat ərzində sütünun kəsiyinin 20 ml/sm^2 sahəsindən artıq olmamalıdır. Yığılan fraksiyaların həcmi sütün həcmindən $1/20$ hissəsindən artıq olmamalıdır.
 6. Yığılmış fraksiyalarda zülalın qatılığını spektrofotometrik üsulla 280 nm dalğa uzunluğunda udulmaya əsasən təyin edirlər. Qlobulin fraksiyasında zülalın qatılığının təyini zamanı aşağıdakı nisbət qəbul edilir: İgG-nin qatılığı 1 mq/ml olan məhlula $1,4$ optik vahidin udulması uyğundur. Bundan sonra fraksiyalarda zülalın miqdarının histogrammasını tərtib edirlər.
 7. Fraksiyalarda ikiqat radial immunodiffuziya üsulu ilə İgG-nin mövcudluğunu təyin edirlər və İgG-nin miqdarı daha çox olan fraksiyaları birləşdirirlər. NaCl qradiyenti ilə elyusiya zamanı İgG sütundan birinci çıxan fraksiyalarda mövcud olmalıdır.



Şəkil 27. Zülalları ayırmaq üçün aparılan maye xromatografiyası sütununun doldurulması (I). A. Xromatografik sütunun ştativdə sıxaqlarla bərkidilməsi. B. Xromatografiya üçün məsaməli daşıyıcı suspenziyası ilə sütunun doldurulması. C. Sütunun doldurulmasının başa çatması və daşıyıcının üst sərhədinin formalaşdırılması.



Şəkil 28. Zülalları ayırmaq üçün aparılan maye xromatografiyası sütununun doldurulması (II). A. Daşıyıcının üst sərhədinin formalaşdırılma prosesinin başa çatması. B. Doldurulmuş xromatografik sütuna üst adapterin quraşdırılması. C. İşə hazır olan sütun.

İŞ 94

ZÜLAL-A-SEFARAZADA APARILAN AFFİN XROMATOQRAFİYA ÜSULU İLƏ SIÇANDAN İgG-NİN AYRILMASI

Staphylococcus aureus-un bəzi ştammlarından ayrılmış A stafilokokk zülalı yüksək effektivliklə insanın və bəzi heyvanların İgG-ləri ilə dönən olaraq birləşmək qabiliyyətinə malikdir. Bu zaman A zülalı immunoqlobulin molekulunun Fc-fraqmenti ilə qarşılıqlı əlaqəyə girdiyi üçün immunoqlobulin molekulalarının antigenbirləşdirən mərkəzləri sərbəst qalırlar. Birləşmənin effektivliyi İgG-nin müxtəlif izotipləri üçün fərqlidir. Aqaroza əsasında iriməsəmali matrisa ilə kovalent birləşmiş A zülalı (Protein-A-Sepharose, Pharmacia, İsveç) İgG-nin ayrılması üçün əlverişli affın sorbent kimi geniş istifadə edilir. Preparatı istehsal edən firma qeyd edir ki, nəm gələn 1 ml-i 10 mq-dan çox İgG birləşdirmək qabiliyyətinə malikdir.

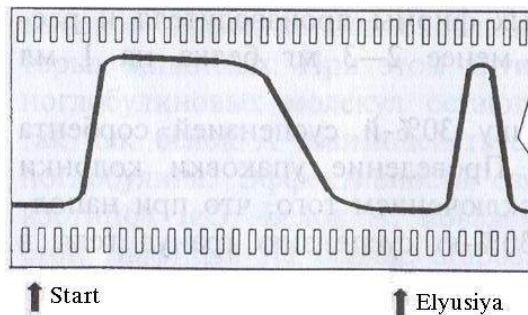
Reaktiv və ləvazimat:

- Fosfat-duz buferi – FDB: (əlavələr, 5)
- 100 mM natrium-fosfat buferi, pH 8,0 (FB): (əlavələr, 7)
- 100 mM sitrat buferi məhlulu, pH 3,5 (SB): (əlavələr, 8)
- 1 M tris-HCl bufer məhlulu, pH 9,0 (1 M tris): (əlavələr, 6)
- 100 mM natrium-fosfat bufer məhluluna (pH 8,0) qarşı dializ olunmuş siçan immunoqlobulinləri. İmmunoqlobulinlərin mənbəyi kimi siçan qanının zərdabı, qan zərdabının ayrı-ayrı fraksiyaları, kultural mühit və ya siçanın monoklonal anticisimciklərinə malik olan assit mayesi istifadə oluna bilər
- Zülal-A-sefaroza (Protein-A-Sepharose, Pharmacia, İsveç) sorbenti
- Həcmi 5 ml-ə qədər olan xromatoqrafik sütun
- Fraksiyalar kollektoru (bax şəx. 25, E)
- Peristaltik nasos (bax şəx. 25, B)
- Ultrabənövşəyi diapazonlu avtomatik detektor
- Ultrabənövşəyi diapazonda işləyən spektrofotometr (dalğanın uzunluğu – 280 nm)
- Spektrofotometr üçün kvarts küvetlər

İşin gedişi

1. Quru sorbentin müəyyən miqdarını 2 saat ərzində FDB-də isladırırlar (1,5 q qurudulmuş qranullardan 5 ml gel əmələ gəlir). Sorbentin və sütunun lazım olan həcmnin təyini zamanı istehsalçı firmanın məlumatlarına əsaslanmaq olar və 1 ml nəm gələ ən azı 2-3 mq zülalın alınması nəzərdə tutulmalıdır.
2. Sorbentin FDB-də 30%-li suspenziyası ilə sütunu doldururlar. Doldurma proseduru iş 92-də təsvir olunur. Zülal-A-sefaroza geli üçün sütunun doldurulma sürəti, zülalı əlavə etmə və elyusiya zamanı bufer axınının sürəti 1 saat ərzində sütun kəsiyinin 1 sm² sahəsinə 5 ml-dən artıq olmamalıdır.
3. Doldurulmadan sonra sütunu onun üç həcmi qədər FDB ilə yuyub tarazlaşdırırlar.

4. Sütunun ən azı üç həcmi miqdarında FB ilə geli yuyurlar (siçanlardan İgG1 izotipinin monoklonal anticisimciklərinin ayrılmasını da bu qaydada aparırlar, lakin FDB-ni aşağıdakı bufer məhlulu ilə əvəz edirlər: 1,5 M qlisin; 3 M NaCl; pH 9,0).
5. Sütunu üç həcm SB ilə (pH 4,5) yuyurlar.
6. 3-cü bəndi təkrarlayırlar.
7. İmmunoqlobulinləri sütuna əlavə edirlər.
8. A zülalı ilə birləşmiş nümunənin sütunun ümumi həcmindən ən azı 5 dəfə çox olan FB ilə yuyulmasını davam etdirirlər. Elyuatda zülalın qatılığını təyin etməklə sütunun yuyulma təmizliyini yoxlayırlar. Elyuatda A zülalı ilə birləşməmiş nümunə mövcud olmamalıdır.
9. Sorbentlə birləşmiş İgG sütunun ümumi həcmindən 3 dəfə çox olan SB ilə (pH 3,5) elyusiya olunur. Fraksiyalar 1 ml həcmində yığılır.
10. 9-cu mərhələdə turş şəraitdə zülalın denaturasiyasının qarşısını almaq məqsədilə fraksiyalar içərisində 1 M tris olan (fraksiya həcmiminin 1/10 hissəsini 1 M tris təşkil etməlidir) sınaq şüşələrinə yığılır.
11. 3-cü bəndi təkrarlayırlar.
12. Yığılmış fraksiyalarda zülalın qatılığını spektrofotometrik üsulla 280 nm dalğa uzunluğunda udulma qabiliyyətinə əsasən təyin edirlər. Qlobulin fraksiyasında zülalın qatılığını təyin edərkən aşağıdakı nisbəti qəbul edirlər: İgG-nin qatılığı 1 mq/ml olan məhlulə 1,4 optik vahidin udulması uyğundur. Zülal-A-sefaroza aparılan affin xromatoqrafiya üsulu vasitəsilə siçandan İgG-nin ayrılmasının tipik xromatoqramması şəkl. 29-da göstərilib. Birinci pik qan zərdabının affin sorbentlə birləşməmiş zülallarına, ikinci isə – İgG-ə uyğundur; oxla işarələnmiş nöqtə turş SB ilə aparılan elyusiyanın başlanğıcına uyğundur.
13. Ouxterloniyə əsasən ikiqat radial immunodiffuziya üsulu vasitəsilə fraksiyalarda İgG-nin mövcudluğunu təyin edirlər və tərkibində ən çox İgG olan fraksiyaları birləşdirirlər.
14. İgG preparatının təmizliyini siçan İgG-lərinə qarşı anticisim-ciklərlə immunoblotinq və Ds-Na-PAAG elektroforez vasitəsilə yoxlayırlar.



Şəkil 29. Affin sorbent olan zülal A-sefaroza ilə doldurulmuş sütundan siçanın İgG-nin elyusiya profilini. Oxlarla aşağıdakılar işarə olunub: (start) – ayrılmalı

nümunənin sütuna daxil edilməsi; (elyusiya) – turş elyusiyaedici bufer məhlulunun daxil edilməsi.

İŞ 95

İMMUNOQLOBULİNLƏRİN PROTEOLİTİK PARÇALANMASI

Proteolitik ferment (proteaza) olan papain İgG molekulunun ağır zəncirini (H) şarnir sahədə parçalayır və nəticədə iki Fab- və bir Fc-fraqmentləri əmələ gəlir. Anticisimciklərin Fab-fraqmentləri antigenlə birləşmək qabiliyyətini itirmirlər, lakin anticisimciklərin İgG izotipindən fərqli olaraq monovalentdir. Bundan başqa, Fab-fraqmentləri komplementlə birləşmək qabiliyyətini və immunokompetent hüceyrələrin müxtəlif subpopulyasiyalarının plazmatik membranında təmsil olunmuş anticisimciklərin Fc-fraqmentlərinin reseptorları (FcR) ilə qarşılıqlı təsir qabiliyyətini itirirlər. Bəzi hallarda Fab-fraqmentlərinin istifadəsi bütöv İgG molekuluna nisbətən daha əlverişlidir. Papain tiol proteazalara aiddir və fəal mərkəzində sisteynin SH-qrupuna malikdir. Papaini fermentativ fəal vəziyyətə çatdırmaq üçün onu reduksiyaedici agentlərlə (məs., 2-merkaptotanol və ya ditiotreitol) işləmək lazımdır. Papain ağır metal kationlarının təsiri altında fəallığını itirir, bu səbəbdən onun fəallaşdırılmasını ikivalentli kationları birləşdirmək qabiliyyətinə malik olan EDTA-nın iştirakı ilə aparırlar. İgG-nin papainlə parçalanması reaksiyası fermentin tiol qruplarının yodasetamidlə alkülləşməsi nəticəsində dönməz olaraq dayandırılı bilər.

Proteolitik yolla alınmış Fab-fraqmentləri öz xassələrinə görə həm nativ anticisimciklərdən, həm də Fc-fraqmentlərdən fərqlənirlər və zülal-A-sefaroza aparılan affın xromatoqrafiya üsulu vasitəsilə ayrılırlar. Bu zaman parçalanmamış İgG və Fc-fraqmentləri A zülalı ilə birləşəcəklər, Fab-fraqmentləri isə sütundan sərbəst keçə biləcəklər.

Reaktiv və ləvazimat:

- İmmunizə olunmuş dovşanın qan zərdabından ayrılmış İgG (bax iş 93)
- Papain
- Ditiotreitol (ionsuzlaşdırılmış suda hazırlanan 1 M məhlul)
- Yodasetamid (ionsuzlaşdırılmış suda hazırlanan 1 M məhlul)
- EDTA-Na₂
- 100 mM tris-HCl, pH 8,0
- Fosfat-duz buferi – FDB: (əlavələr, 5)
- Fraksiyalar kollektoru
- Peristaltik nasos
- Ultrabənövşəyi diapazonlu avtomatik detektor
- Zülal-A-sefaroza ilə doldurulmuş xromatoqrafik sütun (iş 94)
- Zülal-A-sefaroza (Proten-A-Sepharose, Pharmacia, İsveç)
- 100 mM natrium-fosfat buferi, pH 8,0 (FB): (əlavələr, 7)
- 100 mM sitrat bufer məhlulu, pH 3,5 (SB): (əlavələr, 8)
- 1 M tris-HCl bufer məhlulu, pH 9,0 (1 M tris): (əlavələr, 6)
- Ultrabənövşəyi diapazonda işləyən (dalğanın uzunluğu 280 nm) spektrofotometr
- Spektroftometr üçün kvarts küvetlər
- Sentrifuqa

İşin gedişi

1. Sütünü zülal-A-sefaroza danələri ilə doldururlar (doldurulma qaydaları iş 94-də təsvir olunub). Doldurulmadan sonra sütünü onun üç həcmi qədər FDB ilə yuyub tarazlaşdırırlar.
2. İgG-ni 100 mM tris-HCl (pH 8,0) məhlulu ilə dializ edirlər və zülalın qatılığını 10-20 mq/ml-ə çatdırırlar. Bunun üçün zülal məhlulunu ya qatılaşıdırır, ya da tri-HCl (pH 8,0) məhlulu vasitəsilə lazımi qatılığa qədər durulaşıdırırlar. Qatılaşıdırmağa ehtiyac duyulduqda İgG dializ torbasına yerləşdirirlər, ağzını sıx bağlayırlar və molekul çəkisi 20 kDa olan quru polietilenqlikol qatı üzərində bir neçə saat ərzində saxlayırlar.
3. İgG-ə EDTA-Na₂ əlavə edərək qatılığını 1 mM-a çatdırırlar.
4. Bilavasitə istifadədən əvvəl papaini 100 mM tris-HCl (pH 8,0) məhlulunda oraya 2 mM EDTA-Na₂ və 1 mM ditiotritol əlavə etməklə həll edərək onu fəallaşıdırırlar.
5. İgG-ə fəallaşdırılmış papaini əlavə edirlər (hər 100 mq İgG üçün 1 mq papain).
6. Kristallaşmış materialı (Fc-fraqmenti) sentrifuqa vasitəsilə (5000g, 30 dəqiqə) kənarlaşdırırlar.
7. Yodasetamidi əlavə etməklə 20 mM qatılığa çatdırırlar.
8. Materialı FDB-ə qarşı dializ edirlər.
9. Gellə doldurulmuş və FDB ilə tarazlaşdırılmış sütuna papainin təsiri nəticəsində əmələ gələn parçalanma məhsullarını əlavə edirlər. Fc-fraqmentlərinin tam birləşməsinə təmin etmək məqsədilə elyusiyanın sürəti saatda 10 ml/sm²-dən artıq olmamalıdır.
10. Fraksiyaları həcmi 1 ml-dən artıq olmamaq şərti ilə yığırlar. Sütunda birləşmiş materialın hamısı yığılmalıdır.
11. Sonra iş 94-də göstəriləni kimi turş sitrat-fosfat buferi ilə (SB) elyusiya aparırlar. Bütün fraksiyaları yığırlar. Sütünü FDB ilə yuyurlar.
12. Bütün fraksiyalarda zülalın qatılığını spektrofotometrik üsulla 280 nm dalğa uzunluğunda təyin edirlər. Zülalın qatılığının fraksiyalara görə paylanması histoqramını qururlar. Xromatoqram iki pikdən ibarət ola bilər. Sütunda birləşməmiş birinci pik İgG-nin parçalanma məhsulu olan Fab-fraqmentini xarakterizə etməlidir. Turş buferlə elyusiya olunmuş ikinci pikin tərkibində Fc-fraqmenti və həmçinin parçalanmamış İgG olmalıdır.

İŞ 96

SİÇANIN İgG-NİN AĞIR VƏ YÜNGÜL

ZƏNCİRLƏRİNİN ALINMASI.

MOLEKULLARIN ÖLÇÜLƏRİNƏ GÖRƏ

FRAKSİYALAŞDIRILMA

İgG-nin ağır və yüngül zəncirləri zəncirlərarası disulfid rabitələri ilə kovalent olaraq bir-biri ilə birləşiblər. Bu rabitələr disulfid əlaqələri reduksiya edən reagentlər vasitəsilə parçalana bilər. Dissosiasiya olunmuş H- və L-zəncirlər bir-birindən və nativ anticisimciklərdən öz ölçülərinə görə fərqlənirlər və xromatoqrafiya vasitəsilə ayrıla bilərlər.

Molekul çəkilerindəki fərqlər əsasında molekulları fraksiyalaşdıran əsas üsullardan biri gel-keçici xromatoqrafiya və ya gel-filtrasiyadır. Hal-hazırda gel-filtrasiya daşıyıcı matrisa qismində dekstranın, akrilamidin və silikagelin, eləcə də bəzi sintetik polimerlərin törəmələri əsasında hazırlanan qranulalı məsaməli gellərdən istifadə olunur. Hər bir gel daşıyıcısı məsamələrin ölçülərinin müəyyən dəyişkənliyi ilə xarakterizə olunur, bu da fraksiyalaşdırılan molekulların ölçülərinin diapazonunu, yəni gələn tətbiq sahəsini xarakterizə edən qiyməti müəyyənləşdirir. Gel-filtrasiya üçün istifadə olunan daşıyıcının əsas xassələrinə mexaniki möhkəmlik və inertlik aiddir.

Üsulun prinsipi aşağıdakı kimidir. Həllədiçi axını ilə keçərək biopolimer molekulları gələn qranullarına diffuziya edirlər. Diffuziyanın sürəti molekulun ölçülərindən asılıdır. Kiçik ölçülü molekullar məsaməli gel tərəfindən saxlanılır və iri molekullara nisbətən daha yavaş hərəkət edirlər. Nisbətən iri molekullar gələ daxil olurlar və gel qranullarını əhatə edən həllədicinin axını ilə hərəkət edirlər. Ayrılma prosesinin sürəti yüksək olmamalıdır, çünki yaxşı ayrılma üçün gel qranullarının daxili və xarici həcmələri arasında diffuzion tarazlığın daimi sabit saxlanması zəruridir.

Adətən gel-filtrasiya hündürlüyü kəskin sahəsindən xeyli böyük olan xromatoqrafik sütunlarda aparılır. Sütunun hündürlüyünün artması ilə həm yaxın miqrasiya edən zonaların ayrılması, həm də ilkin məhlulun həllədiçi-elyuentlə durulaşdırılması artır.

Reaktiv və ləvazimat:

- Zülal-A-sefarozada xromatoqrafiya vasitəsilə ayrılmış siçan İgG (iş 94)
- 150 mM tris-HCl bufer məhlulu, pH 8,2: (əlavələr, 6)
- Ditiotreitol (ionsuzlaşdırılmış suda hazırlanmış 1 M məhlul)
- Yodasetamid (ionsuzlaşdırılmış suda hazırlanmış 1 M məhlul)
- 1 M sirkə turşusu
- 1 M trimetilamin
- Polietilenqlikol (molekul çəkisi 20 kDa)
- Dializ torbası
- Sefadex G-100 geli (Sephadex G-100), Pharmasiya istehsalı, İsveç
- Fraksiyalar kollektoru (bax şəkl. 25, E)

- Peristaltik nasos (bax şək. 25, B)
- Avtomatik qələmlə ultrabənövşəyi detektor (bax şək. 25, D)
- Xromatoqrafik sütun (uzunluq/diametr nisbəti – 50/1-dən 100/1-ə qədər)
- Ultrabənövşəyi diapazonda işləyən spektrofotometr (dalğa uzunluğu – 280 nm)
- Spektrofotometr üçün kvarts küvetlər

İşin gedişi

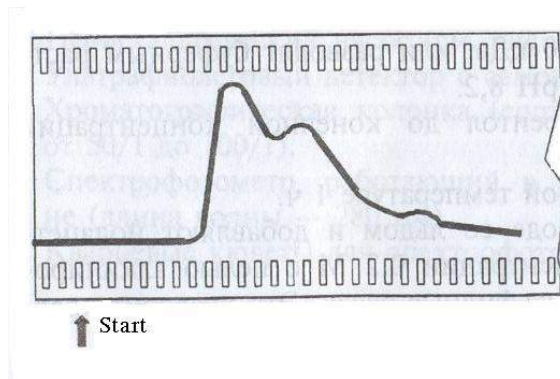
1. Sütunun doldurulması (qabaqcadan aparılır).

1. Sefadeks G-100 gelin quru qranullarını ionsuzlaşdırılmış suda isladılar; qranulların islanmasının sürətləndirmək məqsədilə onları ionsuzlaşdırılmış suda yarım saat ərzində zəif odda qaynadıb, sonra isə soyutmaq olar.
2. Geli 1 M sirkə turşusu məhlulunda həll edirlər (gelin 1 həcminə 5 həcm turşu götürülür).
3. Gel hissəciklərinin çökməsindən sonra çöküntünü bulandırmadan supernatantı atırlar.
4. Ardıcıl olaraq 2-ci və 3-cü bəndləri 2 dəfə təkrarlayırlar.
5. Geli 1 M sirkə turşusu məhlulunda həll edirlər (1 həcm gel : 1 həcm turşu nisbətində).
6. Gel suspenziyasını vakuum kolbaya yerləşdirirlər və bağlı kolbanı yan ötürücü vasitəsilə nasosa birləşdirməklə 1 dəqiqə ərzində qazsızlaşdırırlar.
7. Vakuumu ehtiyatla ayırırlar və məhz bundan sonra nasosu söndürürlər (**DİQQƏT!** *Bu əməliyyatların ardıcılığını pozmaq olmaz!*).
8. Sütunu iş 93-də göstəriləyi kimi doldururlar; sefadeks G-100 gelindən istifadə edərkən axma sürəti sütunun kəsiyinin 1 sm² sahəsinə bir saat ərzində 5 ml-dən artıq olmamalıdır.
9. Cihazları şək. 25-də göstərilən qayda ilə birləşdirərək sistemi yığırlar; sütunda hava qovucuqları qalmamalıdır; bütün cihazları qoşurlar və qızdırırlar.

2. Ayrılma.

1. Zülal-A-sefarozaada aparılan affın xromatoqrafiya üsulu vasitəsilə alınmış siçan İgG-ləri 150 mM tris-HCl (pH 8,2) məhluluna qarşı qabaqcadan dializ edirlər və zülalın qatılığını 30 mq/ml-ə qədər çatdırırlar. Bunun üçün dializ torbasını molekul çəkisi 20 kDa olan quru polietilenqlikol qatının üzərinə yerləşdirməklə İgG məhlulunu qatılaşıdırırlar və ya 150 mM tris-HCl (pH 8,2) bufer məhlulu ilə durulaşıdırırlar.
2. 1 M ditiotritol məhlulunu əlavə edərək qatılığı 0,02 M-ə qədər çatdırırlar.
3. 1 saat ərzində otaq temperaturunda inkubasiya edirlər.

4. Sınaq şüşəsini buzlu suda soyudurlar və reduksiya olunmuş disulfid rabitələrin alkülləşdirilməsi məqsədilə yodasetamid məhlulunu 0,2 M qatılığa çatdırmaqla əlavə edirlər. Bu, ağır və yüngül zəncirlərin yenidən assosiasiyasının qarşısını almaq imkanını verəcək.
5. Trimetilamini damlalarla əlavə edərək pH-ı 8,0-ə qədər çatdırırlar; pH-ı indikator kağızı vasitəsilə yoxlayırlar.
6. Reduksiya olunmuş və alkülləşmiş İgG-ni 5 dəqiqə ərzində 5000g sürətdə sentrifüqələşdirməqlə şəffaflaşdırırlar.
7. Gellə doldurulmuş və 1 M sirkə turşusu ilə tarazlaşdırılmış sütuna parçalanmış İgG-ləri sütunun ümumi həcmnin 5%-dən artıq olmayan həcmdə əlavə edirlər. Elyusiya sürəti bir saat ərzində sütun kəsiyinin 1 sm² sahəsinə 10 ml-dən artıq olmamalıdır. Fraksiyaları sütunun ümumi həcmnin 5%-dən artıq olmayan həcmdə yığırlar. Ultrabənövşəyi detektorun həssaslığının sazlanması və deteksiya diapazonunun seçilməsi zamanı nəzərə almaq lazımdır ki, ayrılmağa məruz qalan material sütundan keçərkən ən azı 10 dəfə durulaşacaq. Zülalın udma əmsalını şərti olaraq 1 qəbul etmək olar, yəni 1 mq/ml qatılığa 1 optik vahidin udulması uyğun gələcək. Sütundan keçmiş bütün zülal materialını yığırlar.
8. Fraksiyalarda zülalın qatılığını təyin edirlər. Zülalın fraksiyalara görə paylanmasının histogrammasını qururlar. Ağır və yüngül zəncirlərin ayrılmasını xarakterizə edən qrafik şəkl. 30-da göstərilib. Birinci pik H-zəncirlərə, ikinci – L-zəncirlərə uyğun olmalıdır. İgG-nin H- və L-zəncirlərinə uyğun olan fraksiyaları ayrılıqda birləşdirirlər.
9. İlkin materialın və H- və L-zəncirinin ayrılmasından sonra alınmış materialın reduksiyaedici və q/reduksiyaedici (disulfid rabitələri parçalamamaqla) şəraitdə Ds-Na-PAAG-da aparılan elektroforez üsulu ilə analizini həyata keçirirlər (bax iş 97). H- və L-zəncirlərin fraksiyalara ayrılmasının tamlığına q/reduksiyaedici şəraitdə elektroforez zamanı molekulyar çəkisi 150 kDa-dan yüksək olan zülal zolağının olmaması ilə nəzarət etmək olar. İki yüngül və iki ağır zəncirdən ibarət İgG molekulyarına uyğun olan belə yüksəkmolekulyar zolağın birinci pikdə mövcudluğu İgG-nin ilkin preparatının tam parçalanmasını sübut edir.

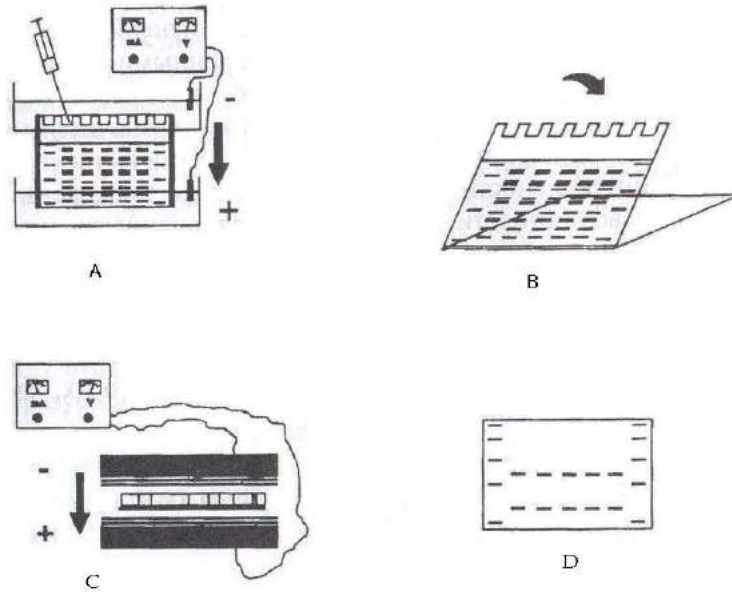


Şəkil 30. Sorbent G-100 ilə doldurulmuş sütundan siçanın İgG-lərinin H- və L-zəncirlərinin elyusiyasının profili. Oxla ayrılmalı nümunənin sütuna daxil edilməsi göstərilib.

10. İgG-nin H- və L-zəncirlərinə malik fraksiyaları müvafiq olaraq birləşdirirlər və spektrofotometrik üsulla 280 nm dalğa uzunluğunda udulma qabiliyyətinə görə zülalın qatılığını təyin edirlər. Fraksiyada zülalın qatılığını təyin edərkən aşağıdakı nisbət qəbul edilməlidir: 1 mq/ml qatılıqlı məhlula 1 optik vahidin udulması uyğun gəlin.

İMMUNOQLOBULİNLƏRİN ÖYRƏNİLMƏSİNDƏ ELEKTROFORETİK ÜSULLARIN İSTİFADƏSİ

Hal-hazırda immunologiyada, molekulyar və hüceyrəvi biologiyada mürəkkəb zülal qarışıqlarının analizi üçün fərdi komponentlərin elektroforetik ayrılması və spesifik anticisimciklər vasitəsilə immunokimyəvi deteksiya, yəni «İmmunoblotinq» üsullarının kombinasiyası geniş tətbiq edilir (şək. 31). İmmunoblotinq sözü polipeptid komponentlərin elektroforez aparıldığı məsaməli geldən (şək.31, A) nitrosellüloz membrana (şək.31 B,C) keçirilməsi zamanı alınan elektroforetik şəklin adından («replikasından») götürülüb. Nitrosellüloza membranları fərdi polipeptidləri q/kovalent və dönməz olaraq birləşdirirlər. Alınan «iz» (ing. blot) geldə baş verən ayrılmanı tamamilə əks etdirir və anticisimciklərlə sonrakı qarşılıqlı təsiri mümkün edir (şək.31, D).



Şəkil 31. İmmunoblotinq. A. denaturasiyaedici şəraitdə dodesilsulfatın iştirakı ilə poliakrilamid geldə aparılan elektroforez; B. geldə ayrılmış zülalların kiçikməsaməli membranda replikasının alınması; C. polipeptidlərin geldən kiçikməsaməli membrana elektroforetik keçirilməsi; D. membranla birləşmiş zülalların deteksiyası.

İmmunokimyəvi deteksiya məqsədilə qıtığotu peroksidazası ilə kovalent birləşmiş anticisimciklər geniş tətbiq olunur. Replikada antigenin yerini peroksidazanın rəngli və ya lyuminissensiya qabiliyyətinə malik olan substratı vasitəsilə aşkar edirlər.

Üsulun birinci mərhələsində natrium dodesilsulfatın iştirakı ilə denaturasiyaedici şəraitdə poliakrilamid gelində (Ds-Na-PAAG) aparılan elektroforezdən istifadə olunan modifikasiyası daha geniş yayılmışdır. Elektroforezin bu variantında polipeptidlər öz molekul çəkirlərinə müvafiq olaraq ayrılırlar. İmmunokimyəvi rənglənmə mərhələsində anticisimciklər öz spesifikliyinə müvafiq olaraq ayrılmış antigenlərlə qarşılıqlı təsire girirlər. Rəngin intensivliyinin və rənglənmə zonalarının sahələrinin vəsfi təyini nümunələrdə antigenin miqdarının dəyişməsinin qiymətləndirilməsini mümkün edir.

Ds-Na-PAAG-ın standartizasiya və təkrar edilməsinin yüksək dərəcəsi, eləcə də satışda mövcud olan və laboratoriyalarda alınan çoxsaylı poliklonal və monoklonal anticisimciklərin mövcudluğu bu üsulun immunologiya ilə sıx əlaqədar olan digər elm sahələrində geniş yayılmasına səbəb olmuşdur.

İŞ 97

İMMUNOQLOBULİNLƏRİN ANALİZİ MƏQSƏDİLƏ

NATRIUM DODESİLSULFATIN İŞTİRAKI İLƏ

POLİAKRİLAMİD GELİNDƏ APARILAN

ELEKTROFOREZ

Laemmiyə görə poliakrilamid gəldə (PAAG) natrium dodesilsulfatın iştirakı ilə aparılan elektroforez polipeptidlərin analizi üçün geniş tətbiq edilir. Ayrılaşma məruz qalan komponentlərin Ds-Na ion detergenti ilə işlənilməsi 5 dəqiqə ərzində 100°C-yə qədər qızdırmaqla aparılır. Bu cür işlənmə zamanı Ds-Na-un zülallarla q/kovalent kompleksləri əmələ gəlir və nəticədə zülallar güclü mənfi yük əldə edirlər. Məhlulda sabit elektrik sahəsinin mövcudluğu şəraitində mənfi yüklənmiş makromolekul kompleksləri müsbət elektroda tərəf hərəkət etmək qabiliyyətinə malik olurlar.

Ds-Na-la birləşmiş zülallar həm mənfi yüklənmiş olurlar, həm də denaturasiyaya məruz qalırlar, yəni üçüncülü və ikincili quruluşlarını itirirlər. Beləliklə, ayrı-ayrı komponentlər arasında olan elektroforetik hərəkətlik fərqi ümumi fərdi yükün xüsusiyyətləri, hidrofobluq fərqləri və ya polipeptid zəncirinin yığılma xüsusiyyətləri ilə deyil, amin turşu ardıcılığının uzunluğunun fərqi ilə, yəni molekulların çəkirlərinin fərqi ilə müəyyənləşir.

Nümunələrə disulfid rabitələrini reduksiya edən agentlərin (2-merkaptotanol və ya ditiotritol) əlavə edilməsi sistein amin turşusu qalıqları arasındakı zəncirlərarası və zəncirdaxili disulfid rabitələrin parçalanmasına səbəb olur və subvahidarası disulfid rabitələrə malik olan zülalların subvahid tərkibinin öyrənilməsinə imkan verir.

Monomerlərin 4-dən 22%-ə qədər qatılıqda polimerləşməsi nəticəsində alınan kiçikməsaməli poliakrilamid gəlləri 10-dan 200 kDa-a qədər polipeptidlərin effektiv ayrılmasına imkan verir. Bu cür ayrılma molekulyar ələk prinsipinə əsasən baş verir. Laemmiyə görə elektroforezdə iki gəldən ibarət sistemdən istifadə olunur: nümunələrin əlavə olunması üçün oyuqların formalaşdığı iriməsaməli (üst) qatılaşdırıcı gel və ayırıcı kiçikməsaməli (alt) gel. İki gelin bufer məhlullarının pH-ı və ion gücü arasında mövcud olan fərqlər sayəsində onların sərhədində gərginlik «sıçrayışı» yaranır. Bu, ayrılmaya məruz qalan zülalların elektroforetik hərəkətliyinin artmasına səbəb olur və ayırıcı gələ

daxil olmazdan əvvəl qatılaşdırıcı gəlin nazik zonasında nümunənin effektiv qatılaşmasına gətirib çıxarır. Beləliklə, gələ daxil olunan nümunənin həcmnin ayrılma keyfiyyətinə təsiri azalır.

Elektroforezdən sonra gəlləri zülal rəngləyiciləri (məs., kumassi mavi) ilə rəngləmək olar və ya immunokimyəvi analiz məqsədilə zülalların membranlara köçürülməsi üçün istifadə etmək olar.

Reaktiv və ləvazimat:

1. PAAG lövhələrində şaquli elektroforez üçün standart elektroforetik avadanlıq:

- şaquli elektroforez üçün kamera
- kameraya uyğun gələn PAAG lövhəsinin polimerləşməsi üçün şüşələr
- 1 mm qalınlığında PAAG lövhəsinin formalaşdırılması üçün «speyser»-araqatları
- nümunələr üçün gəldə «ciblərin» formalaşdırılması üçün qalınlığı 1 mm olan «daraq»
- şüşə lövhələrdən və araqatlardan «sendviç»in yığılması üçün sıxaclar
- 30 mA, 250 V rejimi təmin edən cərəyan mənbəyi
- gəllərin rənglənməsi üçün qapaqla vannacıqlar
- vakuum nasosla gəllərin elektrik quruducusu

2. Reaktivlər:

- Laemmliyə əsasən reduksiyaedici şəraitdə Ds-Na-PAAG-ın aparılması üçün bufer məhlulları (qabaqcadan hazırlanıb saxlanıla bilər).

Cədvəl 16

№	Buferin növü	Tərkibi	Hazırlanma üsulu
1	2	3	4
1.	Nümunə üçün ikiqat bufer, q/reduksiyaedici şərait	125 mM tris-HCl, pH 6,8; 0,2% Ds-Na; 10%-li qliserin; 0,02%-ə qədər bromfenol göy rəngləyicisi	40 ml distillə suda 0,76 q tris həll etmək; HCl-la titrləyərək pH-ı 6,8-ə çatdırmaq; 10 ml qliserin və 2,3 q Ds-Na əlavə etmək; 0,1 q bromfenol göy əlavə etmək; həcmi 50 ml-ə çatdırmaq; alikvotlara bölmək və -20°C-də saxlamaq
2.	Nümunə üçün ikiqat bufer, reduksiyaedici	125 mM tris-HCl, pH 6,8; 0,2% Ds-Na; 50 mM	40 ml distillə suda 0,76 q tris həll etmək; HCl-la titrləyərək pH-ı

	şərait	ditiotreitol; 10%-li qliserin; 0,02%-ə qədər bromfenol göy rəngləyicisi	6,8-ə çatdırmaq; 10 ml qliserin, 2,3 q Ds-Na, 0,78 q ditiotreitol əlavə etmək; 0,1 q bromfenol göy əlavə etmək; həcmi 50 ml-ə çatdırmaq; alikvotlara bölmək və -20°C-də saxlamaq
3.	Ayırıcı gel üçün bufer, 4-qat konsentrat	1,5 M tris-HCl, pH 8,8; 0,2%-li Ds-Na	90 ml distillə suda 18,2 q tris və 0,4 q Ds-Na həll etmək; qatı HCl-la titrləyərək pH-ı 8,8-ə çatdırmaq; həcmi 100 ml-ə çatdırmaq; 4°C-də saxlamaq
4.	Qatılaşdırıcı gel üçün bufer, 4-qat konsentrat	0,5 M tris-HCl, pH 6,8; 0,2%-li Ds-Na	40 ml distillə suda 3 q tris və 0,2 q Ds-Na həll etmək; qatı HCl-la titrləyərək pH-ı 6,8-ə çatdırmaq; həcmi 50 ml-ə çatdırmaq; 4°C-də saxlamaq
5.	Elektrod buferi, 10-qat konsentrat	25 mM tris; 190 mM qlisin; 0,1%-li Ds-Na, pH 8,3 (10 dəfə durulaşdırıldıqdan sonra)	1 l distillə suya 30,3 q tris, 144 q qlisin və 10 q Ds-Na əlavə etmək; titrləməmək; otaq temperaturunda saxlamaq
6.	30%-li akrilamid	Metilen-bis-akrilamid/akrilamid nisbəti 1/36	103 ml ionsuzlaşdırılmış suda 30 q akrilamid və 0,82 q N,N'-metilen-bis-akrilamid həll etmək; süzmək və 4°C-də qaranlıqda saxlamaq
7.	10%-li ammonium persulfat		1 ml ionsuzlaşdırılmış suya 0,1 q ammonium persulfat əlavə etmək; bilavasitə işdən əvvəl hazırlanmalıdır

8.	TEMED		N,N,N',N'- tetrametilendiamin, 4°C-də qaranlıqda saxlamaq
----	-------	--	--

- Poliakrilamid gellər.

Cədvəl 17

Ayırıcı poliakrilamid gellərin hazırlanması

(1 gel – 16 ml)

Ayrılan zülal. Mr, kDa	Polimerl. sonra akrilamidin son %-i	Ditstillə suyu	Ayırıcı gel üçün bufer, 4- qat konsentrat, ml	30%-li akrilamid	10%-li ammonium persulfat, mkl	TEMED, mkl
70-200	5	9,3	4,0	2,7	40	20
40-150	7,5	8,0	4,0	4,0	30	15
20-100	10	6,7	4,0	5,3	25	12,5
10-70	12,5	5,3	4,0	6,7	20	10
8-50	15	4,0	4,0	8,0	15	10

- Nümunələr üçün «ciblərin» formalaşdırılması üçün qatılaşdırıcı (üst) gel. 5 ml gel üçün:
 - H₂O – 2,95 ml;
 - qatılaşdırıcı gel üçün bufer (0,5 M tris-HCl, pH 6,8) – 1,25 ml;
 - 30%-li akrilamid – 0,8 ml;
 - 10%-li ammonium persulfat – 15 mkl;
 - TEMED – 5 mkl.

3. Molekul çəkilərinin marker-zülalları:

Nümunə üçün buferdə hazırlanmış məhlul (reduksiyaedici şərait), hər birinin qatılığı 1 mq/ml-dir:

- ökü z zərdab albumini (66 kDa);
- ovalbumin (45 kDa);
- karboanhidraza (29 kDa);
- sitoxrom c (12,4 kDa).

4. Gellərin rənglənməsi üçün məhlullar:

- kumassi mavi R250 məhlulu (Sigma, ABŞ, № B 7920: (əlavələr, 9);
- şəffaflaşdırıcı məhlul: (əlavələr, 10).

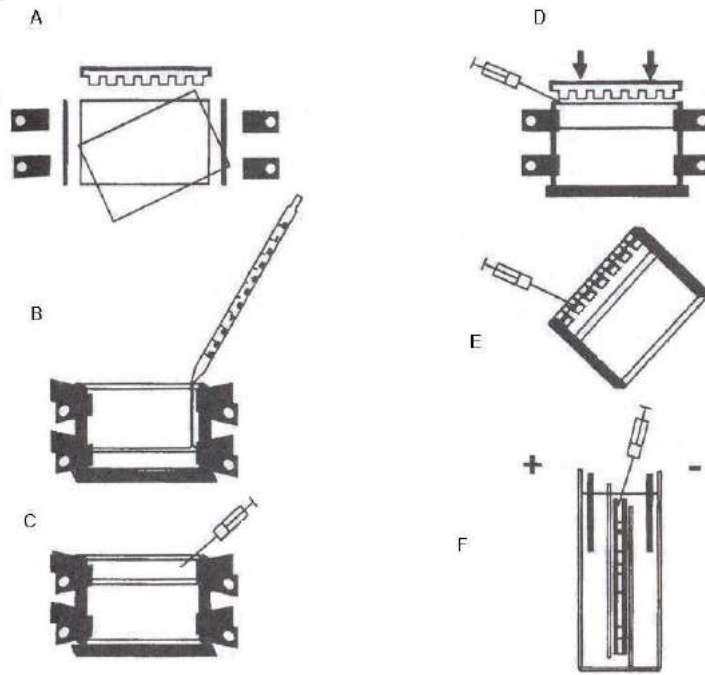
İşin gedişi

1. Poliakrilamid gəlin polimerləşməsi.

1. Şaquli qurulmuş və yan araqları vasitəsilə bir-birindən ayrılan iki şüşə lövhə arasında akrilamidi polimerləşdirirlər (şək. 32, A). Şüşələrdən və «speyser»-araqlardan istifadə edərək polimerləşmə üçün forma hazırlayırlar. Bu zaman elektroforez cihazının növündən asılı olaraq ya istehsalçı-firmanın göstəricilərinə riayət edirlər, ya da kağız üçün dəftərxana sıxaclarından istifadə edərək «sendviç» variantını yığırlar. Şüşələri möhkəm üfüqi səth üzərində düz şaquli vəziyyətdə qururlar.
2. Axma mümkün olan yerləri, yəni şüşənin araqlarına söykənən kənarları və plastikə aşağı hissəsi aqarozanın suda 1%-li isti məhlulu ilə isladılır ki, o, soyuyaraq polimerləşmə zamanı akrilamidin axmasının qarşısını alan gəl əmələ gətirir.
3. Bilavasitə polimerləşmədən qabaq müəyyən qatılıqlı ayırıcı poliakrilamid geli hazırlayırlar. Bu məqsədlə ionsuzlaşdırılmış suyu, akrilamidin qatı məhlulunu və tris-HCl bufer məhlulunun (pH 8,3) ¼ həcm hissəsini qarışdırırlar (bax cə. 17).
4. Alınmış qarışığı vakuuma birləşmiş yan ötürücüsü olan ağız kəpəyi kolbada qazsızlaşdırırlar (bu məqsədlə su şırnağı nasosundan da istifadə etmək olar). Vakuumu ehtiyatla ayırırlar və məhz bundan sonra nasosu söndürürlər. (**DIQQƏT!** *Bu əməliyyatların ardıcılığını pozmaq olmaz!*). Beləliklə, polimerləşməyə mane olan oksigenin artıq miqdarını kənarlaşdırırlar. TEMED və 10%-li ammonium persulfat məhlulunu əlavə edib (bax cə. 17) qarışdırırlar.
5. Polimerləşməyə başlayan geli qabarcıqların əmələ gəlməsinə yol vermədən dərhal nazik pipetka vasitəsilə polimerləşmə üçün şüşələrdən yığılmış formaya daxil edirlər (bax şək. 32, B). Qatılaşdırıcı gəl və nümunə üçün «ciblərin» formalaşdırılması üçün kifayət qədər boş yer saxlamaqla şüşələri doldururlar. Bu zaman nəzərə almaq lazımdır ki, cib qatılaşdırıcı gəl qatının hündürlüyündən çox olmamalıdır (adətən 2-2,5 sm).
6. Şüşələri doldurduqdan sonra formalaşan gəl üzərinə dərhal bir neçə damla ionsuzlaşdırılmış sudan əlavə edərək geli su qatı ilə tamamilə örtürlər (çalışmaq lazımdır ki, sərhəd pozulub qarışmasın). Bu prosedur hamar üst sərhədin formalaşmasına xidmət edir və havanın oksigeni ilə əlaqəni kəsir (bax şək. 32, C).
7. Polimerləşmə prosesi başa çatdıqdan sonra geli üstədən ionsuzlaşdırılmış suyun az miqdarı ilə yuyurlar və gələ toxunmayaraq suyu filtr kağızı ilə ehtiyatla

kənarlaşdırırlar. Geldə ciblərin formalaşması üçün «darağı» qururlar və yuxarıda ayırıcı gel üçün göstəriləyi qaydada qatılaşdırıcı geli polimerləşdirirlər (ayırıcı gəldən fərqli olaraq, qatılaşdırıcı gelin üzərində su damlalarından ibarət qat əmələ gətirmirlər) (bax şəx. 32, D).

8. Qatılaşdırıcı gelin polimerləşməsi başa çatdıqdan sonra «darağı» ehtiyatla kənarlaşdırırlar və gəldə əmələ gələn cibləri şpris vasitəsilə su ilə yuyurlar (bax şəx. 32, E). Elektroforez cihazını yığırlar, polimerləşmiş gel ilə formanı kameraya yerləşdirirlər və elektrodları qoşurlar. Kameranı elektrod buferi ilə doldururlar. Bunun üçün qatı elektrod buferi (10-qat qatılaşdırılmış) (bax cəđ. 16) qabaqcadan distillə suyu vasitəsilə durulaşdırırlar. Nümunənin əlavə edilməsi üçün hazırlanmış cibləri şpris vasitəsilə elektrod buferlə ehtiyatla yuyurlar (bax şəx. 32, F).



Şəkil 32. Elektroforez üçün poliakrilamid gelin polimerləşdirilməsi. A. gel lövhəsinin polimerləşdirilməsi məqsədilə formanın yığılması üçün şüşələr, araqatlar, «daraq» və sıxaclar; B. yığılmış formanın hazır polimerləşən ayırıcı gellə doldurulması; C. polimerləşən ayırıcı gelin səthinə nazik su qatının əlavə edilməsi; D. qatılaşdırıcı gelin polimerləşməsindən sonra «darağın» yerləşdirilməsi; E. nümunə üçün oyuqların yuyulması; F. gelin cihaza yerləşdirilməsi və oyuqların yuyulması.

2. Elektroforez üçün zülal nümunələrinin hazırlanması.

Nümunələri qabaqcadan hazırlayıb dondurulmuş vəziyyətdə uzun müddət ərzində saxlamaq olar. Digər nümunələrlə müqayisə məqsədilə onları bir neçə dəfə istifadə etmək olar. Nümunənin hazırlanması üçün tədqiq olunan zülalə «nümunə üçün buferi» əlavə edirlər və 5 dəqiqə ərzində su hamamında qaynadırlar. Zülal məhlulları üçün cəđ. 16-da göstərilən bütün komponentlərin miq-darının iki dəfə artırmaqla qatı «nümunə üçün buferi» istifadə etmək daha əlverişlidir. Bu zaman zülal məhlulunu və «nümunə üçün qatı buferi» bərabər həcmdə qarışdırmaq lazımdır.

3. Elektroforezin aparılması.

1. Nümunəni mikroşpris və ya mikropipetka vasitəsilə üst gelin «cibinə» daxil edirlər. Nümunələrin elektrod buferlə qarışmasına yol verməyərək, onları oyuğun dibinə daxil edirlər. Nəzərə almaq lazımdır ki, ayrılma nəticəsində əmələ gələn fərdi (individual) zolaqda zülalın miqdarı 1-2 mkq-dan çox olduğu halda gelin zülalla «artıq yüklənməsi» baş verə bilər ki, bu da nəticələrin pozulmasına gətirib çıxara bilər.
2. Kənar ciblərin hər birinə molekul çəkisi məlum olan marker-zülallardan ibarət qarışığın 5 mkl-ni daxil edirlər.
3. Elektroforez cihazının uclarını cərəyan mənbəyi ilə birləşdirirlər. Bu zaman nəzərə almaq lazımdır ki, Ds-Na birləşdirilmiş mənfəi yüklənmiş zülallar müsbət elektroda doğru hərəkət edəcəklər.
4. Elektroforezi əvvəla 10 mA, bromfenol göy rəngləyicisinin gələ tam daxil olmasından sonra isə, 20 mA cərəyan şəraitində aparırlar.
5. Rəngləyici (bromfenol göy) gelin aşağı səddinə çatdıqdan sonra cərəyan mənbəyini söndürürlər, gellə şüşələri çıxarıb, aralıq qatları kənarlaşdıraraq nazik şpatel vasitəsilə şüşələri ehtiyatla ayırırlar. Geli zədələməmək üçün proseduru xüsusi səliqəliliklə aparmaq lazımdır. Gelin şüşələrdən ayrılması distillə suyu qatı ilə daha asan baş verir. Şpatel vasitəsilə geli şüşələrdən ayırırlar.
6. Tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq geli ya ayrılmış zülalların nitrosellülozaya keçirilməsi üçün istifadə edirlər (bax iş 98), ya da 1 saat ərzində kumassi mavi rəngləyicisi ilə rəngləyirlər, sonra isə ən azı 4-5 saat ərzində rəngsizləşdirici məhlulda bir neçə növbə ilə rəngsizləşdirirlər. Rənglənmə və rəngsizləşdirmə proseslərini məhlulları bir qədər qızdırmaqla sürətləndirmək olar.
7. Rənglənmədən sonra vakuum nasosla qızdırıcıdan istifadə edərək gelləri qurudurlar. Geli həmçinin xüsusi çərçivədə sıxılmış dializ membranı vərəqləri arasında yerləşdirməklə qurutmaq olar.

İŞ 98

İMMUNOBLOTİNG

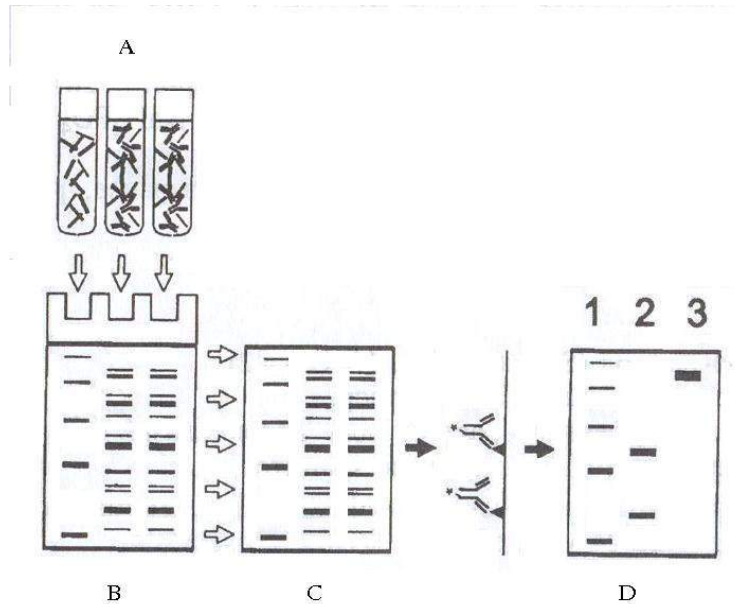
İmmunoblotinqin və zülalların bərkfazlı immunoferment analizinin əsasını eyni prinsiplər təşkil edir. Bərk faza qismində istifadə edilən zülalları q/kovalent, lakin möhkəm birləşdirən polimer membranlar məhlulda olan nişanlanmış anticisimciklərlə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. Anticisimciklər antigenlərlə qarşılıqlı təsirə girərək bərk fazaya keçirlər, reaksiyaya daxil olmamış anticisim-ciklərin artıq miqdarı isə, membranın yuyulması nəticəsində kənarlaşdırılır. Membranda qalan və antigen-anticisimcik kompleksləri ilə assosiasiya olunmuş nişan onları gözə görünən edir. Anticisimciklərin qıtığotu peroksidazası ilə kovalent nişanlanması geniş istifadə olunur. Bu ferment bəzi üzvi substratları H₂O₂-nin iştirakı ilə oksidləşdirərək onları həll olan rəngsiz formadan həll olmayan rəngli və ya lyuminissensiya qabiliyyətinə malik olan formaya keçirirlər.

Müxtəlif spesifikli poliklonal və monoklonal anticisimciklərin istifadəsi bir tərəfdən bir təcrübə şəraitində antigen qarışıqlarının keyfiyyət və vəsfi müqayisəsini, digər tərəfdən antigenlərin molekulyar çəkirlərinin təyini mümkündür.

Replika – «blotların» alınması üçün blotların digər spesifikli anticisimciklərlə təkrar istifadəsinə imkan verən, inert, kifayət qədər möhkəm, nitrosellüloz və ya kapron, məsaməli membranlar geniş istifadə olunurlar. Zülalların gəldən membrana daha sürətli və tam keçirilməsi məqsədilə membranı gel təbəqəsi ilə sıx birləşdirirlər və gel təbəqəsi boyunca yox, köndələn, yəni membran istiqamətində elektroforez aparılırlar. Mənfi yüklənmiş polipeptidlər gəldən membrana keçib, orada yığılırlar.

Anticisimciklərin membranla q/spesifik qarşılıqlı təsirinin azaldılması məqsədilə replika alındıqdan sonra «bloklaşdırılma» və ya «doydurulma» üsulundan istifadə edirlər. Membranlar ballast zülalın artıq miqdarı ilə, məs. jəlatinin 3%-li məhlulu ilə işlənir. Əksər hallarda anticisimciklərin məhluluna onların membranla q/spesifik qarşılıqlı təsiri azaldan q/ion detergentlər əlavə edirlər. Antigenlərin təyini üçün istifadə olunan anticisimciklər adətən istehsalçı tərəfindən nişanlanmış vəziyyətdə təhiz edilirlər. Belə halda reaksiya iki mərhələdə aparılır: membran ardıcıl olaraq əvvəlcə ayrılmağa məruz qalan antigenlərə qarşı birincili (məs., siçan), sonra isə peroksidaza ilə nişanlanmış əksnövlü (siçan İg-lərinə qarşı dovşan anticisimcikləri) ikincili anticisimciklərlə işlənir.

Siçan İg-lərinin ağır və yüngül zəncirlərinin blotda immunokimyəvi deteksiyası (immunorənglənmə) siçan İg-ə qarşı peroksidaza ilə nişanlanmış dovşan anticisimcikləri ilə inkubasiya olunmaqla yalnız bir mərhələdə aparılır. Tərkibində siçan İg-ləri olan nümunəni gələ əlavə edirlər (şək. 33, A) və reduksiyaedici və q/reduksiyaedici şəraitdə Ds-Na-PAAG-elektroforez aparılırlar (yuxarıda qeyd olunduğu kimi). Parallel yola molekulyar çəkisi məlum



Şəkil 33. Reduksiyaedici və q/reduksiyaedici şəraitdə siçanın İgG-lərinin analizi. A. ayrılma üçün nümunələr: siçan immunoqlobulinləri və molekulyar çəkili məlum olan markerlər; B. elektroforez; C. zülalların membrana keçirilməsi; D. zülal replikasının siçan immunoqlobulinlərinə qarşı nişanlanmış anticisimciklərlə

inkubasiyası; E. siçan immunoqlobulinlərinin blotda aşkarlanması; aşağıdakı zolaqlar göstərib: 1 – molekulyar çəkilişləri məlum olan markerlər qarışığı; 2 – reduksiyaedici şəraitdə siçanın İgG-ləri; 3 – q/reduksiyaedici şəraitdə siçanın İgG-ləri.

olan marker-zülalları əlavə edirlər (şək. 33, A). Keçirilmədən sonra markerlərə uyğun olan zolaqları qələmlə nişanlayırlar. Siçan İg-lərinə qarşı anticisimciklərlə blotun işlənməsi nəticəsində (şək. 33, D) siçan İg-lərinə malik olan nümunədə reduksiyaedici şəraitdə İgG-nin H- və L- zəncirlərinə uyğun olan molekulyar çəkilişləri 50 kDa və 25 kDa olan zolaqlar aşkar olunmalıdır (şək. 33, E). Elektroforez İgG molekulunda zəncirlərarası disulfid rabitələrin reduksiyası baş verməyən q/reduksiyaedici şəraitdə aparılırsa, bütöv İgG molekuluna uyğun olan molekulyar çəkilişləri 150 kDa-dan artıq olan zolaq aşkar olunmalıdır.

Reaktiv və ləvazimat:

- Ds-Na-PAAG elektroforez üçün avadanlıq və reaktivlər (bax iş 97)
- İki qrafit elektroddan ibarət və ölçüləri PAAG lövhəsindən bir qədər böyük olan «yarımquru» keçirilmə üçün elektroforetik kamera
- 300 mA, 10 V rejimi təmin edən cərəyan mənbəyi
- Rənglənmə və inkubasiya üçün qapaqlı vannacıq
- Nitrosellüloz membran (Sigma, ABŞ, №8142)
- Filtr kağızı
- Keçirilmə üçün bufer məhlulu (0,5 l üçün): (əlavələr, 11)
- Kumassi mavi R250 rəngləyicisinin (Ponseau S, ABŞ) 5 %-li sirkə turşusunda 0,1%-li məhlulu
- Tərkibində tvn-20 detergenti olan fosfat-duz buferi – FDB-T (NaCl – 8 q; Na₂HPO₄·12H₂O – 2,9 q; NaH₂PO₄·2H₂O – 0,2 q; tvn-20 detergenti – 0,05%)
- FDB-T-də jelatinin 3%-li məhlulu (qabaqcadan hazırlanır, qızdırmaqla jelatin həll edilir)
- Qıtıgotu peroksidazası ilə siçan İg-ə qarşı dovşan anticisimciklərinin qarışığı
- Metanol
- 1-xlor-4-naftol (Sigma, ABŞ, № C 8302)
- Hidrogen peroksidi, 30%-li məhlul
- Qıtıgotu peroksidazası üçün substrat-bufer məhlulu (bilavasitə istifadədən əvvəl hazırlanmalıdır; saxlamaq olmaz): (əlavələr, 12)

İşin gedişi

1. Natrium dodesilsulfatın iştirakı ilə poliakrilamid geldə elektroforez.

Birinci mərhələdə poliakrilamid geldə elektroforez aparılırlar (Ds-Na-PAAG, bax iş 97) və dərhal elektroforezdən sonra geldən keçirilmə üçün istifadə edirlər.

2. Elektroforetik keçirilmə.

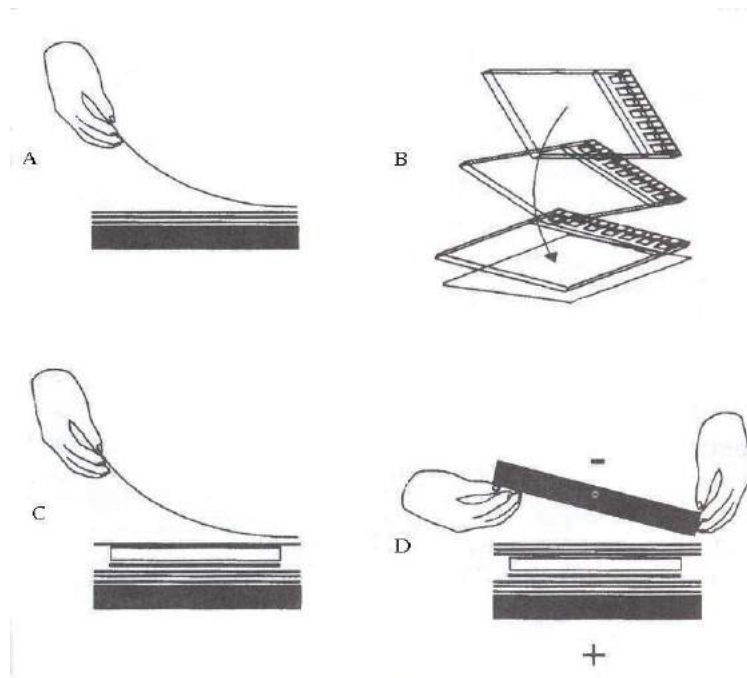
1. «Yarımquru» keçirilmə üçün cihazın üfüqi qurulmuş karbon elektrodunun üstünə qabaqcadan gələn ölçülərinə müvafiq olaraq kəsilmiş və keçirilmə üçün buferlə isladılmış filtr kağızı qoyulur (şək. 34, A). Filtr kağızını buferlə doldurulmuş ayrıca

qaba salmaqla islatmaq daha rahatdır. Filtr kağızlarını ardıcıl olaraq bir-birinin üzərinə elə yerləşdirirlər ki, onların arasında hava qovucuqları qalmasın. Cəmi 6 qat alınmalıdır. Üstdəki kağızı keçirilmə üçün buferlə bolluca isladılar.

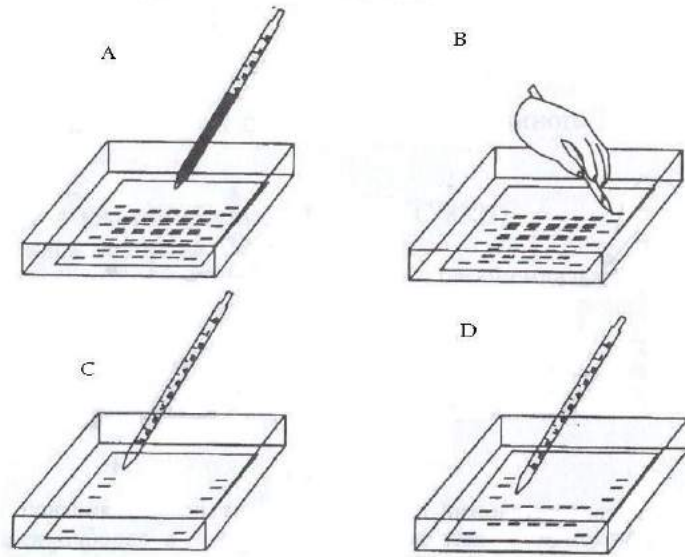
2. Dərhal bundan sonra kağız qatının üzərinə nitrosellüloza vərəqindən və elektroforezdən sonrakı geldən ibarət «sendviçi» əlavə edirlər (şək. 34, B). Bu zaman həmçinin hava qovucuqlarının mövcud olmamasına nəzarət etmək lazımdır. Əgər qovucuqlar mövcuddursa, bu halda gəlin səthi ilə təmiz şüşə pipetkanı diyirləndirərək onlar xaric edilir.
3. Gel keçirilmə üçün buferlə bolluca isladılır və onun üzərinə yuxarıda göstərilən kimi filtr kağızını altı qatla yerləşdirirlər (şək. 34, C). Kağızın üstünü yenə də bolluca isladılar və ikinci karbon elektrodunu ehtiyatla yerləşdirirlər (şək. 34, D). Cihazın növündən və üst elektrodun çəkisindən asılı olaraq gel, nitrosellüloza və kağız arasında daha yaxşı kontakta nail olmaq məqsədilə kiçik çəki daşından istifadə etmək olar.
4. Elektroforez 1 saat ərzində 10 V gərginliklə aparılır. Polyarlıq və keçirilmə istiqamətinin ümumi qaydaları elektroforetik ayrılımda olduğu kimidir.

3. Nitrosellülozanın rənglənməsi.

1. Keçirilmə başa çatdıqdan sonra zülal replikası ilə nitrosellülozanı distillə suyu ilə bir qədər yuyurlar və 1-5 dəqiqə ərzində qırmızı rəngləyici ilə rəngləyirlər. (şək. 35, A). Bu rənglənmə möhkəm deyil və nitrosellüloza su ilə yuyulduqda asanlıqla itir.
2. Rəngin artığını distillə suyunun bir neçə porsiyası ilə yuyurlar. Blotda zülal zolaqlarının əmələ gəlməsindən sonra nitrosellüloza vərəqini təmiz səthə (teflon vərəqinə və ya nəm şüşə lövhəsinə) yerləşdirirlər və yumşaq qrifel qələmi vasitəsilə molekul çəkilişi məlum olan markerlərin yerlərini qeyd edirlər (şək. 35, B). Rəngin artığını distillə suyu ilə yuyurlar. Keçirilmənin tam olub-olmamasını yoxlamaq məqsədilə keçirilmədən sonra qalan geli hər hansı zülal rəngləyicisi ilə, məs. kummasi R250 rəngləyicisi ilə rəngləyirlər (bax iş 97).



Şəkil 34. Zülalların poliakrilamid geldən kiçikməsaməli membrana elektroforetik keçirilməsi. A. «yarımquru» elektroforetik keçirmə üçün cihazın alt elektrodundakı nəm filtr kağızları üzərinə nitrosellüloz membranının yerləşdirilməsi; B. gəlin nitrosellüloz membranının səthinə yerləşdirilməsi; C. gəlin səthinə nəm filtr kağızının yerləşdirilməsi; D. üst elektrodun nəm filtr kağızlarından ibarət qatın üzərinə yerləşdirilməsi.



Şəkil 35. Nitrosellüloz membranda zülalların immunokimyəvi deteksiyası. A. qırmızı rəngləyici ilə nitrosellüloz membranının rənglənməsi; B. molekul çəkiləri məlum olan markerlərin yerlərinin nişanlanması; C. anticisimciklərlə inkubasiya; D. anticisimciklərlə assosiasiya olunmuş nişanın aşkarlanması.

4. İmmunorənglənmə.

1. Replikanı 1 saat müddətinə daimi qarışdırmaqla blokladırıcı məhlulə (jelatinin FDB-T-də 3%-li məhlulu) yerləşdirirlər.
2. FDB-T ilə üç növbə ilə, hər növbə 5 dəqiqə olmaqla, yuyurlar.
3. Qıtıgotu peroksidazası ilə nişanlanmış anticisimciklərin FDB-T-də məhlulu ilə 1 saatdan 12 saata qədər müddət ərzində inkubasiya edirlər (şək. 35, C). İşlənilmə şəraiti anticisimciklərin keyfiyyətindən, onların qatılığından, replikada antigenin miqdarından asılı olaraq dəyişilə bilər və təcrübə yolla müəyyən edilir. Bundan başqa, işlənilmə şəraiti həmçinin peroksidaza substratının seçimindən də asılıdır. Belə ki, məs., Amersham firmasının (ECL yığıcı) lyuminissensiya edən substratının istifadə olunduğu halda 1-xlor-4-naftolla aparılan işlənilməyə nisbətən nişanlanmış anticisimciklərin qatılığı daha aşağı, yuyulma vaxtı daha uzun, reaktivlərin təmizlik dərəcəsinə olan tələbat daha yüksək olmalıdır, lakin bu halda üsulun daha yüksək həssaslığı əldə olunur.

4. Anticisimcikləri daimi qarışdıraraq FDB-T ilə 5 dəfə yuyurlar. Yuyulma müddəti 1 saatdan az olmamalıdır.
5. Replikanı 1-xlor-4-naftol məhlulu ilə aşkarlayırlar (şək. 35, D) və ya bu məqsədlə Amersham firmasının ECL yığımından istifadə edirlər (istehsalçının göstərişləri yığma əlavə olunur). 1-xlor-4-naftolun peroksidaza ilə oksidləşmə məhsulunun qara-göy rənglənmiş zolaqlarının əmələ gəlməsindən sonra, replikanı su ilə yuyurlar.
6. Substrat qismində 1-xlor-4-naftoldan istifadə edilməsi halında rənglənmiş replikanın şəklini çəkmək və ya hər hansı digər üsulla (kserokopiya, kompyuter skanərlənməsi vasitəsilə) sənədləşdirilməsi məqsəduyğundur, çünki məhsulun qara-göy rəngi vaxt keçdikcə solur. ECL yığımının istifadəsi ilə rentgen plyonkada fiksə edilmiş ayrılma şəkli bir replikadan bir neçə dəfə alına bilər və uzun müddət saxlanıla bilər.

VIII BÖLMƏYƏ AİD SUALLAR

1. İmmunoqlobulin molekullarının quruluşunu izah edin.
2. Zülalların duzlaşdırılma yolu ilə fraksiyalara ayrılmasını necə aparırlar?
3. Xromatoqrafiya üsulunun əsas prinsipləri.
4. İmmunoqlobulinlərin ayrılması məqsədilə xromatoqrafik üsulun hansı variantlarından istifadə etmək olar? Onları səciyyələndirin.
5. İmmunoqlobulinlərin proteolitik parçalanması vasitəsilə nəyi tədqiq etmək olar?
6. Gel-filtrasiya üsulunun prinsipləri.
7. Elektroforez üsulunun prinsipini izah edin.
8. İmmunoqlobulinlərin ayrılması məqsədilə aparılan elektroforez hansı mərhələlərdən ibarətdir? Onları səciyyələndirin.
9. İmmunoblotting üsulunun Prinsipi nədən ibarətdir?
10. İmmunoblottingdən immunoloji tədqiqatlarda hansı məqsədlə istifadə etmək olar?

BİOKİMYA BƏHSİNƏ AİD

ƏLAVƏLƏR

1. *Formol qarışıq* - 0,5 l formalinə 10 ml 2 saylı işdə hazırlanmış fenolftalein töküüb üzərinə 0,1-0,2 N NaOH məhlulunu damla-damla zəif cəhrayı rəng alana qədər əlavə edilir. NaOH-ı 100-200 mq qələvini 1 l suda həll etməklə hazırlayırlar. 2 saylı iş üçün hazırlanan 0,4 %-li qələvini də istifadə etmək olar. Bu halda NaOH çox sərf olunacaq.
2. *Zülal məhlulu* - toyuq yumurtası təxminən 88 % su, 1 % kar-bohidrat, 0,5 % mineral maddələr, 10, 5 % zülaldan ibarətdir. Bu rəqəmləri nəzərə alsaq yumurta zülalının duru-laşdırılmamış məhlulunu 10 %-li hesab etmək olar. Həmin məhlulun həcmindən 5 dəfə cox distillə suyu ilə yumurta zülalını qarışdırıb ikiqat, su ilə isladılmış tənzipdən süzməklə 1 %-li albumin məhlulu alırıq. Yumurta qlobulini isə tənzipdə qalır. Zülal məhlulunun qismən uzun müddət qalması üçün 100 ml 1 %-li məhlula 50 ml doymuş duz məhlulu (NaCl) əlavə etmək olar. Məhlul soyuducuda saxlanılır.
3. *1 %-li albumin* - texniki tərəzidə 25 q buğda unu çəkib onu 100 ml distillə suyunda yaxşı qarışdırmaq, arabir çalxalamaq və 1,5 saatdan sonra məhlulun üst şəffaf hissəsini götürüb onu süzməklə 1 %-li bitki albulini məhlulunu alırıq.
4. *2 %-li natrium hipobromid (NaOBr)* - 30 q NaOH 100 ml suda həll edilir. Məhlul tam soyuduqdan sonra sorucu şkafda ehtiyatla oraya 3 ml təmiz brom tökülür. Məhlulu yaxşıca qarışdırıb qara kağıza bükülmüş qabda sorucu şkafda və ya soyuducuda 1 aya yaxın saxlamaq olar.
5. *Fol reaktiv* - 10 q NaOH 90 ml suda həll edilir (I) 2,5 q qurğuşun asetat [Pb(CH₃COO)₂] 95 ml isti suda həll edilir (II). Bilavasitə iş aparılan zaman II məhlulun 1 həcmi I məhlulun 2 həcmi ilə qarışdırmaq lazımdır. Bu zaman çöküntü alınır. Çöküntünü 10 %-li NaOH-ın artıq miqdarı ilə həll etdikdən sonra reaksiyanı aparmaq olar. Alınan fol reaktiv Na₂PbO₂ (natrium plyumbitin) qələvi məhluludur.
6. 1 q jelatin üzərinə 90 ml su töküüb bir neçə saat və ya səhərə qədər jelatinin şişməsini gözləmək lazımdır. Onu su hamamında qızdırmaqla həll edirlər.
7. 90 ml qatı NaCl (xlorid turşusu) ilə 10 ml xüsusi çəkisi 1,685 olan fosfor turşusunu ehtiyatla qarışdırmaqla 9:1 nisbətdə qarışıq alınır.
8. *40 %-li formaldehid preparatı* - formalin adlanır (H₂C=O). Bir hissə formalin 39 hissə distillə suyu ilə yaxşı qarışdırıldıqda 1 %-li formaldehid məhlulu alınır.
9. *Qlioksil turşusu preparatı* almaq üçün əvvəlcə 10 q quzuqulağı turşusunu 100 ml suda həll etməklə onun qatı məhlulu hazırlanır. Məhlulu 0° S-ə qədər soyudurlar. Sonra 2 q döyülmüş narın maqneziumu (Mg) bir qədər su ilə isladıb 50 ml soyuq, doymuş quzuqulağı turşusu ilə qarışdırılır. Bu zaman quzuqulağı turşusunun maqnezium duzu çökür. çöküntünü ayıraraq filtratı götürür və onu 1-2 ml sirkə turşusu ilə turşulaşdırırlar. Alınan məhlulun həcmi 200 ml-ə çatdırılır. Preparatı soyuducuda saxlamaq lazımdır.
10. *Diazoreaktiv, Pauli reaktiv* - 2 məhluldan ibarətdir.
 - 1) *HCl-da hazırlanmış sulfanil turşusu* 450 mq sulfanil turşusunu 5 ml qatı HCl -da həll edib həcmi su ilə 50 ml-ə çatdırmalı. Məhlul davamlıdır.
 - 2) 5 q NaNO₂ (natrium nitrit) 95 ml suda həll edilir. Bu məhlulu iş günü hazırlayırlar. İşdən qabaq 1 və 2-ci məhlulu 15 dəqiqə buzda saxlamaq lazımdır. Ayrıca götürülmüş 100 ml-lik ölçü kolbasını soyudub oraya 0,3 ml 1-ci məhlul (sulfanil turşusu) və 5 ml 2-ci məhlul (NaNO₂) götürüb ölçü kolbasını 5-10 dəqiqə buza yerləşdirməli. Kolbaya bir daha 1,2 ml 2-ci məhluldan əlavə edib soyuq distillə

suyu ilə həcmi 100 ml-ə çatdırmalı. İş zamanı məhlul buzda olmalıdır və o bir sutka ərzində yararlı ola bilər.

11. *Milion reaktiv* - İstiyə davamlı kolbaya çəki hesabı ilə bir hissə civə və iki hissə azot turşusu (HNO_3) götürüb soyuq şəraitdə onları həll etmək və prosesin sonunda reaksiyon qarışığı su hamamında ($37^\circ\text{-}40^\circ\text{C}$) tam həll olana qədər qızdırmaqla alınan HgNO_3 həcmi iki miqdarı qədər su ilə durulaşdırılır. Bir qədər sonra çöküntünü qarışdırmamaq şərti ilə şəffaf hissəni digər qaba boşaldıb işlətmək olar.
12. 0,5 q fenolftalein kimyəvi stəkana kecirilir və həcmi 100 ml-ə çatana qədər üzərinə etil spirti tökülür. Bir qədər qızdırılır və hazır indikator xüsusi indikator qabına tökülür. Indikator tıxac vasitəsilə içərisinə rezin borulu kiçik pipetka keçirilmiş qaba da töküle bilər.
13. *Universal indikator* - 500 ml etanolda 0,1 q göy bromtimol, 0,1 q metil qırmızı, 0,1 q α -naftolftalein, 0,1 q timolftalein və 0,1 q fenolftalein həll edilir.
14. *Doymuş NaCl məhlulu* - 30 q NaCl 100 ml suda həll edilir və 10 %-li NaOH-la çökdürülür. Bu yolla alınmış doymuş məhlulda hazırlanan 1 %-li nişasta uzun müddət qalır.
15. *Duzlaşdırma reaksiyaları üçün zülal məhlulu* - 3 yumurta zülalını 700 ml su 300 ml doymuş NaCl məhlulu ilə qarışdırıb bir neçə qat tənzifdən süzmək lazımdır.
16. *Molibden reaktiv* - 7,5 q ammonium-molibdenatı 100 ml suda həll edib xüsusi çəkisi 1,2 olan 32 %-li 100 ml HNO_3 -ü üzərinə əlavə etməli, HNO_3 əlavə edildikdən sonra ammonium-molibdenat tam həll olur.
17. *1 %-li nişasta* - az miqdarda (5 ml) distillə suyunda 1 q nişastanı qarışdırıb təzəcə qaynara düşmüş 95-100 ml suya tökə-tökə şüşə cubuqla nişastanın su ilə qarışmasını təmin etmək lazımdır. Sonra dərhal qaynayan kimyəvi stəkani kənara qoyurlar.
18. *Lyuqol reaktiv* - 2,5 q kalium yodu (KJ) 30 ml suda həll edib oraya 1 q kristallik yod əlavə edirik. Məhlulu qarışdırmaqla J-u həll edib onun həcmi 100 ml-ə çatdırmalı.
19. *Süd-asetat qarışığı* -əvvəlcə asetat buferi hazırlanır: a) 1 l suya 40 q NaOH hesabı ilə lazımı miqdarda 1 normal qələvi məhlulu hazırlamalı; b) 1 l suya 57,2 ml buzlu sirkə turşusu hesabına uyğun lazımı miqdarda 1 normal sirkə turşusu hazırlamalı. pH-ı 4,7 olan bufer məhlulunu almaq üçün 50 ml a, 96,8 ml b, məhlulunu qarışdırıb həcmi 0,5 l-ə çatdırmalı. 35-ci işdə nəzərdə tutulan pH-ı 5,0 olan bufer məhlulunu almaq üçün 5 ml a məhlulunu 7,34 ml b məhlulu ilə qarışdırılıb həcmi 50 ml-ə çatdırılır. Süd-asetat qarışığını almaq üçün isə pH-ı 5,0 olan məhlulun (bufer) eyni miqdarı həmin miqdar südlə qarışdırılır.
20. *pH-ı 4,6 olan asetat buferi* hazırlamaq üçün 480 ml 0,2 N natrium asetat və 520 ml 0,2 N sirkə turşusunu qarışdırmaq lazımdır.
21. *2%-li naftorezorsin (spirtde)* 2 q kristallik naftorezorsini 100 ml 96 %-li etanolda həll edib tünd rəngli qabda saxlamaq lazımdır.
22. *Selivanov reaktiv* - 50 ml qatı HCl -u 50 ml distillə suyu vasitəsilə durulaşdırıb orada 100 mq kristallik rezorsini həll etməklə alınır.
23. *Felinq II mayesi* - 200 q seqnet duzu və 150 q NaOH oda davamlı litrik cini qabda qarışdırılıb distillə suyunu tədricən əlavə edərək bütün kütlə həll edilir. Məhlul soyudulur və həcmi 1 litrə su ilə çatdırılır.
24. *Nilander reaktiv* - 2 q $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ və 4 q seqnet duzu qaynar su hamamı vasitəsilə 10 %-li NaOH məhlulunda həll edilir. Məhlulu soyudub çöküntüden ayırmaq üçün süzülür.
25. *Lyuqol reaktiv* - 100 ml suda əvvəlcə 20 q KJ, sonra isə 10 q kristallik I_2 həll edilir. Alınan məhluldan iş zamanı (nişasta ilə işlədikdə) müvafiq miqdar 5 dəfə su ilə durulaşdırılır.
26. *Mədə şirəsi (normal)* - 1,7 l suya 37 q NaCl, 7 ml qatı HCl, 2 ml qatı süd turşusu və 12 q pepton götürülür. Mədə şirəsini belə də hazırlamaq olar. Mədənin selikli qişasını

- 37°C temperaturu fizioloji məhlulla yuyub ət maşınından keçirdikdən sonra üzərinə alınan həcmə uyğun 0,4 %-li HCl tökürük. Bir sutkadan sonra məhlul qatlı kağız filtdən süzülür. Satışda olan pepsin preparatından da istifadə etmək olar. Bunun üçün preparatın 1 q-ı 1 l 0,2 %-li HCl-da həll edilir və bir necə saatdan sonra süzülür.
27. *Hiposulfid* - fiksanaldan hazırlanır (0,1 N) fiksanal olmadıqda çəki üsulu ilə 0,1 N (bəzi halda iş üçün 0,005 N hiposulfid əlverişlidir). Hiposulfid hazırlayıb iş zamanı hər dəfə titri KJO_3 -lə yoxlanılır. Bunun üçün 0,3567 q tam qurudulmuş KJO_3 analitik tərəzidə çəkilib 2 litrlik ölçü kolbasında iki dəfə qovulmuş distillə suyu ilə (bidistillyat) həll edilir, 0,005 N KJO_3 alınır. Kolbanın həcmi 2 litrə çatdırılır. Hiposulfidin titrini yoxlamaq üçün 2 ml KJO_3 məhluluna 2 ml 3 %-li 3 qat xlorosinkiyod məhlulu əlavə edilir (27 A) sonra 2 damla 1 %-li nişasta əlavə etdikdə J_2 ayrılır. Ayrılan J_2 hiposulfidə titrlənir.
27. A. *Xlorosinkiyod 3 qat məhlulu*. 50 q sink sulfat və 250 q NaCl 1 litrlik kolbada həll edilir, su ilə ölçüyə çatdırılır və süzülür. Məhlulu işlədərkən alınmış həcmdə 2,5 q KJ həll edilir.
28. *Standart tiamin məhlulu* - 10 mq tiamin 50 ml 0,1 N HCl -da həll edilib qarışdırılır. Həmin məhlulla 100 ml-ə çatdırılır. 100 mq/ml işlədikdə yuxarıdakı əsas məhluldan 10 ml götürüb 0,1 N HCl -la 100 ml-ə çatdırılır (10 mq/ml).
29. *pH-ı 6,0 və 8,3 olan su ilə doydurulmuş fenol* - hər 100 ml təzə qovulmuş, rəngsiz, mülayim fenola 25 ml su əlavə edib itməyən bulanıq əmələ gələnə qədər çalxalamalı. pH=6,0 almaq üçün 50 ml fenol üzərinə 0,1 ml 2 N KOH (11,2 q KOH-ı suda həll edib həcmi 100 ml-ə çatdırmalı); pH=8,3 almaq üçün isə 50 ml fenola 7,5 ml 2 N KOH əlavə etməli.
30. *NaCl – (natrium xlorid)* 5,0 M; 4,0 M; 0,14 M; 5 %; 0,1 M; müvafiq olaraq 29,25 q; 24,2 q; 830 mq; 5,0 q; 585 mq NaCl 100 ml-lik ölçü kolbasında həll edilib həcmi su ilə ölçüyə çatdırılır.
31. *Tərkibində 1 l-də 0,05 M kalium sitrat olan 0,14 M NaCl* - 1,53 q susuz kalium sitrat 100 ml ölçü kolbasında 0,14 M NaCl -da həll edilib həmin məhlulla (NaCl) ölçüyə çatdırılır.
32. *pH-ı 8,3 olan 1 l-də 0,3 p-aminosalisil turşusu olan su ilə doymuş fenol* - 4,6 q p-aminosalisil turşusu pH-ı 8,3 (29-a bax) olan fenolda həll edilib həmin məhlulla ölçüyə çatdırılır.
33. *0,15 M NaCl , 0,15 M $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (natrium sitrat), 0,01 M $Na_2H_2C_{10}H_{12}O_8N_2$ (EDTA - natrium etilen diamino-tetraasetat)* - 336 mq-0,336 q EDTA 100 ml-lik ölçü kol-basında pH qiymətinə nəzarət etməklə həll edilir, pH 8,0-ə çatdırılır, sonra həmin həcmdə 0,877 q NaCl və 4,411 q natrium sitratı həll edib, məhlulun həmini 100 ml-ə çatdırmalı.
34. *Xloroform:izoamil spirti 24:1* - xloroformun ($CHCl_3$) hər 24 ml-nə 1 ml izoamilspirti - $(CH_3)_2CH-CH_2-CH_2OH$ əlavə edib qarışığı yaxşı qarışdırmaq və təzə halda istifadə etmək lazımdır (cox qaldıqda məhlullar ayrılır).
35. *Etanol:efir 1:1* - etil spirtinin (etanol) hər 10 ml-nə (C_2H_5OH - 96 %-li) 10 ml dietil efiri ($C_2H_5OC_2H_5$) töküüb yaxşı qarışdırmalı.
36. *70 %-li etil spirti* - 96 %-li etanolun hər 70 ml-nə 26 ml su tökməklə alınır.
37. *Xlor turşusu* ($HClO_4$) 2 %, 5 %, 20 %, 57%, 0,5 N məhlulları - qatı xlor turşusundan ($p=1,67$) 66,77 %-li
- 2 % - 1,7 ml $HClO_4$ +97 ml su
 - 5 % - 4,3 ml $HClO_4$ +93 ml su
 - 20 % - 17 ml $HClO_4$ +71,5 ml su
 - 57 % - 45,9 ml $HClO_4$ +18,3 ml su

0,5 N - 0,23 ml HClO_4 + su - 10 ml-ə çatdırmalı.

38. 1,0 N; 0,5 N; 0,01 N; 0,4 %, 1,0 %, 10 %-li NaOH 1,0 N 4,0 q NaOH-ı suda həll edib - 100 ml-ə çatdırmalı.

0,5 N - 2,0 q NaOH-ı suda həll edib 100 ml-ə çatdırmalı.

0,01 N - 40 mq NaOH-ı suda həll edib 100 ml-ə çatdırmalı.

0,4 % - 400 mq NaOH 100 ml suda həll edilir.

1 % - 1,0 q NaOH + 99 ml su.

10 % - 10,0 q NaOH + 90 ml su.

39. 1,0 N 5,0 N KOH - 1 N - 5,6 KOH 100 ml-lik kolbada həll edilib su ilə ölçüyə çatdırılır. 5,0 N - 28,0 q KOH - 100 ml-lik kolbada həll edilib su ilə ölçüyə çatdırılır.

40. *Natrium dodesilsulfat* - $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ 20% - 20 q duz 80 ml suda həll edilir.

41. *5,0 M natrium xlor* - 58,5 q NaCl-u suda həll edib həcmi 1,0 litrə çatdırılır (və ya 5,85 q NaCl - 100 ml-ə çatdırılır).

42. *Difenilamin reaktiv* (Dişə reaktiv) - spirtdən iki dəfə yenidən kristallaşdırılmış 500 mq difenilamin, 50 ml buzlu sirkə turşusunda tam həll edildikdən sonra oraya 1,4 ml qatı sirkə turşusu əlavə edilir.

43. *20 %-li sirkə turşusunda doymuş NaCl məhlulu* - 20 ml qatı sirkə turşusu (99,9 %) 80 ml su ilə qarışdırılıb məhlul doyana qədər orada NaCl hissə-hissə həll edilir.

44. *Orsin reaktiv* - 50 ml 30 %-li HCl-da (hər 10 ml qatı HCl-a 1,6 ml su tökməklə - yəni 50 ml üçün 8,0 ml su) 100 mq orsini həll edib oraya 50 mq FeCl_3 (xlorlu dəmir) əlavə edilir.

45. *pH-ı 4,5 olan buzlu sirkə turşulu 50 %-li etanol*. Hər 50 ml 96 %-li etil spirtinə 46 ml su töküüb pH-ı sirkə turşusu vasitəsilə pH-metrlə nəzarət şəraitində 4,5-ə çatdırmalı.

46. *3:1 nisbətində etanol, dietil efiri* - 96 %-li etil spirtinin hər 30 ml-nə 10 ml dietil efiri əlavə edib, yaxşı qarışdırmaqla alınır.

47. *1 %-li natrium sitrat* (üçqatəvəzədilmiş) - 1 q natrium sitrat 99 ml suda həll edilir.

İMMUNOLOGİYA BƏHSİNƏ AİD

ƏLAVƏLƏR

1. Bufer məhlulları: tərkibi və hazırlanması.

- Fosfat bufer məhlulu (FBM): 0,1M; pH 7,4

NaCl – 8 q; NaCl – 8 q;

Na₂HPO₄·12H₂O – 2,8 q; Na₂HPO₄·12H₂O – 2,9 q;

KH₂PO₄ – 0,2 q; NaH₂PO₄ – 0,2 q;

KCl – 0,2 q.

1 l distillə suyunda həll edirlər. Bufer məhlulunun 1 l-nə 0,5 ml tvin 20 (həcmə görə 0,05%) əlavə edirlər.

- Karbonat-bikarbonat bufer məhlulu (KBM):0,2M; pH 9,5

Na₂CO₃ – 21,2 q 1 l distillə suyunda həll olunur;

NaHCO₃ – 16,8 q 1 l distillə suyunda həll olunur.

Sensibilizasiya üçün 4 ml karbonat məhlulunu və 8,5 ml bikarbonat məhlulunu qarışdırırlar və alınmış məhlulun həcmi distillə suyu ilə 50 ml-ə qədər çatdırırlar; pH-ı yoxlayırlar və ehtiyac duyulduqda lazımi qiymətə qədər çatdırırlar.

1 l natrium bikarbonat məhluluna Na₂CO₃ məhlulunu əlavə edirlər və pH-ı 9,5-ə qədər çatdırırlar.

- Sitrat (substrat) bufer məhlulu: 0,15M; pH 5,0

A məhlulu – Na₂HPO₄·12H₂O, 35,8 q/l;

B məhlulu – limon turşusu, 21,09 q/l.

5,5 ml A məhluluna 5 ml B məhlulu və 10 ml su əlavə edirlər.

2. Substrat qarışığı (bilavasitə istifadədən əvvəl hazırlanmalıdır): 10 ml sitrat buferində 3,4 mq orto-fenilendiamindihidrokloridi (OFD) həll edirlər və 5 ml 30%-li hidrogen peroksidi məhlulunu H₂O₂ əlavə edirlər.

3. Rəngli fermentativ reaksiyanı dayandıran məhlul – H₂SO₄ (2mol/l): 177,8 ml suya ehtiyatla 22,2 ml qatı sulfat turşusu əlavə etmək lazımdır.

4. Ammonium sulfatın doymuş məhlulu (qabaqcadan hazırlanır, 1 l qızdırılmış distillə suyunda 1 kq-dan az olmamaq şərti ilə (NH₄)₂SO₄ həll edirlər, soyudurlar və pH-ı neytral qiymətlərə qədər çatdırırlar).

5. Fosfat-duz bufer məhlulunun hazırlanması (FDB).

1. 8q NaCl, 2,9 q $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 q $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 l distillə suda həll edirlər.
2. Ehtiyac duyulduqda tvin-20 q/ion deterqentini 0,5 %-ə qədər əlavə edirlər.
3. Ehtiyac duyulduqda jelatini 3%-ə qədər əlavə edirlər və su hamamında qızdırmaqla həll edirlər.

6. Tris-HCl bufer məhlullarının hazırlanması.

1. 1M tris məhlulunu hazırlayırlar: 121 q tris(hidroksietil) aminometanı 500 ml distillə suda həll edirlər.
2. 1M HCl məhlulu vasitəsilə pH-metrin nəzarəti ilə pH-ı lazım olan nöqtəyə çatdırırlar.
3. Tris-HCl-un həcmi 1 l-ə qədər çatdırırlar.
4. Bilavasitə istifadədən qabaq qatılığı distillə suyu ilə müəyyən qiymətə çatdırırlar.
5. Ehtiyac duyulduqda molyarlığın müəyyən qiymətinə çatdırmaq məqsədilə NaCl əlavə edirlər.

7. Natrium-fosfat bufer məhlullarının hazırlanması.

1. 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ məhlulunu hazırlayırlar: 1 l distillə suda 35,8 q duz həll edirlər.
2. 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ məhlulunu hazırlayırlar: 1 l distillə suda 15,6 q duz həll edirlər.
3. 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ və $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ məhlullarını qarışdıraraq pH-metrin nəzarəti ilə pH-ı müəyyən qiymətə çatdırırlar.

8. Sitrat bufer məhlulunun hazırlanması (pH 3,5).

1. 100 mM limon turşusu məhlulunu hazırlayırlar: 1 l distillə suda 21,01 q turşu həll edirlər.
2. 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ məhlulunu hazırlayırlar: 1 l distillə suda 35,8 q duz həll edirlər.
3. 100 mM limon turşusu məhluluna 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ məhlulunu əlavə etməklə pH-ı 3,5-ə çatdırırlar.

9. kumassi mavi R250 məhlulu (Sigma, ABŞ, № B 7920) – (0,1%-li kumassi mavi, 40%-li etanol, 10%-li sirkə turşusu, məhlullar distillə suyunda hazırlanır);

10. şəffaflaşdırıcı məhlul – 12%-li etanol, 7%-li sirkə turşusu, məhlullar distillə suyunda hazırlanır.

11. Keçirilmə üçün bufer məhlulu (0,5 l üçün):

- tris – 2,91 q;

- qlisin – 1,465 q;
- natrium dodesilsulfat – 0,1875 q;
- metanol – 100 ml.

12. Qıtıgotu peroksidazası üçün substrat-bufer məhlulu (bilavasitə istifadədən əvvəl hazırlanmalıdır; saxlamaq olmaz):

1. 18 mq 1-xlor-4-naftolu 1 ml metanolda həll edirlər;
2. FDB əlavə edərək 24 ml-ə qədər çatdırırlar;
3. 50 mkl hidrogen peroksidi əlavə edirlər.

ƏDƏBİYYAT

1. Quliyev A.Ə., Həsənov T.H. – Bioloji kimyadan praktikum, Azərbaycan Dövlət Universitetinin nəşri, Bakı, 1976.
2. Quliyev A.Ə., Həsənov T.H., Güləhmədov S.Q. Bioloji kimya (statika). Bakı, 2004.
3. Добрынина В.И., Сывешникова Е.АК. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. Изд-во «Медицина» М. 1967.
4. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова, Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Изд-во «Колос» М. 1972.
5. Жданов Ю.А., Дорофеев Г.Н., Корольченко Г.А., Богданова Г.В. Практикум по химии углеводов. Изд-во «Высшая школа» М. 1973.
6. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жданов В.А. Справочник по биохимии. Изд-во «Наукова думка» Киев, 1971.
7. Кондратьева И.А., Воробьева Н.В., Буракова О.В. Практикум по иммунологии. Изд-во МГУ 2001, 224 с.
8. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. Изд-во «Высшая школа» Минск, 1972.
9. Кулиев А.А. Практикум по биохимии и молекулярной биологии Изд-во «Маариф», Баку. 1993.
10. Ленинджер А. Основы биохимии. Перевод с английского. М. 1985.
11. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родугиль В. Биохимия человека. Перевод с англ. Изд-во «Мир» М. 1993.
12. Назаренко Г.И., Кишкун А.А., Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. «Медицина», Москва, 2000, 540 с.
13. Основы биохимии под ред. А.А.Анисимова Изд-во «Высшая школа» М., 1986.
14. Плешков Б.П. Практикум по биологической химии растений Изд-во «Колос» М. 1976.
15. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии под ред. Т.Т.Березова. М. «Медицина». 1976.
16. Степанов В.М. Молекулярная биология под ред. А.С.Спирина М. «Высшая школа». 1996.
17. Таточеснко В.К., Озерецковский Н.А., Иммунопрофилактика-2003 Москва, 2003.
18. Шапиро Д.К., Практикум по биологической химии. Изд-во «Высшая школа» Минск. 1972.
19. Шарпенак А.Г., Конышев В.А. Практикум по биологической химии. Изд-во «Высшая школа» М. 1969.
20. В.Альбертс, Д.Брай, Дж.Льюис. Molecular biology of cell. Garland Publishing, Inc. New-York&London, 1216 pp., 1989.
21. R.Reed, D.Holmes, J.Weyers, A.Jones. Practical Skills in Biomolecular Sciences. Pearson Education, 538 pp., 2003.
22. I.Royt, J.Brostoff, D.Mail. Immunology. Mosby, 480 pp., 2001.

МЎНДЯРИСАТ

МЎҚЯДДИМЯ	3
Ы. ЩИССЯ. ВЮКИМЯ	
I ВЮЛМЯ. ЗЦЛЛАР ВЯ АМИН ТУРШУЛАРЫ.....	5
<i>Amin turshularы</i>	
Иш 1. Рянгли реаксиялар. α -амин групунун ашкар едилмяси.....	12
Иш 2. Formoltitrлямя.....	13
Иш 3. Амин туршularityнын хелат ямяля гятирмяси.....	14
Иш 4. Нингидринля реаксия	16
Иш 5. Виурет реаксиясы.....	18
<i>Ауры-ауры amin turshularы вя onларын daxil oldуи zцllar ццц сясиууяви кευфууят реаксиялары</i>	
Иш 6. Аргинин ццц Sakaqчи реаксиясы.....	21
Иш 7. Тяркибиня (С) daxil olan амин туршularityнын тцшахидя едилмяси.	23
Иш 8. Qисинин тцшахидя едилмяси.....	24
Иш 9. Prolинин тцшахидя едилмяси.....	25
Иш 10. Триптофанын тцшахидя едилмяси.....	27
А. Адамкевиъ реаксиясы.....	28
В. Норкинс-Kole реаксиясы.....	29
Ъ. Шулс-Raspayl реаксиясы.....	29
Иш 11. Vuazene реаксиясы.....	30
Иш 12. Pauli реаксиясы.....	31
Иш 13. Kсантопротеин реаксиясы.....	33
Иш 14. Millon реаксиясы.....	35
Иш 15. Зцлалын гидролизи.....	36
Иш 16. Амин туршularityнын хроматография цсulu иля тяуини.....	38
Иш 17. Амин туршularity мяhlullарынын рН-нын тяуини.....	40
Иш 18. Амин туршularityнын амфотерлиуи.....	42
Иш 19. Амин туршularityнын fluoessensиясы.....	43
Иш 20. Зцлларын физики-китуюви хассяляги . Зцлалын hяll olma qабилууяти.....	44
Иш 21. Диализ.....	45
Иш 22. Оксигемоглобин кристалларынын алынмасы.....	46
Зцлларын чюкдцртя реаксиялары.....	47
Иш 23. Зцлларын qаунатма yolu иля чюкдцрцлмяси.....	49
Иш 24. Зцлалын чюкмясиня рН-ын тясиги.....	50
Иш 25. Зцлларын duzлашдырма yolu иля чюкдцрцлмяси.....	51
Иш 26. Зцлларын аьыр metal duzлары иля чюкдцрцлмяси.....	53
Иш 27. Зцлларын qаты минерал туршularla чюкдцрцлмяси.....	54
Иш 28. Цзви туршularla зцлларын чюкдцрцлмяси.....	55

Иш 29. Цзви һялледисиягя зцлалып чюкдцрцлмяси.....	56
Иш 30. Alkolloid реактивляги иля зцлалып чюкдцрцлмяси..	57
Иш 31. Зцлаларын fenolla юкдцрцлмяси.....	58
Иш 32. Кирби-Georgиуев цсulu иля RNT вя DNT-нип алынмасы.....	59
Иш 32а. Marmura цсulu иля NT-нын аугылмасы вя тямизлянмяси (DNT вя RNT-ни виг-вигиндяп айырма).....	63
<i>Мцряккяб зцлалар (proteudляр) fosfoproteudляр</i>	
Иш 33. Сцддян kazeиногенип аугылмасы.....	67
Иш 33а. Kazeиноген (вя уа kazeин дянялягиндя) fosfatын тцшаһидя едилмяси.....	68
<i>Glukoproteudляр</i>	
Иш 34. Yumurta зцлалында шякяр компонентинип ашкар едилмяси.....	70
Иш 34а. Тцрцрсякдяп musинип аугылмасы вя шякяр компонентинип ашкар едилмяси.....	70
I Вюлмяуя аид суаллар.....	71
II БЮЛМЯ. FERMENTЛЯР.....	72
<i>Fermentлярин хассялары</i>	
Иш 35. Амилаза вя пепсин fermentлягинип температур optimumунун тцшаһидя едилмяси.....	74
Иш 36. Мцһит реаксиясынын (рН) fermentин активлиуиня тясиги.....	77
Иш 37. Katalaza активлиуинип тясуипи.....	78
Иш 38. Peroksидазанын активлиуинип тясуипи.....	80
Иш 39. Askорбинатоксидазанын активлиуинип тясуипи.....	81
Иш 40. Липазанын активлиуинип тясуипи.....	83
лл Бюлмяйя аид суашлар	85
ЫЫЫ БЮЛМЯ. KАРВОНИДРАТЛАР.....	86
Иш 41. Monozalara аид реаксиялар. Podobedov-Молиш реаксиясы (α -наftolla реаксия).....	87
Иш 42. Tollens нцмняси.....	89
Иш 43. Ketoheksozalara тяхsus Selivanov реаксиясы.....	91
Иш 44. Карбоһидратларын карбамидля кеуфиууят реаксиясы.....	92
Иш 45. Pentozаларын тцшаһидя едилмяси (Виал реаксиясы).....	93
Иш 46. Floroqlцсинля реаксия.....	94
Иш 47. Furfurolun тцшаһидя едилмяси.....	95

тяхsus reaksiyalar

Иш 48. Шякяргягин reduksiyaetмя qabiliyyati.....	97
Иш 49. Disaxaridляр.....	101
Иш 50. Мцряккяб шякяргяг (икипси дягясли полиозалар).....	104
Иш 51. Sady шякяргягин fенилhidразин сынаы иля ашкаг edilmяси.....	107
Иш 52. Qысқыгма нцминяси.....	110
Иш 53. Qысқыгма prosesинин флцог ионлары иля tormozlanмасы.....	113
Иш 54. Шякяргягин мцбадиляси.....	115
Иш 55. Шякяг мцбадилясинин аралыг вя son мяхsулларынын тяуини (язяля екстрактында сцд туршусунун мцшахидя edilmяси). Uffelman нцминяси.....	119
Иш 56. Qlikолиз заманы сцд туршусунун ятяля гялмяси.....	119
Иш 57. Sidикдя ригоццм туршусунун миқdarca тяуини.....	122
Иш 58. Qanda шякягин миқdarca тяуини Хаqedorn –Йensen цsulu.....	124
Иш 59. Bertran цsulu (Maken-Шoorla гюря модификасиya).....	
Иш 60. Шякяргягин микрoкитюяви цsulla тяуини.....	129
Иш 61. Vilштetter вя Шedel цsulu иля aldozalarын миқdarca тяуини.....	131
Иш 62. Шякяргягин хроматографийасы (аналитик цsullar).....	132
Иш 63. Шякяргягин nazик qatлы хроматографийасы.....	135
III Бюлтяйя аид suallar.....	141
	146
IV БЮЛМЯ. ЛИПИДЛЯР.....	
Иш 64. Липидлягя аид тясцбляг.....	148
Иш 65. Йаь яядлягинин тяуини.....	150
Иш 66. Йаьларын вихромат цsulu иля тяуини (Микро цsul).....	152
IV Бюлтяюя аид suallar.....	155
	156
V БЮЛМЯ. ВИТАМИНЛЯР ВЯ ONLARЫН ТЯУИНИ.....	
	157

Suda hяll olan vitaminляр

Иш 67. C витамининин (askorbin туршusu) тяуини.....	
Иш 68. B ₁ витамининин (тиамин) тяуини.....	158
Иш 69. B ₂ витамининин (riboflavin) тяуини.....	161
Иш 70. B ₆ витамининин мцяууяг olunмасы.....	165
Иш 71. B ₁₂ витамининин (сианокобаламин) мцяууяг olunмасы.....	167
Иш 72. PP витамининин (никотин туршusu) тяуини.....	168
	169

Yаьda hяll olan vitaminляр

Иш 73. A витамининин (retinol) тяуини.....	
Иш 74. E витамининин (tokoferol) тяуини.....	171
Иш 75. K ₁ витамининин тяуини.....	174
V Бюлтяюя аид suallar.....	176

2 ЩИССЯ. ИММУНОЛОЗИЯ

ВЫ БЮЛМЯ. ТЯЪРЦБИ МОДЕЛЛЯР (ЩЕЙВАНЛАРЛА ИШЛЯМЯ ЦСУЛЛАРЫ)	
<i>Сичанлара антизенин йеридилмяси цсуллары</i>	179
Иш 76. Венадахили йеридилмя	
Иш 77. Перитондахили йеридилмя	
Иш 78. Дяриалты йеридилмя	183
	184
<i>Сичанлардан иммун системи органларынын</i>	185
<i>вя щцъейряляринин айрылмасы</i>	
Иш 79. Сцмцк илийиндян щцъейрялярин айрылмасы	
Иш 80. Тимусдан Т-щцъейрялярин айрылмасы.....	
	187
<i>Сичан вя довшанлардан ганын алынмасы</i>	188
Иш 81. Саьлам сичанлардан ганын эютцрцлмяси	
Иш 82. Цмуми ганын эютцрцлмяси	
Иш 83. Довшандан ганын эютцрцлмяси	189
Иш 84. Щцъейря суспензийаларынын щазырланмасы	191
Иш 85. Горйайев камерасында щцъейрялярин сайылмасы	193
Иш 86. Антизярдабларын алынмасы	194
	195
<i>Иммун вя толерант сичанларын алынмасы</i>	198
Иш 87. Илкин иммун ъавабын алынмасы	
Иш 88. Икинџили иммун ъавабын алынмасы	
Иш 89. Толерант сичанларын алынмасы	200
ВЫ Бюлмяйя аид суаллар	201
	201
ВЫЫ БЮЛМЯ. ИММУНОФЕРМЕНТ АНАЛИЗИ	202
Иш 90. ИФА-нын апарылма схеми	
Иш 91. Васитяли ИФА-нын апарылмасы	203
ВЫЫ Бюлмяйя аид суаллар	211
	212
ВЫЫЫ БЮЛМЯ. ИММУНОГЛОБУЛИНЛЯР: ОНЛАРЫН	217
АЙРЫЛМАСЫ ВЯ АНАЛИЗИ	
Иш 92. Иммунизя олунмуш довшанын ган зярдабындан глобулин фраксийасынын айрылмасы. Ган зярдабы зцлалларынын дүзлашдырма иля фраксийалара айрылмасы ...	218
<i>Иммуноглобулинлярин хроматографик цсулла айрылмасы</i>	219
Иш 93. Ионмцбадия хроматография цсулу васитясия иммунизя олунмуш довшанын ган зярдабынын глобулин фраксийасындан ИЭЭ-фраксийасынын алынмасы	
Иш 94. Зцлал-А-сефарозада апарылан аффин хроматография цсулу иля сичандан ИЭЭ-нин айрылмасы	224

Иш 95. Иммуноглобулинлярин протеолитик парчаланмасы	230
Иш 96. Сичанын ИЭЭ-нин абыр вя йцнэцл зянъирляринин алынмасы. Молекулларын юлчцляриня эюря фраксийалашдырылма	233
	235
<i>Иммуноглобулинлярин юр्यानлмясиндя електрофоретик цсулларын истифадяси</i>	
Иш 97. Иммуноглобулинлярин анализи мягсядия натриум додесилсульфатын иштиракы иля полиакриламид эелиндя апарылан електрофорез	
Иш 98. Иммуноблотинг	241
ВЫЫЫ Бюлмяйя аид суаллар	249
	255
Биокимйа бящсиня аид ялавяляр	
Иммунолоэийа бящсиня аид ялавяляр	256
Истифадя олунан ядвябиууат.....	263
	266

Сядня 10

Фейнq мяhlulu кyтyяyля шyкyягyгн нyстy тyуны

0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ -цп нyсты, ml -ля	мыс, мq- ла	гlцкоза, мq	фруктоза, мq	галактоза, мq	манноза, мq	арабыноза. мq	ксылloза, мq	рамноза, мq
1	6,4	3,2 3,1	3,2 3,2	3,6 3,4	3,1 3,2	3,0 3,0	3,1 3,2	3,2 3,3
2	12,7	6,3 3,1	6,4 3,3	7,0 3,4	6,3 3,2	6,0 3,2	6,3 3,2	6,5 3,4
3	19,1	9,4 3,2	9,7 3,3	10,4 3,6	9,5 3,3	9,2 3,1	9,5 3,3	9,9 3,4
4	25,4	12,6 3,3	13,0 3,4	14,0 3,5	12,8 3,3	12,3 3,2	12,8 3,3	13,3 3,5
5	32,8	15,9 3,3	16,4 3,6	17,5 3,6	16,1 3,3	15,5 3,2	16,1 3,3	16,8 3,4
6	38,12	19,2 3,2	20,0 3,7	21,1 3,6	19,4 3,4	18,7 3,2	19,4 3,4	20,2 3,5
7	44,5	22,4 3,2	23,7 3,7	24,7 3,6	22,8 3,4	21,9 3,3	22,8 3,4	23,7 3,5
8	50,9	25,6 3,3	27,4 3,7	28,3 3,7	26,2 3,4	25,2 3,4	26,2 3,4	27,2 3,6
9	57,3	28,9 3,4	31,8 3,8	32,0 3,7	29,6 3,4	28,6 3,4	29,6 3,4	30,8 3,6
10	63,6	32,3 3,4	34,9 3,8	35,7 3,7	33,0 3,5	32,0 3,4	33,0 3,5	34,4 3,6
11	70,0	38,7 3,3	38,7 3,7	39,4 3,7	36,5 3,5	35,4 3,4	36,5 3,5	38,0 3,6
12	76,3	39,0 3,4	42,4 3,8	43,1 3,7	40,0 3,5	38,8 3,4	40,0 3,5	41,6 3,6

13	82,7	42,2	3,4	46,2	3,8	46,8	3,7	43,5	3,5	42,2	3,4	53,5	3,5	45,2	3,6
----	------	------	-----	------	-----	------	-----	------	-----	------	-----	------	-----	------	-----

Сядвјя 10-ун арды

0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃ -цн һясти, ml -ля	мис, мг- ла	глицкоза, мг	фруктоза, мг	галактоза, мг	манноза, мг	арабиноза, мг	ксилоза, мг	рамноза, мг							
14	89,1	45,8	50,0	50,5	47,0	45,6	47,0	48,8	3,6						
15	95,4	49,3	3,5	53,7	3,7	54,3	3,8	50,6	3,6	47,0	3,4	50,6	3,6	52,4	3,6
16	101,8	52,8	3,5	57,5	3,8	58,1	3,8	54,2	3,6	52,4	3,4	54,2	3,6	56,0	3,8
17	108,1	56,4	3,5	61,2	3,7	61,9	3,8	57,9	3,7	55,8	3,4	57,9	3,7	59,8	3,7
18	114,4	59,8	3,5	60,0	3,8	65,7	3,8	62,6	3,7	59,3	3,4	62,6	3,7	63,5	3,8
19	120,8	63,3	3,5	68,7	3,7	69,6	3,9	65,3	3,7	62,6	3,5	65,3	3,7	67,3	3,7
20	127,2	66,9	3,6	72,4	3,7	73,4	3,9	69,2	3,9	66,5	3,6	69,2	3,9	71,0	3,8
21	133,5	70,7	3,8	76,2	3,8	77,2	3,8	71,3	3,9	70,2	3,6	73,1	3,9	74,8	3,8
22	139,8	74,5	3,8	80,1	3,9	81,2	4,0	77,0	3,9	74,0	3,7	77,0	3,9	78,6	3,8
23	146,2	78,5	4,0	84,0	3,9	85,1	3,9	81,0	4,0	77,9	3,8	81,0	4,0	82,4	3,8
24	152,6	82,6	4,1	87,8	3,8	89,0	3,9	85,0	4,0	81,8	3,9	85,0	4,0	86,2	3,8
25	159,0	86,6	4,0	91,7	3,9	93,0	4,0	89,0	4,0	85,7	3,9	89,0	4,0	-	-

