

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Հ. Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Է. Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ

**ԷՆԶԻՄՈԼՈԳԻԱՅԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ
ՉԵՌՆԱՐԿ**

**ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2016**

ՀՏԴ 577.15(07)

ԳՄԴ 28.072g7

Կ 294

*Հրապարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիտական խորհուրդը*

Կարապետյան Հ. Մ., Բարսեղյան Է. Խ.

Կ 294 **Էնզիմոլոգիայի ուսումնամեթոդական ձեռնարկ/** Հ. Մ. Կարապետյան, Է. Խ. Բարսեղյան: -Եր., ԵՊՀ հրատ., 2016, 142 էջ:

Ուսումնամեթոդական ձեռնարկի հիմնական նպատակն է էնզիմոլոգիայի բնագավառում կենսաքիմիական հետազոտությունների պրակտիկ մեթոդների հետ ուսանողներին ծանոթացնելը, այդ բնագավառում նրանց տեսական գիտելիքների ամրապնդումը, փորձարարական հմտությունների զարգացումը և գիտական աշխարհայացքի ձևավորումը:

Ձեռնարկում քննարկվում են հետազոտվող կենսաբանական մոլեկուլների պատրաստման հիմնական եղանակները, կենսաբանական հեղուկներում և հյուսվածքներում պարունակվող տարբեր ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրության մեթոդները:

Ձեռնարկը նախատեսված է բակալավրիատի և մագիստրատուրայի հատուկ կուրսերի դասընթացների իրականացման համար:

ՀՏԴ 577.15(07)

ԳՄԴ 28.072g7

ISBN 978-5-8084-2064-9

© ԵՊՀ հրատ., 2016

© Կարապետյան Հ. Մ., 2016

© Բարսեղյան Է. Խ., 2016

ՆԵՐԱՇՈՒԹՅՈՒՆ

Կենսաքիմիան դիմամիկ զարգացող գիտություն է, և հետազոտությունների նոր մեթոդներին տիրապետելու համար ուսանողները պետք է ունակ լինեն յուրացնելու ոչ միայն ժամանակակից և բարձր ճշգրտություն ունեցող սարքավորումների հետ աշխատելու սկզբունքները, այլ նաև կարողանան վերլուծել կենսաքիմիական հետազոտությունների ժամանակ ստացված տվյալները:

Ուսուցման պրոցեսում ձեռքբերվող գիտելիքներն ուսանողների կողմից հաջողությամբ յուրացվում են ակտիվ ինքնուրույն գործունեության արդյունքում: Լաբորատոր աշխատանքների իրականացումն այդպիսի ակտիվ գործունեության կարևորագույն ձևերից մեկն է:

Ներկայացվող ձեռնարկի կազման ընթացքում հեղինակները ձգտել են ընտրել այնպիսի լաբորատոր աշխատանքներ, որոնք ուղղված են ուսումնական ծրագրով նախատեսվող առանձին բաժինների յուրացմանը: Աշխատանքներն ընտրելիս հաշվի են առնվել հետազոտվող նյութի, ռեակտիվների և սարքավորումների հասանելիությունը, աշխատանքների իրականացման հնարավորությունները և տարբեր կենսաբանական օբյեկտների համար հետազոտության ընտրված մեթոդների օգտագործումը:

Ձեռնարկում մանրամասն նկարագրված են փորձարարական տվյալների հավաստիության հաշվարկման մեթոդները, ինչը թույլ կտա խուսափել կենսաքիմիական հետազոտությունների արդյունքների վերլուծման հնարավոր սխալներից:

Ձեռնարկում ուսանողները կծանոթանան տարբեր կենսաքիմիական հետազոտությունների ընթացքում բուսական և կենդանական հյուսվածքների նմուշների նախապատրաստման տարբեր մեթոդներին, աշխատանքներն իրականացնելու ընթացքում կտվորեն հստակ ձևակերպել առաջադրվող խնդիրները և ընտրել դրանց լուծման եղանակները:

Նախքան լաբորատոր աշխատանքների իրականացումը հետազոտվող թեմայի վերաբերյալ բերվում է համառոտ տեսական նյութ: Յու-

րաքանչյուր աշխատանքում նկարագրվում է մեթոդի սկզբունքը, աշխատանքային լուծույթների պատրաստման և լաբորատոր աշխատանքի իրականացման ընթացքը: Աշխատանքի վերջում ուսանողին առաջարկվում է ներկայացնել կատարված հետազոտության հիմնական եզրակացությունները:

Ձեռնարկը նախատեսված է ինչպես բակալավրիատի, այնպես էլ մագիստրատուրայի հատուկ կուրսերի դասընթացների իրականացման համար:

Ձեռնարկը կարող է հետաքրքիր լինել նաև գիտաշխատողների համար, քանի որ այն ներառում է բարդացված առաջադրանքներ՝ նվիրված որոշ ֆերմենտների ակտիվության և հատկությունների ուսումնասիրությանը:

ՔԱԺԻՆ 1

ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ՏԵԽՆԻԿԱՅԻ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ

ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅՈՒՄ

Կենսաքիմիայի լաբորատորիայում ուսումնասիրում են նյութերի որակական և քանակական կազմը՝ կիրառելով տարբեր ֆիզիկաքիմիական մեթոդներ: Հետազոտություններն իրականացվում են սպեկտրաֆոտոմետրիկ, կոնդուկտամետրիկ, պոտենցիամետրիկ և այլ մեթոդների կիրառմամբ: Քիմիական ռեակտիվների և էլեկտրական սարքավորումների հետ աշխատելու ընթացքում ուսանողներից պահանջվում է պահպանել անվտանգության տեխնիկայի որոշակի կանոններ:

1.1. ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ԿԱՆՈՆՆԵՐԻ ՊԸՀՊԱՆՈՒՄԸ ՀՐԱՎՏԱՆԳԵԿ ՀԵՇՏ ԲՈՅԱՎԱՌՎՈՂ ՀԵՂՈՒԿՆԵՐԻ ՀԵՏ ԱՇԽԱՏԵԼԻՍ

Հեշտ բոցավառվող նյութերը պետք է պահել հատուկ այդ նպատակով նախատեսված պահեստարանում և օգտագործել միայն անհրաժեշտության դեպքում:

Արգելվում է լաբորատորիայում պահել օրական պահանջվող քանակից ավելի շատ ծծմբային եթեր, ացետոն, մեթիլ սպիրտ, բենզոլ, տոլուոլ և այլ հեղուկ ածխաջրածիններ, որոնց եռման ջերմաստիճանը ցածր է 150°C-ից:

Մեկ քարշիչ պահարան ունեցող լաբորատոր սենյակում այրվող նյութերի ընդհանուր ծավալը չպետք է գերազանցի 5 լիտր: Այդ նյութերը անհրաժեշտ է պահել հատուկ այդ նպատակով օգտագործվող երկաթյա արկղներում, որոնք տեղադրվում են հատակին, հեշտ հասանելի տեղում, հեռու մուտքի դռնից և տաքացնող մարտկոցներից:

Խստիվ արգելվում է.

- Աշխատանքային սեղանի վրա դնել այրվող նյութեր, եթե միացված է բաց պարույր ունեցող սալիկ:
- Քարշիչ պահարանում թողնել այրվող նյութեր այն ժամանակ, երբ առկա են միացված սարքավորումներ:
- Այրվող հեղուկները պահել 200 մլ-ից ավելի տարողություն ունեցող բարակ պատերով կոլբաներում:
- Հեշտ բոցավառվող հեղուկները պահել ուժեղ օքսիդիչների (ազոտական թթու, բրոմ, ջրածնի պերօքսիդ, նատրիումի պերօքսիդ և սնդիկային արծաթ) մոտ:
- Այրվող նյութերը դատարկել լվացարանի մեջ: Թորված մնուշներից մնացած կեղտոտված լուծիչների մնացորդները անհրաժեշտ է լցնել տեսանելի վայրում տեղադրված և հատուկ այդ նպատակով նախատեսված տարայի մեջ:
- Եթերի հետ աշխատելիս օգտագործել շարժական էլեկտրական լամպեր:

Հեշտ բոցավառվող հեղուկով լցված տարայի վնասման դեպքում անմիջապես անհրաժեշտ է անջատել բոլոր բաց պարույրով տաքացնող սարքերը, միացնել քարշիչ օդափոխությունը և հետագա բոլոր գործողությունները կատարել անհատական պաշտպանության միջոցներով (ռետինե ձեռնոցներ, շնչազտոց կամ հակագազ): Թափված հեղուկի վրա պետք է ցանել ավազ, այնուհետև ավազը և ամանեղենի բեկորները հավաքել ավելով կամ փայտե թիով: Եթե հատակը սալիկապատ է, քարապատ կամ ցեմենտապատ, ապա խստիվ արգելվում է ավազը և ապակեղենի բեկորները հավաքելու նպատակով օգտագործել մետաղական աղբահավաք, քանի որ այդ դեպքում կարող է կայծ առաջանալ և տեղի կունենա պայթյուն:

1.2. ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՀԻՄՔԵՐԻ ՀԵՏ ԱՇԽԱՏԵԼԻՍ

Լաբորատոր աշխատանքների իրականացման ժամանակ հաճախ օգտագործում են խիտ թթուներ և ալկալիներ կամ էլ դրանց լուծույթները: Վերջիններս հայտնվելով մաշկի վրա կարող են առաջացնել ծանր այրվածքներ, իսկ եթե աչքի մեջ՝ տեսողության կորուստ: Այդ իսկ պատճառով խիտ թթուներն ու ալկալիները անհրաժեշտ է պահել քարշիչ պահարանում հաստ պատերով անոթների մեջ: Խիտ թթուները մի անոթից մյուսը դատարկել կարելի է միայն քարշիչ պահարանում, երբ պահարանի դռները գտնվում են ոչ լրիվ բացված վիճակում: Անոթը պետք է պահել շատ զգույշ՝ միաժամանակ բռնելով և՛ վզիկից, և՛ հատակից: Վզիկից ծորացող կաթիլները կարելի է հեռացնել ասբեստի կտորներով, ապա չորացնել թղթով կամ լաթով: Այդպիսի զգուշություն պետք է պահպանել նաև ալկալիների հետ աշխատելիս:

1,51-1,52 տեսակարար կշռով ծխացող ազոտական թթվի, ինչպես նաև օլեումի հետ աշխատելիս բացի ակնոցներից և ռետինե ձեռնոցներից անհրաժեշտ է հագնել պոլիէթիլենային թաղանթից կամ ռետինապատ կտորից կարված երկար գոգնոց:

Խոշոր կտորներով ալկալիների մանրացումը կատարել նախապես դրանք թղթով կամ կտորով ծածկելուց հետո և միայն անհատական պաշտպանության միջոցներով (ակնոցներ և ձեռնոցներ):

Ծծմբական թթուն նոսրացնելու նպատակով պետք է թթուն լցնել ջրի վրա, այլ ոչ թե՝ հակառակը: Անհրաժեշտ է խիստ կերպով հետևել այս կանոնին, քանի որ խիտ ծծմբական թթվի խտությունը ավելի մեծ է, քան ջրի խտությունը և դա է պատճառը, որ թթուն ջրի վրա ավելացնելիս այն տարածվում է անոթի հատակով՝ կանխելով ցայտման առաջացումը: Իսկ ծծմբական թթվի վրա ջուր լցնելիս, ջուրը տարածվում է թթվի մակերեսին՝ ջրի և թթվի հպման տեղում կտրուկ բարձրացնելով ջերմաստիճանը, ինչի հետևանքով թթուն կարող է ցայտել և մաշկի վրա հայտնվելով առաջացնել այրվածքներ:

Խստիվ արգելվում է

- Խիտ թթուները մի անոթից մյուսը լցնելու դեպքում օգտագործել ռետիկն կամ պոլիմերային ռեզինափողրակներ:
- Խիտ թթուները և ալկալիները հավաքել սովորական պիպետով:
- Վակուում-էքսիկատորներում ծծմբական թթուն օգտագործել որպես ջուր խլող միջոց:
- Թթուների և ալկալիների հետ աշխատանքներն իրականացնել առանց պաշտպանական ակնոցների:

1.3. ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ ԷԼԵԿՏՐԱՍԱՐՔԱՎՈՐՈՒՄՆԵՐԻ ՀԵՏ ԱՇԽԱՏՆԵԼԻՍ

Լաբորատոր աշխատանքները կարելի է իրականացնել միայն սարքին վիճակում գտնվող էլեկտրասարքավորումներով: Հոդակցման և հաղորդալարերի թերությունների հայտնաբերման դեպքում անմիջապես հայտնել դասընթացի ղեկավարին:

Խստիվ արգելվում է

- Աշխատել սարքերի և սարքավորումների հոսանք հաղորդող բաց մասերին մոտ:
- Էլեկտրական սարքերի մատույցները ծանրաբեռնել:
- Վարդակների, անջատիչների հաղորդալարերի վրա կախել տարբեր իրեր, հաղորդալարերը ամրացնել պարանով կամ մետաղալարով:
- Փոխարինել վառված նախապահպանակները մետաղալարերի խրճերով:
- Տեղափոխել կամ վերանորոգել միացված վիճակում գտնվող սարքավորումները:
- Առանց դասընթացի ղեկավարի թույլտվության միացնել և անջատել սարքավորումները:

1.4. ԱՌԱՋԻՆ ԲՈՒԺՕԳՆՈՒԹՅՈՒՆ

Առաջին բուժօգնություն ցուցաբերելու նպատակով լաբորատորիայում անհրաժեշտ է ունենալ վիրակապ, բամբակ, յոդի 3%-անոց, բորաքսի 2%-անոց, քացախաքսի 3%-անոց, նատրիումի հիդրոկարբոնատի 3-5%-անոց լուծույթներ, կոլլոդիում կամ ԵՓ-6 սոսինձ:

Ապակիով առաջացած վնասվածքների ժամանակ վերքից պետք է հեռացնել բեկորները, վերքի շուրջը մշակել յոդի լուծույթով և վիրակապել:

Առաջին և երկրորդ աստիճանի այրվածքների դեպքում այրված հատվածին կարելի է ցանել նատրիումի հիդրոկարբոնատ կամ թրջոցներ դնել վերջինիս 2%-անոց կամ կալիումի պերմանգանատի 5%-անոց լուծույթներով: Լավագույն միջոց է համարվում 96% էթիլ սպիրտի թրջոցը, որը միաժամանակ հանդիսանում է նաև վարակազերծող միջոց:

Ավելի ծանր և մեծ մակերեսով այրվածքների դեպքում տուժվածին անհրաժեշտ է տեղափոխել բուժհիմնարկ:

Թթուներից և ալկալիներից առաջացած այրվածքների դեպքում ախտահարված մաշկը անհրաժեշտ է լվանալ մեծ քանակի ջրով, այնուհետև թթվից առաջացած այրվածքի դեպքում վնասված հատվածին դնել նատրիումի հիդրոկարբոնատի 2 %-անոց լուծույթով թրջոց, իսկ ալկալուց առաջացած այրվածքի դեպքում՝ քացախաքսի 3% թույլ (0,5%) լուծույթով թրջոց:

ԲԱԺԻՆ 2

ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՁԵՎԱԿԵՐՊՄԱՆ ԿԱՐԳԸ

Լաբորատոր աշխատանքներն իրականացնելիս անհրաժեշտ է մանրամասն նկարագրել փորձի ընթացքը՝ գրանցելով

1. Մեթոդի սկզբունքը
2. Սարքավորումները
3. Ապակեղենը
4. Ռեակտիվները
5. Աշխատանքային լուծույթների պատրաստումը
6. Տրամաչափական կորի կառուցումը
7. Հետազոտման ընթացքը
8. Հաշվարկի մեթոդը
9. Եզրակացությունները

Աշխատանքի ձևակերպման այսպիսի կարգը թույլ է տալիս ուսանողներին հասկանալ մեթոդի էությունը, ըմբռնել ռեակցիայի մեխանիզմը:

Հետազոտությունների արդյունքների հավաստիությունը բարձրացնելու նպատակով պետք է փորձերը կրկնել, իսկ ստացված տվյալները ենթարկել վիճակագրական մշակման:

Լաբորատոր աշխատանքը համարվում է կատարված միայն եզրակացությունների ձևակերպումից հետո, որոնք ընդգրկում են հետազոտությունների հիմնական արդյունքները, փորձի կատարման ժամանակ դիտվող բոլոր փոփոխությունները և ստացված տվյալների համառոտ վերլուծությունը:

2.1. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՏՎՅԱԼՆԵՐԻ ՀԱՇՎԱՐԿԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Ցանկացած հետազոտության իրականացման ժամանակ ստացվում է իրարից փոքր-ինչ տարբերվող տվյալների շարք, ինչը պայմանավորված է տարբեր պատճառներով: Հիմնականում տարբերում են պարբերական ու պատահական սխալներ և վրիպումներ:

Պարբերական սխալները կարող են ի հայտ գալ սարքավորումների ոչ ճշգրիտ աշխատանքից և ռեակտիվների ոչ մաքուր վիճակից: Այսպիսի սխալները կրկնվում են չափումների ամբողջ շարքի ընթացքում:

Պատահական, միմյանցից անկախ սխալները հարուցվում են անկանխատեսելի և այդ իսկ պատճառով չհսկվող երևույթներով (ռեակտիվների աղտոտումը խառնուրդներով կամ մմուշների աղտոտումը ոչ մաքուր լաբորատոր ապակեղենի օգտագործման հետևանքով):

Պարբերական սխալները կարելի է հայտնաբերել և հասցնել մվագագույնի այն դեպքում, երբ պատահական սխալները դժվարությամբ են վերացվում:

Վրիպումները կապված են հետազոտողի ոչ բավարար ուշադրության հետ, երբ խախտվում են փորձի պայմանները, մմուշները ճիշտ չեն նախապատրաստվում կամ գրանցումները և հաշվարկները հստակ չեն իրականացվում:

Փորձարարական ճանապարհով ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը պետք է կատարել հետևյալ սխեմայով.

ո թվով չափումների արդյունքում ստացված տվյալները կազմում են $X_1, X_2, X_3 \dots X_n$ իրարից տարբերվող մեծությունների շարք և չափումների այդ շարքի համար շեղումների սահմանները (ΔX_i), որոշում են հետևյալ բանաձևով

$$\Delta X_i = X_i - \bar{X},$$

որտեղ X_i - չափումների ժամանակ ստացված տվյալներն են, իսկ $\bar{X}$ - միջին թվաբանականն է, որը որոշվում է հետևյալ բանաձևով

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}:$$

Միջին թվաբանականի արժեքից բոլոր դրական և բացասական շեղումների գումարը պետք է հավասար լինի գրոյի $\sum \Delta X_i = 0$:

Այդ հավասարությունը իրականանում է այնպիսի ճշտությամբ, ինչպիսի ճշտությամբ որոշվում է $\bar{X}$:

ո թվով չափումների արդյունքում ստացված շարքի առանձին անդամները (ընտրությամբ) բնութագրվում են $S_{\bar{X}}$ միջին քառակուսային սխալով կամ $\bar{S}$ ստանդարտ շեղումով:

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{\sum(\Delta x_i)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}:$$

Ընտրված արժեքների թիվը կարող է լինել շատ: Դրանցից յուրաքանչյուրը համարվում է պատահական իր միջին և միջին քառակուսային սխալով՝ $S_{\bar{X}}$

$$S_{\bar{X}} = \frac{\bar{S}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum(\Delta X_i)^2}{n(n-1)}}:$$

Չափումների արդյունքում սխալի շեղումների հաշվարկը կատարվում է հուսալիության աստիճանի՝ α որոշման հիման վրա, այսինքն որոշվում է դեպքերի այն բաժինը, որոնց համար այդ թվով չափումների դեպքում միջին թվաքանակյան արժեքը ընկած է որոշակի սահմաններում: Մեծ մասամբ ընդունվում է $\alpha=0,95$ կամ $0,99$: Սա նշանակում է, որ բոլոր չափումների $95 - 99\%$ ընկած է նշված սահմաններում.

$$\Delta X = \varepsilon_{\alpha,k} = t_{\alpha,k} S_{\bar{X}}$$

$t_{\alpha,k}$ գործակիցը կոչվում է նորմավորված շեղումների գործակից կամ Ստյուդենտի չափանիշ (K): Այդ մեծությունը կարելի է գտնել հատուկ աղյուսակներից՝ կախված α -ի և $K=n-1$ արժեքներից: K մեծությունը կոչվում է ազատության աստիճանի թիվ: $\alpha=0,95$ և $0,99$ արժեքների համար նորմալ շեղման գործակիցները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Նորմալ շեղման գործակիցներ ($t_{\alpha,k}$)

α	K								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,95	4,30	3,18	2,78	2,57	2,45	2,37	2,31	2,26	2,23
0,99	9,93	5,84	4,60	4,03	3,71	3,50	3,36	3,25	3,17

Հաշվարկի վերջում որոշվում է հարաբերական սխալը

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta X}{X} 100\% :$$

Հետևաբար շեղումների հաշվարկման կարգը պետք է կատարել հետևյալ հաջորդականությամբ.

1) միջին թվաբանական

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n},$$

2) ստանդարտ շեղում

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

3) միջինի միջին քառակուսային շեղում

$$S_{\bar{X}} = \frac{\bar{S}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\Delta X_i)^2}{n(n-1)}}$$

4) չափումների արդյունքի տատանում

$$\Delta X = \varepsilon_{\alpha,k} = t_{\alpha,k} S_{\bar{X}},$$

որտեղ $t_{\alpha,k}$ – Ստյուդենտի գործակիցն է ըստ աղյուսակ 1-ում ներկայացված տվյալների:

5) չափումների վերջնական արդյունք

$$\bar{X} \pm \Delta X,$$

6) հարաբերական սխալ

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta X}{X} 100\% :$$

ԲԱԺԻՆ 3
ՀԵՏԱԶՈՏՎՈՂ ՆՄՈՒՇՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՄԱՆ ԵՎ
ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Կենսաքիմիական հետազոտություններ իրականացնելիս օգտագործվում են բուսական և կենդանական հյուսվածքները, ինչպես նաև կենդանիների կենսագործունեության արգասիքները: Բույսերի մոտ հետազոտության են ենթարկվում դրանց սերմերը, արմատները, կոճղարմատը, արմատապտուղները, ընձյուղները, տերևները, ծաղիկները: Կենդանիների մոտ հետազոտվում են կենսաբանական հեղուկների (մեզ, արյուն, ողնուղեղային հեղուկ, կաթ) և տարբեր օրգանների (լյարդ, փայծաղ, սիրտ, ստամոքս, ուղեղ և այլն) հյուսվածքների կենսաքիմիական ցուցանիշները, ինչպես նաև մկանային, նյարդային, ճարպային հյուսվածքները, ներզատիչ գեղձերը: Հետազոտությունից առաջ ուսումնասիրվող նմուշը անհրաժեշտ է կշռել անալիտիկ կշեռքով և հյուսվածքը կտրատել: Բոլոր գործողությունները պետք է կատարել ցածր ջերմաստիճանում, անհրաժեշտ պարագաները սառեցնել, իսկ ռեակտիվները պահել սառցե բաղնիքում:

Եթե բուսական հյուսվածքի քայքայումը կատարվում է մեխանիկական աղացով, ապա լուծամզումից առաջ պետք է ստացված մանրացված զանգվածը նորից կշռել, քանի որ մանրացնելիս նմուշի մի մասը կարող է կորուստի ենթարկվել:

Ցածր խոնավության (5-15%) կենդանական և բուսական հյուսվածքները մանրացնելու նպատակով օգտագործում են մեխանիկական աղացներ: Բարձր խոնավության (65-90%) հյուսվածքների մանրացումը իրականացնում են հոմոգենիզատորներով: Միջին խոնավության (15-65%) հյուսվածքները պետք է նախապես չորացնել վակուումային չորացնող պահարաններում ոչ շատ բարձր ջերմաստիճանում ֆունկցիոնալ ակտիվ նյութերի առավելագույն պահպանություն ապահովելու նպատակով:

Բույսերում կուտակվող ֆունկցիոնալ ակտիվ նյութերը (ՖԱՆ) որոշակի ազդեցություն են ունենում կենդանու օրգանիզմում ընթացող նյու-

քափոխանակության գործընթացների վրա: Օգտագործելով լուծամըզման որոշակի մեթոդներ՝ բուսական և կենդանական հյուսվածքներից այդ ֆունկցիոնալ ակտիվ նյութերը հնարավոր է դուրս բերել լուծույթ: Ֆունկցիոնալ ակտիվ նյութերի որակական և քանակական կազմը կախված է բույսի տեսակից, այն հավաքելու ժամկետներից, աճման վայրից, ինչպես նաև հավաքած բույսերի մուշների մախապատրաստման և պահպանման պայմաններից և այլն: Կենդանական հյուսվածքներում ՖԱՆ-ի պարունակությունը կախված է կենդանու տեսակից, սեռից, տարիքից, կերակրման պայմաններից, ապրելու միջավայրից և այլն:

Քայքայված բուսական և կենդանական հյուսվածքներից ֆունկցիոնալ ակտիվ նյութերը լուծամզման ենթարկելիս պետք է ճիշտ ընտրել լուծիչը: Լիցքավորված բևեռային միացությունները լուծամզելու նպատակով պետք է օգտագործել բևեռային լուծիչներ (ջուր, էթանոլի 50%-անոց լուծույթ), իսկ հոմոգենատի հիդրոֆոբ բաղադրամասերը լուծամզելու նպատակով՝ ոչ բևեռային լուծիչներ (հեքսան, քլորոֆորմ, դիէթիլ-էթեր և այլն) կամ դետերգենտների ջրային լուծույթներ (տրիտոն X-45, X-100, X-114, X-165, X-305; տվին 20, 40, 60, 80 և այլն): Բուսական և կենդանական հյուսվածքների լրիվ քայքայման նպատակով կարելի է օգտագործել ուլտրաձայն:

Լուծամզումը պետք է իրականացնել օպտիմալ պայմաններում՝ հաշվի առնելով հետևյալ ցուցանիշները. ջերմաստիճանը, pH-ը, իոնային ուժը, լուծամզման տևողությունը, լուծիչի բնույթը և կոնցենտրացիան:

Չքայքայված բջիջները և կորիզները պետք է հեռացնել ցենտրիֆուգելու միջոցով: Ցենտրիֆուգման ռեժիմը կախված է հետազոտվող մուշից: Արյան պլազմայի ստացման նպատակով արյունը պետք է ցենտրիֆուգել 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ առանց սառեցնելու: Էնզիմոլոգիական հետազոտությունների ժամանակ հյուսվածքների հոմոգենատները պետք է ցենտրիֆուգել 7000-12000 g արագությամբ, 0°C ջերմաստիճանում սառեցնող ցենտրիֆուգաներով: Ցենտրիֆուգելուց հետո վերնատվածքը կարելի է պահել սառնարանում +4°C ջերմաստիճանում:

Վերնստվածքում պարունակվող նյութերի որակական և քանակական կազմը կարելի է որոշել ստանդարտ մեթոդներով, իսկ մեթոդն ընտրելիս անհրաժեշտ է հաշվի առնել հետևյալ կանոնը. օգտագործվող մեթոդը պետք է լինի

1. սպեցիֆիկ, այսինքն պետք է բացառվեն կողմնակի ռեակցիաների հնարավորությունները, որոնք կարող են բարդացնել ստացված արդյունքների վերլուծությունը

2. հեշտ վերարտադրվող:

3.1. ԿԵՆՍԱԲԱՐԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԼՈՒԾԱՄՉՈՒՄԸ ԲՈՒՍԱԿԱՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻՑ

Բույսի օրգանները (տերև, ընձյուղ, արմատ) մախապես պետք է մանրացնել, ապա մեխանիկական աղացով հասցնել 1-2 մմ չափսերով փոշի վիճակի: Լուծամզվածք պատրաստելու նպատակով փոշին թրմել 50%-անոց էթանոլով 1:20 հարաբերությամբ, 24 ժամվա ընթացքում +4°C ջերմաստիճանում: Չքայքայված մասնիկները, բջիջները և կորիզները հեռացնելու նպատակով հյուսվածքային հոմոգենատը ֆիլտրել կամ ցենտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10-15 րոպե 2-4°C ջերմաստիճանում: Ստացված թափանցիկ լուծույթը (ֆիլտրատ կամ վերնստվածք) ենթարկել կենսաքիմիական հետազոտության:

3.2. ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ ԲՈՒՍԱԿԱՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻՑ

Ամբողջական բույսը կամ դրա մի մասը կշռել և սառը պայմաններում հոմոգենիզացնել մեխանիկական ճամապարհով՝ տրորելով հավանգում: Ստացված համասեռ զանգվածը ցենտրիֆուգել և վերնստվածքը ենթարկել հետազոտության:

8-10% խոնավությամբ սերմերը և բույսի մյուս չոր մասերը մանրացնել աղացով (2 գ սերմերը մանրացնել 1 բոպեի ընթացքում): Ստացված չոր փոշին կշռել և լուծել մինչև 0°C սառեցված թորած ջրի մեջ կամ այլ միջավայրում 1:3 հարաբերությամբ: Խառնելուց հետո հետազոտվող նմուշը ցենտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10-15 բոպե: Վերնստվածքն օգտագործել կենսաքիմիական հետազոտությունների համար:

3.3. ԱՐՅԱՆ ՊԼԱՉՄԱՅԻ ԵՎ ՇԻՃՈՒԿԻ ՍՏԱՅՈՒՄԸ

Ասեղի կամ ասեղով ներարկիչի օգնությամբ երակից արյունը հավաքել ցենտրիֆուգի փորձանոթի մեջ: Փորձանոթը և ասեղը պետք է լինեն չոր, քանի որ խոնավ պայմաններում էրիթրոցիտները կարող են ենթարկվել հեմոլիզի, ինչը կարող է ազդել հետազոտության ընթացքի վրա: Արյունը ցենտրիֆուգել 3000 պտույտ/բոպե արագությամբ 15-20 բոպե: Ցենտրիֆուգման արդյունքում առաջանում է 2 շերտ՝ վերին և ստորին: Վերին շերտը բաց դեղնավուն պլազման է, իսկ ստորինը կարմիր է և կազմված է արյան ձևավոր տարրերից: Մինչև կենսաքիմիական հետազոտությունների իրականացումը արյան պլազման կարելի է պահել սառնարանում +4°C ջերմաստիճանում:

Արյան շիճուկ ստանալու նպատակով արյունը թողնել սառնարանում +4°C ջերմաստիճանում 1 օր, որից հետո հեղուկի վերին շերտը զգուշությամբ դատարկել մաքուր փորձանոթի մեջ՝ չվնասելով արյան ձևավոր տարրերից առաջացած մակարդուկը: Արյան շիճուկը պլազմայից տարբերվում է նրանով, որ շիճուկում բացակայում են արյան մակարդման տարրերը:

3.4. ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ ԿԵՆՂԱՆԱԿԱՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻՑ

Լյարդի կամ մկանի թարմ հյուսվածքը նախապես մի քանի անգամ լվանալ մինչև 0°C սառեցված 0,9% NaCl լուծույթով (ֆիզիոլոգիական լուծույթ), այնուհետև չորացնել ֆիլտրի թղթով և մկրատով մանրացնել: Մանրացված հյուսվածքը կշռել և հոմոգենիզացնել: Ապակյա հոմոգենիզատոր կիրառելու դեպքում ապակու պատի և սանդակոթի միջև հեռավորությունը պետք է լինի 0,2-0,3 մմ, սանդակոթի պտտման արագությունը չպետք է գերազանցի 800 պտույտ/րոպե: Լյարդի հյուսվածքի հոմոգենիզացման տևողությունը պետք է կազմի 30-40 վրկ, մկանինը՝ մինչև 60 վրկ: Սեխանիկական հոմոգենիզատոր օգտագործելիս դանակների պտտման արագությունը կարելի է հասցնել մինչև 900 պտույտ/րոպե: Բոլոր գործողությունները կատարել սառը պայմաններում՝ հոմոգենիզատորի բաժակը դնելով սառույցով թասի վրա:

Հոմոգենիզացման ժամանակ նոսրացում կատարելիս պետք է հաշվի առնել հետազոտվող կենսաբանական ակտիվ միացության բնույթը: Այսպես, լյարդի ակոհոլոլեհիդրոգենազի ակտիվության որոշման նպատակով նմուշի նոսրացումը կարելի է կատարել 1:3 կամ 1:5 հարաբերությամբ (1 գ թաց հյուսվածքին ավելացնել 3 կամ 5 մլ սառը անջատման միջավայր):

Ստացված հյուսվածքային հոմոգենատը անհրաժեշտ է ցենտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10-15 րոպե ($t=0^{\circ}\text{C}$) և վերնստվածքը ենթարկել կենսաքիմիական հետազոտության:

3.5. ՊԼԱՋՄԱՅԻՆ ԹԱԳԱՆԹՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԱՌՆԵՏԻ ԼՅԱՐԴԻՑ

Պատրաստել անջատման միջավայր հետևյալ բաղադրությամբ՝ 25 մՄ տրիս-HCl ($\text{pH } 7,5$ 4°C), 1 մՄ դիթիոտրեյտոլ, 1 մգ/մլ շիճուկային ալբումին:

Կենդանիներին գլխատելուց հետո լյարդը շատ արագ առանձնացնել և լվանալ սառը 0,9 % NaCl լուծույթով: Կշռել 1 գ հյուսվածք, մկրատով կտրատել և 1 թուպե հոմոգենիզացնել 9 մլ անջատման միջավայրում՝ օգտագործելով տեֆլոնե պտտիչով ապակյա հոմոգենիզատոր: Հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 300 g արագությամբ 10 թուպե սառեցնող ցենտրիֆուգայով: Ստացված վերնստվածքը ցենտրիֆուգել ևս 15 թուպե 1500 g արագությամբ:

Բոլոր գործողությունները կատարել սառը պայմաններում:

3.6. ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻՈՒՄՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԿՄԱԽՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐԻՑ

Պատրաստել անջատման միջավայր հետևյալ բաղադրությամբ՝ 0,1M KCl, 50 մM տրիս-HCl (pH 7,5 4°C), 1մM MgCl₂:

Առնետին գլխատելուց հետո ստորին վերջույթի մկանները շատ արագ առանձնացնել և տեղադրել սառեցված անջատման միջավայր պարունակող բաժակի մեջ: 5 թուպե անց մկանը տեղափոխել Պետրիի թասի մեջ, մաքրել ճարպերից, ջլերից և նյարդերից, չորացնել ֆիլտրի թղթով և խնամքով մանրացնել: 1 գ մանրացված հյուսվածքին ավելացնել 4 մլ անջատման միջավայր և հոմոգենիզացնել 1 թուպեի ընթացքում: Հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 7 թուպե 600 g արագությամբ (4°C):

Կորիզներ և մկանաթելիկներ պարունակող նստվածքը թափել, իսկ վերնստվածքը ցենտրիֆուգել 5 թուպե 2000 g արագությամբ մկանաթելիկներից լրիվ ազատվելու նպատակով: Ստացված վերնստվածքը ֆիլտրել քառաշերտ թանգիֆով և ցենտրիֆուգել 10 թուպե 9000 g արագությամբ: Միտոքոնդրիոմների նստվածքի մակերեսը ողողել 2 մլ անջատման միջավայրով սարկոպլազմային ցանցի խառնուրդ պարունակող վերին փուլի շերտը հեռացնելու նպատակով: Փորձանոթի ներքին պատերը ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել: Նստվածքին ավելացնել անջատման միջավայր՝ 1 գ հյուսվածքին 0,2 մլ հաշվարկով: Նըստվածքը միկրոպիպետով զգուշությամբ վերասուսպենզավորել:

3.7. ՄԻՏՈՔՈՆԳԻՌՈՒՄՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ՍՐՏԱՄԿԱՆԻՑ

Առնետին գլխատելուց հետո սիրտը շատ արագ փոխադրել 0,9% KCl սառը լուծույթ պարունակող բաժակի մեջ, լավ լվանալ և արյունով գունավորված լուծույթը թափել: Լվացված սիրտը տեղափոխել ֆիլտրի թղթի վրա, չորացնել և մկրատով հեռացնել անոթները, շարակցական հյուսվածքն ու ճարպը: Փորոքը բացել, ներքին խոռոչից հեռացնել արյան մակարդուկները: Հյուսվածքը ևս մեկ անգամ ողողել 0,9% KCl սառը լուծույթով, չորացնել ֆիլտրի թղթով, տեղադրել մանրացված սառույցի վրա դրված Պետրիի թասի մեջ: 5 գ հյուսվածքը մկրատով մանրացնել մինչև խյուսանման զանգվածի առաջացումը: Մանրացված հյուսվածքը տեղափոխել հոմոգենիզատորի մեջ և յուրաքանչյուր 1 գ հյուսվածքի հաշվարկով ավելացնել 10 մլ 0,01 Մ կոնցենտրացիայով ԷԴ-SU պարունակող 0,3 Մ սախարոզի լուծույթ: Հոմոգենիզացնել 1 րոպեի ընթացքում ապակյա սանդակոթով ապակյա հոմոգենիզատորում և ցենտրիֆուգել 7 րոպե 600 g արագությամբ: Ստացված վերնատվածքը ցենտրիֆուգել 15 րոպե 11000 g արագությամբ: Վերնատվածքը թափել, իսկ միտոքոնդրիումների նստվածքը ապակյա ձողիկով զգուշությամբ լուծել 2 մլ ԷԴ-SU-ի և սախարոզի լուծույթում մինչև համասեռ վիճակի ստացումը: Ստացված սուսպենզիայի ծավալը ԷԴ-SU-ի և սախարոզի լուծույթով հասցնել մինչև 40 մլ և միտոքոնդրիումները նորից նստեցնել:

3.8. ՄԻՏՈՔՈՆԳԻՌՈՒՄՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԱՌՆԵՏԻ ԼՅԱՐԳԻՑ

Կենդանիներին գլխատելուց հետո լյարդը շատ արագ առանձնացնել և լվանալ անջատման միջավայրով՝ 0,01 Մ ԷԴ-SU պարունակող 0,25 Մ սախարոզի լուծույթ, չորացնել ֆիլտրի թղթով և մկրատով կտրատել սառույցի վրա դրված Պետրիի թասի մեջ: Հոմոգենիզատորի մեջ տեղափոխել 1 գ հյուսվածք, ավելացնել 9 մլ սառեցված անջատման միջավայր: Հոմոգենիզացնել 1 րոպեի ընթացքում և ցենտրիֆուգել 10 րոպե

600 g արագությամբ բջիջների մնացորդներն ու կորիզները հեռացնելու նպատակով: Ստացված վերնատվածքը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 14000 g արագությամբ: Միտոքոնդրիումներ պարունակող նստվածքը ապակյա ձողիկով զգուշությամբ լուծել անջատման միջավայրում և նորից ցենտրիֆուգել (10 րոպե 14000 g): Վերնատվածքը թափել, իսկ միտոքոնդրիումային նստվածքի մակերեսը ողողել 0,3 մլ 0,25 Մ սախարոզի լուծույթով և զգույշ շարժումով հեռացնել նստվածքի վերին փուխը շերտը: Գործողությունը կրկնել 2 անգամ, ապա ստացված միտոքոնդրիումների խիտ նստվածքը զգուշությամբ պիպետով լուծել 0,5 մլ 0,25 Մ սախարոզի լուծույթում:

ԲԱԺԻՆ 4
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ
ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱԲԻՄԵԱԿԱՆ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Սպիտակուցները, ունենալով ամինաթթուների որոշակի հաջորդականություն, կարող են առաջացնել յուրահատուկ տարածական կառուցվածք և յուրաքանչյուր նեղ մասնագիտացված կենսաբանական ֆունկցիա, որը կատարվում է սպիտակուցի կողմից, իրականացվում է միայն այդպիսի կառուցվածքի ձևավորման դեպքում: Սպիտակուցը գործառությանին ակտիվություն ստանում է ֆոլդինգի գործընթացից հետո, որի ավարտին այն ձեռք է բերում մասնագիտացված ֆունկցիա կատարելու ընդունակություն: Ընդ որում, նրա ֆունկցիոնալ ակտիվության դրսևորմանը կարող են մասնակցել սպիտակուցային գլոբուլի մակերևույթին գտնվող քիչ թվով ամինաթթվային մնացորդները:

Ֆերմենտային սպիտակուցների յուրահատուկ ակտիվ կոնֆորմացիան պայմանավորված է բազմաթիվ փոխազդեցություններով: Եթե շրջակա միջավայրը փոփոխվում է այնպես, որ այդ փոխազդեցություններից որոշները թուլանում են կամ լիովին անհետանում, ապա ֆերմենտի կառուցվածքը զգալիորեն խախտվում է, ինչը պայմանավորված է փոխազդեցությունների կոոպերատիվ բնույթով: Բազմաթիվ ֆերմենտների ակտիվ կոնֆորմացիաների կայունությունը հարաբերական է, այսինքն փոխազդեցության գումարային ազատ էներգիայի աննշան փոփոխությունների դեպքում ակտիվ կոնֆորմացիան դադարում է լինել բարենպաստ (կայուն) և սկսվում է կառուցվածքի քայքայումը: Կարգավորված կոնֆորմացիայի անցումը ոչ կարգավորվածի սովորաբար անվանում են բնավոխում:

Բնավոխումը սովորաբար զուգակցվում է սպիտակուցի որոշ ֆիզիկաքիմիական հատկությունների (օպտիկական ակտիվություն, մածուցիկություն, ուլտրամանուշակագույն սպեկտր) զգալի փոփոխություններով:

Շատ հաճախ սպիտակուցները գործում են բարդ բարձրակազմավորված համակարգերի ձևով, որոնք պարունակում են մի քանի պոլիպեպտիդային շղթաներ, իսկ որոշ դեպքերում նաև այլ պոլիմերային մոլեկուլներ կամ ցածրամոլեկուլային բաղադրամասեր: Այսպիսի համակարգերի ձևավորման համար դրանց կազմի մեջ մտնող սպիտակուցները իրենց մակերեսին պետք է ունենան հատուկ կազմավորված հատվածներ համակարգի մյուս բաղադրամասերի հետ որոշակի կոնտակտների ապահովման նպատակով: Բնափոխված սպիտակուցների մոտ բացակայում է կարգավորված մակերեսը և համապատասխանաբար բացակայում են համակարգի մյուս բաղադրամասերի հետ կոնտակտների առաջացման հնարավորությունները:

4.1. ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԹԹՎԱՅԻՆ ԲՆԱՓՈԽՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ

Սպիտակուցի լուծույթին թթվի ավելացումը փոխում է միջավայրի թթվայնությունը: Սպիտակուցները, որոնց նատիվ (բնական) վիճակը հիմնականում պահպանվում է միջավայրի չեզոք կամ չեզոքին մոտ pH-ի պայմաններում, միջավայրի թթվայնության բարձրացման դեպքում սկսում են փոխել իրենց տարածական կառուցվածքը, ինչը հանգեցնում է նրանց նատիվ կոնֆորմացիայի խախտմանը: Սպիտակուցի գլոբուլի ապապարուրումը ջրի համար հասանելի է դարձնում ամինաթթուների հիդրոֆոր մնացորդները, որոնք նատիվ վիճակում գլխավորապես ձևավորում են գլոբուլի կորիզը: Պոլիպեպտիդային շղթայի մակերեսին գտնվող առանձին հատվածները կարող են փոխազդել միմյանց հետ՝ առաջացնելով խոշոր ասոցիատներ: Բնափոխված սպիտակուցի լուծույթի ցենտրիֆուգման կամ երկարատև պահպանման դեպքում (հատկապես ցածր ջերմաստիճաններում $0^{\circ}\text{C} \dots +4^{\circ}\text{C}$), սպիտակուցի ագրեգացված պոլիպեպտիդային շղթաները նստում են անոթի հատակին:

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի (ոլոռի) սերմերից ստացված վերնատվածք կամ արյան շիճուկ (պլազմա):

3 գ ցորենի (ոլոռի) սերմերը մեխանիկական աղացով մանրացնելուց հետո լուծել թորած ջրում 1:2 հարաբերությամբ: Խառնուրդը ցեմտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10-15 րոպե և օգտագործել վերնատվածքը:

Սաքրավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, ցեմտրիֆուգա, պլալետներ, չափիչ կոլբաներ, ցեմտրիֆուգման համար նախատեսված փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. 7,2 % HCl-ի լուծույթ - 100 մլ տարողությամբ կոլբայի մեջ լցնել 10 մլ խիտ HCl և ավելացնել 40 մլ ջուր
2. 3,6 % HCl-ի լուծույթ - 100 մլ տարողությամբ կոլբայի մեջ լցնել 10 մլ խիտ HCl և ավելացնել 90 մլ ջուր

Աշխատանքի ընթացքը – Ցեմտրիֆուգման համար նախատեսված 3 փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ վերնատվածք կամ արյան շիճուկ, այնուհետև առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 3 մլ 7,2 % -ոց HCl, երկրորդի մեջ՝ 3 մլ 3,6 % -ոց HCl, իսկ երրորդի (ստուգիչ) մեջ՝ 3 մլ թորած ջուր: Խառնել և փորձանոթները թողնել -20°C ջերմաստիճանի սառցախցիկում 20-30 րոպե, ապա ցեմտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10 րոպե և դիտել նստվածքի առաջացումը: Փորձնական և ստուգիչ մուշներում Բիուրետի եղանակով որոշել սպիտակուցի քանակությունները (հավելված 3)՝ առանձին վերլուծելով սպիտակուցի քանակությունը յուրաքանչյուր փորձանոթում:

4.2. ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԹԹՎԱՅԻՆ ԻՆՎԵՏԻՎԱՅՈՒՄԸ

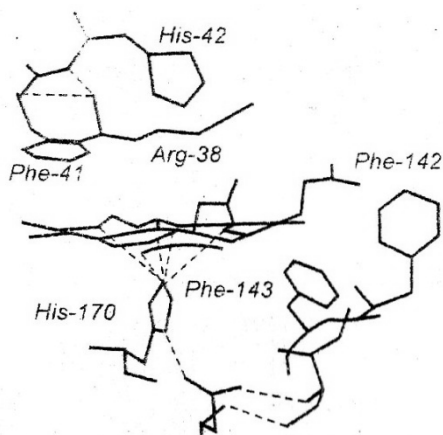
Ֆերմենտների կատալիտիկ գործընթացի իրականացմանը մասնակցում են ակտիվ կենտրոնում $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ և այլ ֆունկցիոնալ խմբեր պարունակող ամինաթթվային մնացորդները, որոնց պրոտոնացումը և ապապրոտոնացումը կարող է ազդել ֆերմենտի կատալիտիկ հատկությունների վրա: Այդ իսկ պատճառով ֆերմենտների ակտիվու-

բյունը կախված է միջավայրի pH-ից, որի փոփոխությունը կարող է հանգեցնել ապոսպիտակուցի նատիվ կառուցվածքի, ինչպես նաև ակտիվ կենտրոնի կոնֆորմացիայի խախտմանը, որն արտահայտվում է դրանց կողմից կատալիտիկ հատկության կորստով: Այդ պրոցեսներն ուսումնասիրելու նպատակով առաջարկվում է հետազոտել պերօքսիդազի ակտիվության կախումը միջավայրի pH-ից: Ֆերմենտը կատալիզում է անօրգանական և օրգանական միացությունների օքսիդացումը ջրածնի պերօքսիդով:

Պերօքսիդազի ակտիվ կենտրոնը իրենից ներկայացնում է սպիտակուցային գլոբուլի մակերևույթի այն շրջանը, որը տեղակայված է հեմինի դիստալ կողմից և կազմված է տարբեր ամինաթթվային մնացորդներից: Սուբստրատի պերօքսիդազային օքսիդացման կատալիտիկ գործընթացի ժամանակ ակտիվ դեր են խաղում պրոտոպորֆիրինի պիրոլային ազոտների 4 ատոմների հետ կոորդինացված Fe^{3+} իոնները: Պրոտոպորֆիրինի պրոքսիմալ լիգանդ է համարվում ապոսպիտակուցի հիստիդինի (հիս-170) իմիդազոլային մնացորդը: Ջրածնի պերօքսիդի վերականգնման գործընթացին մասնակցում են հիս-42 և արգ-38 ամինաթթվային մնացորդները: Հեմինի կոորդինացմանը մասնակցում են ֆենիլալանինի (ֆեն-41 և ֆեն-143) մնացորդները, որոնք ոչ կովալենտ կապ-

ված հեմինի համար ստեղծում են հիդրոֆոր շրջապատ և ապահովում դրա ամուր մերդրումը սպիտակուցային գլոբուլի մեջ:

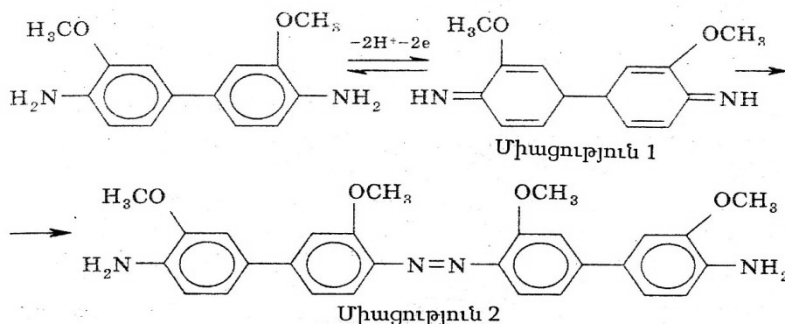
Օրգանական բնույթի միացությունների սուբստրատ կապող մակերեսը ներկայացված է ձգված հիդրոֆոր շրջանով, որտեղ ներառված են արգ-38, ֆեն-142, և ֆեն-143 ամինաթթվային մնացորդները (նկ. 1):



Նկար 1

Ծովաբողկի պերօքսիդազի ակտիվ կենտրոնի մոդելը

Պերօքսիդազի համար որպես սուբստրատ կարող է ծառայել օ-դիանիզիլինը (3,3'-դիմեթօքսիբենզիլին), որի օքսիդացումը բերում է բիս(3,3'-դիմեթօքսի-4-ամինո)ազոբիֆենիլ վերջնական արգասիքի (միացություն 2) առաջացմանը, որի կլանման մաքսիմումը դիտվում է 460 նմ ալիքի երկարության պայմաններում, իսկ մոլային կլանման գործակիցը $\varepsilon_{460}=3 \cdot 10^{-4} \text{ Մ}^{-1} \text{ սմ}^{-1}$ է: Այս միացությունը առաջանում է օ-դիանիզիլինի առաջնային օքսիդացման արգասիք հանդիսացող 4,4'-դիամինո-3,3'-դիմեթօքսիբիֆենիլի (միացություն 1) 2 մոլեկուլների կոնդենսացման արդյունքում (նկ. 2):



Նկար 2. Օ-դիանիզիլինը և դրա պերօքսիդազային օքսիդացման արգասիքը

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի սերմերից ստացված վերնատվածք (էջ 24):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ՄՓ տեսակի սպեկտրաֆոտոմետր, pH-մետր, անալիտիկ կշեռք, պիպետներ, փորձա-նոթներ:

Ռեակտիվներ

- 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7,0) (հալվելված 4):
- 4,3 մՄ օ-դիանիզիլինի ջրա-սպիրտային լուծույթ -105 գ օ-դիանիզիլինը լուծել 100 մլ 96% էթիլ սպիրտի մեջ: օ-դիանիզիլինը սպիրտում լավ լուծվում է տաքացնելիս:

3. 15,4 Մ H_2O_2 -ի ջրային լուծույթ - պատրաստել H_2O_2 -ի 3% լուծույթը ջրով նոսրացնելով:

4. 0.36 % HCl -ի լուծույթ – անոթի մեջ լցնել 1 մլ խիտ HCl և ավելացնել 90 մլ ջուր:

Աշխատանքի ընթացքը – 2 փորձանոթների մեջ լցնել 0.2-ական մլ ցորենի սերմերից ստացված վերնատվածք: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 2.5 մլ 0.36 % HCl , երկրորդի մեջ՝ 2.5 մլ բուֆեր: Խառնել և թողնել 10 րոպե, ապա ավելացնել 0.1-ական մլ 4.3 մՄ α -դիանիզիդին և 0.2-ական մլ 15,4 Մ H_2O_2 -ի լուծույթներ: Լուծույթների կլանումը չափել 460 նմ ալիքի երկարության պայմաններում ($\epsilon_{460}=30$ մՄ⁻¹սմ⁻¹): Ստուգիչ փորձանոթի մեջ ջրածնի պերօքսիդի փոխարեն լցնել թորած ջուր:

Հաշվարկ – Պերօքսիդազի ակտիվությունը հաշվարկել հետևյալ բանաձևով

$$\nu_o = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\epsilon l dt} \quad (\text{մկՄ/րոպե}),$$

որտեղ

dD - լուծույթի կլանումն է 460 նմ ալիքի երկարության պայմաններում, պայմ. միավոր

ϵ - α -դիանիզիդինի օքսիդացման արգասիքի մոլային կլանման գործակիցն է, Մ⁻¹սմ⁻¹

l - կյուվետի լայնությունը, սմ

dt – ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

Եզրակացություններ – Հետևել փորձանոթներում լուծույթների կլանման փոփոխություններին և համեմատել ստացված արդյունքները:

4.3. ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԲՆԱՓՈԽՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ջերմաստիճանի բարձրացման պայմաններում տեղի է ունենում սպիտակուցների բնափոխման գործընթաց, ինչը կապված է դրանց նատիվ կառուցվածքի խախտման հետ:

Բնափոխումն իրենից ներկայացնում է սպիտակուցային մակրոմոլեկուլում առանձին պեպտիդային բեկորների ներմոլեկուլային տարածական դասավորվածության փոփոխություն միմյանց նկատմամբ:

Սպիտակուցային գլոբուլի ապապարուրումից հետո հիդրոֆոր ամփնաթթվային մնացորդները հայտնվում են մոլեկուլի մակերեսին, որոնց փոխազդեցությունը կարող է հանգեցնել բնափոխված սպիտակուցների խոշոր ասոցիատների առաջացմանը, ինչի մասին կարող է վկայել լուծույթի պոտորության աստիճանը կամ նստվածքի առաջացումը:

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի սերմերից ստացված վերնստվածք, արյան պլազմա, կամ 10 %-անոց ալբումինի լուծույթ

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ցենտրիֆուգա, Ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, ջրային բաղնիք, ջերմակայուն բաժակ, պիպետներ, փորձանոթներ:

Աշխատանքի ընթացքը – 3 փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ ցորենի սերմերից ստացված վերնստվածք, արյան պլազմա կամ 10%-անոց ալբումինի լուծույթ: Փորձանոթներից երկուսը դնել եռացող ջրային բաղնիք՝ մեկը 15, մյուսը՝ 30 րոպե տևողություններով: Նմուշները սառեցնելուց հետո չափել դրանց օպտիկական խտությունները ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով (կարմիր լուսաֆիլտր): Այնուհետև նմուշները ցենտրիֆուգել 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ 15 րոպե, նստվածքը հեռացնել և նորից չափել օպտիկական խտությունը: Որից հետո բոլոր փորձանոթներում որոշել սպիտակուցի քանակությունը Բիուրետի եղանակով (հավելված 3):

Եզրակացություններ – Նկարագրել սպիտակուցի ջերմային մշակումից հետո դիտվող փոփոխությունները:

4.4. ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԲՆԱՓՈԽՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ֆերմենտները կատարում են կենսաաբանական կատալիզատորներ-ի դեր, և ինչպես բոլոր սպիտակուցները, ֆերմենտները ևս, ենթարկվե-լով բարձր ջերմաստիճանի ազդեցությանը, փոխում են իրենց կոնֆոր-մացիան՝ կորցնելով տարբեր միացությունների վերափոխումը կատալի-զելու ունակությունը: Այսպես, օրինակ պերօքսիդազները կատալիզում են օ-դիանիզոլիմի օքսիդացումը ջրածնի պերօքսիդով, սակայն բարձր ջերմաստիճանի երկարատև ազդեցության պայմաններում ենթարկվում են բնափոխման՝ նվազեցնելով կամ լրիվ արգելակելով ֆերմենտի կա-տալիտիկ ակտիվությունը:

Պերօքսիդազի կայունությունը կախված է ինչպես ապոսպիտակու-ցի մոդիֆիկացված խմբերի քանակից, այնպես էլ մոդիֆիկացնող ազ-դակի բնույթից, սուբստրատների և Ca^{2+} իոնների առկայությունից: Այս-պես, ացետիլացված պերօքսիդազի կայունությունը 11 անգամ ավելի բարձր է, քան նատիվ պերօքսիդազի կայունությունը, իսկ Ca^{2+} իոնների ավելացումը հանգեցնում է ֆերմենտի լրացուցիչ կայունացման:

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի սերմերից ստացված վերնսովածք (էջ 24):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, Ֆոտոէ-լեկտրակոդորիմետր, ջրային բաղնիք կամ թերմոստատ, կոլբաներ, պի-պետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7,0) (հավելված 4):
2. 4,3 մՄ օ-դիանիզոլիմի սպիրտային լուծույթ - 52 մգ օ-դիանիզոլ-իմը լուծել 50 մլ 96% էթիլ սպիրտի մեջ: օ-դիանիզոլիմը սպիր-տում լավ լուծվում է տաքացնելիս:
3. 15,4 մՄ H_2O_2 -ի ջրային լուծույթ - պատրաստել 3 % H_2O_2 -ի լու-ծույթը ջրով մոսրացնելով:

Աշխատանքի ընթացքը – 4 փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ ցո-րենի սերմերից ստացված վերնսովածք: Առաջին փորձանոթը բողմել

որպես ստուգիչ, մյուս 3 փորձանոթները դնել 60°C ջրային բաղնիքում համապատասխանաբար 10, 20 և 30 րոպե տևողություններով: Նշված ժամանակահատվածները լրանալուն պես փորձանոթները հանել, սառեցնել և յուրաքանչյուրում որոշել ֆերմենտի ակտիվությունը հետևյալ կերպ:

Նմուշներից 0,2-ական մլ լցնել մաքուր փորձանոթների մեջ, յուրաքանչյուրին ավելացնել 2.5-ական մլ 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7,0) և 0.1-ական մլ 4.3 մՄ օ-դիանիզիդին, խառնել և ռեակցիան սկսելու նպատակով ավելացնել 0.1-ական մլ 15,4 մՄ H₂O₂-ի լուծույթ: Ֆերմենտի ակտիվությունը գրանցել ֆոտոէլեկտրակոորդիմետրով 460-500 նմ ալիքի երկարության տակ 1 րոպեի ընթացքում: օ-դիանիզիդինի օքսիդացման արգասիքի կլանման մաքսիմումը 460 նմ է ($\epsilon_{460}=30 \text{ մՄ}^{-1}\text{սմ}^{-1}$):

Որպես ֆերմենտի ակտիվության միավոր ընդունել այն քանակությունը, որը 1 րոպեում օքսիդացնում է 1 մկմոլ օ-դիանիզիդին: Ֆերմենտի ակտիվությունը հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$\nu_o = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\epsilon l dt} \text{ (մկՄ/րոպե),}$$

որտեղ

dD- լուծույթի կլանումն է 460 նմ ալիքի երկարության պայմաններում, պայմ. միավոր

ϵ - օ-դիանիզիդինի օքսիդացման արգասիքի մոլային կլանման գործակիցն է, Մ⁻¹սմ⁻¹

l- կյուվետի լայնությունը, սմ

dt – ռեակցիայի տևողությունը, րոպե

Եզրակացություններ – Համեմատել փորձնական և ստուգիչ տարբերակներում պերօքսիդազի առկայությամբ օ-դիանիզիդինի պերօքսիդազային օքսիդացման սկզբնական արագությունները:

4.5. ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏԻ ԵՎ ԳՈՐՏԻ ԼՅԱՐԳԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԻՆԱԿՏԻՎ ԱՑՈՒՄԸ ԷԴՏԱ-Ի ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՐԸ

Հայտնի է, որ բազմաթիվ ֆերմենտների օլիգոմերային կառուցվածքի պահպանման և կատալիտիկ հատկությունների դրսևորման համար անհրաժեշտ են երկվալենտ կատիոններ: Մետաղական իոնները առաջացնում են կոորդինացիոն միացություններ որոշակի խմբերի կամ մոլեկուլների հետ: Այդ ֆերմենտների շարքին են պատկանում լյարդային տիպի արգինազները:

Մետաղների իոնները կարող են փոխազդել մեկ կամ մի քանի լիգանդների հետ՝ առաջացնելով կովալենտ կապեր: Որոշ լիգանդներ պարունակում են մի քանի կոորդինացնող խմբեր և մի քանի այդպիսի խմբեր ունեցող պոլիդենտային լիգանդները կարող են առաջացնել «չանչաձև ցիկլեր», որոնք կոչվում են խելատներ: Որոշ խելատային միացություններ, մասնավորապես էթիլենդիամինոտետրաացետատը (ԷԴՏԱ), կապելով մետաղական իոնները, ոչ մրցակցային ձևով արգելակում են ֆերմենտի ակտիվությունը: ԷԴՏԱ-ի հետ մետաղների կոմպլեքսների առաջացումը հիմնականում իրականացվում է չեզոք pH-ի պայմաններում, քանի որ թույլ թթվային պայմանները բերում են ԷԴՏԱ-ից սեփական պրոտոնների անջատմանը, որի արդյունքում բարձրանում է միջավայրի pH-ը՝ ստեղծելով անբարենպաստ պայմաններ կոմպլեքսների առաջացման համար: Մյուս կողմից հիմնային միջավայրում ԷԴՏԱ-ի հետ մետաղի կոմպլեքսի առաջացումը կատարվում է ոչ ամբողջությամբ մետաղների հիդրօքսիդների առաջացման պատճառով:

Հետազոտման օբյեկտ – առնետի կամ գորտի լյարդի հոմոգենատ:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, ցենտրիֆուգա, հոմոգենիզատոր, սպեկտրաֆոտոմետր, ջրային բաղնիք, կոլբաներ, պիպետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH-7.4) (առնետի լյարդի դեպքում)
2. 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH-9.5) (գորտի լյարդի դեպքում)
3. ԷԴՏԱ-ի դինատրիումական աղ

4. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 մկՄ
5. L-արգինին 50 մկՄ
6. 10% ԵԶԲ-ի լուծույթ
7. թթվային խառնուրդ (300 մլ խիտ H_3PO_4 , 100 մլ խիտ H_2SO_4 , 0.237 գ. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.7 մլ 0.1 Մ FeCl_3 , 398 մլ թորած ջուր)
8. 1.5%-ոց դիացետիլմոնոքսիմի (ԴԱՄՕ) լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը – լյարդը կշռել, պատրաստել 5%-ոց հոմոգենատ թորած ջրով: Հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 20000 g արագությամբ 30 րոպե 0-4°C ջերմաստիճանում: Անջատված վերնատվածքը օգտագործել որպես ֆերմենտի աղբյուր: Ֆերմենտի ինակտիվացումն իրականացնել 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆերով (pH-7.4) ԷԴ-SU-ի ազդեցությամբ, որի վերջնական կոնցենտրացիան սենյակային ջերմաստիճանում պետք է կազմի 5×10^{-2} Մ: Քանի որ ԷԴ-SU-ն և դրա մոնոմատրիումական աղը ($-\text{NaH}_3$ -թթվային մնացորդ) դժվար են լուծվում ջրում, փորձերում նպատակահարմար է օգտագործել ջրում հեշտությամբ լուծվող ԷԴ-SU-ի դինատրիումական աղը ($-\text{Na}_2\text{H}_2$ -թթվային մնացորդ), (Trilon B, մոլ. զանգված՝ 372 Դա):

Ֆերմենտային պատրաստուկի վրա ԷԴ-SU ավելացնելուց հետո 1 ժամվա ընթացքում 10 րոպե ընդմիջումներով վերցնել մուշ և ստուգել արգինազի ակտիվությունը:

Արգինազի ակտիվության որոշումը – վերցված մուշներից պատրաստել փորձնական և ստուգիչ տարբերակներ: Փորձնական տարբերակներում ավելացնել 2.4-ական մլ 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH-9.5), 0.2-ական մլ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5 մկՄ) և 0.4-ական մլ L-արգինին (50 մկՄ): Ստուգիչ տարբերակում L-արգինինի փոխարեն ավելացնել թորած ջուր: 4 մլ ծավալով ստուգիչ և փորձնական տարբերակներն ինկուբացնել 37°C-ում 60 րոպեների ընթացքում: Ֆերմենտային ռեակցիան դադարեցնելու նպատակով փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ 10% ԵԶԲ: Այնուհետև մուշներում որոշել սուբստրատի ճեղքման ընթացքում առաջացած վերջնական արգասիքի՝ միզանյութի քանակը: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտել անջատված միզանյութի մկմուլերով՝ հաշ-

ված 1 գրամ թաց հյուսվածքում կամ 1 մլ (կամ 100 մլ) ֆերմենտային պատրաստուկի նմուշում:

Միզանյութի որոշումը – ապակյա խցանով փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ ԵԲԲ-էքստրակտ, 2.5 մլ թթվային խառնուրդ և 0.25 մլ 1.5% ԴԱՄՕ-ի լուծույթ: Փորձանոթների պարունակությունը թափահարել և եռացնել մթության մեջ, ջրային բաղնիքում 45 րոպե տևողությամբ: Սառեցնելուց հետո դեղնավուն գույնի նմուշները գունաչափել սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով 478 նմ երկարության ալիքի տակ:

Եզրակացություններ – հետևել ինչ արագությամբ է կատարվում ֆերմենտի ինակտիվացումը երկկենցաղների և կաթնասունների լյարդային տիպի արգինազների դեպքում:

ԲԱԺԻՆ 5

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Սովորական ֆունկցիոնալ սպիտակուցներից ֆերմենտները տարբերվում են նրանով, որ սպիտակուցային գլոբուլի մակերեսին ունեն ակտիվ կենտրոն: Այդ հատվածը, որտեղ տեղի է ունենում սուբստրատի վերափոխումը, կազմված է պոլիպեպտիդային շղթայի տարբեր կետերում գտնվող ամինաթթվային մնացորդներից: Բացի ակտիվ կենտրոնից որոշ ֆերմենտներ ունեն նաև կարգավորիչ կենտրոն, որին կապվում են ֆերմենտային կատալիզի ժամանակ սուբստրատի վերափոխման արագության վրա ազդող մոլեկուլներ: Ընդ որում այդ կարգավորիչ մոլեկուլները ոչ մի փոփոխության չեն ենթարկվում:

Ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում տեղակայված են ամինաթթվային մնացորդներ, որոնք պարունակում են կատալիտիկ գործընթացին մասնակցող ֆունկցիոնալ խմբեր՝ $-SH$, $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$: Ակտիվ կենտրոնը պայմանականորեն կարելի է բաժանել 2 մասի՝ կապող, որը պատասխանատու է սուբստրատի կապման համար և կատալիտիկ, որտեղ տեղի է ունենում սուբստրատի վերափոխումը: Ակտիվ կենտրոնում ֆունկցիոնալ խմբերի տարածական դիրքը համապատասխանում է սուբստրատի բնույթին և որոշում է քիմիական ռեակցիայի իրականացման ընթացքում վերջինիս էֆեկտիվ կապումը և վերափոխումը:

Ֆերմենտի ակտիվությունը կախված է ֆերմենտի և սուբստրատի բնույթից, նրանց կոնցենտրացիաներից, սպիտակուցային գլոբուլի միջենթամիավորային փոխազդեցություններից, լուծույթի բաղադրությունից, լուծիչի բնույթից, լուծույթի իոնային ուժից, pH -ից, արգելակիչների և խթանիչների առկայությունից, միջավայրի ջերմաստիճանից, ուլտրամանուշակագույն և ռենտգենյան ճառագայթումից: Միջավայրի ջերմաստիճանի բարձրացման հետ ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրանում է, սակայն $40-60^{\circ}C$ բարձր ջերմաստիճանում նկատվում է ֆերմենտի ակտիվության անկում սպիտակուցային գլոբուլի մատիվ կառուցվածքի խախտման հետևանքով: Ջերմաստիճանի բարձրացումը հանգեցնում է

ակտիվ կենտրոնում գտնվող ֆունկցիոնալ խմբերի շարժունակության մեծացմանը և սպիտակուցի նատիվ կոնֆորմացիայի փոփոխմանը:

Ֆերմենտի ակտիվության վրա միջավայրի pH-ի ազդեցությունը դրսևորվում է ակտիվ կենտրոնի իոնիզացնող խմբերի և սուբստրատի ֆունկցիոնալ խմբերի ասոցիատիվ վարքի միջոցով: Ֆերմենտի ակտիվության վրա կարող են ազդել նաև սպիտակուցային գլոբուլի մակերևույթին գտնվող խմբերը, որոնց իոնացումը կարող է հանգեցնել ապո-սպիտակուցի կոնֆորմացիայի փոփոխության:

5.1. ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՀԵՏ ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՍԿԶԲՈՒՆՔՆԵՐԸ

Քանի որ ֆերմենտները հանդիսանում են սպիտակուցներ, և հետևաբար անկայուն միացություններ են, որոնք հեշտությամբ ենթարկվում են բնափոխման և ապասկտիվացման, ապա դրանց անջատման և մաքրման ժամանակ անհրաժեշտ է պահպանել մի շարք նախազգուշական կանոններ.

1. Աշխատանքներն իրականացնել սառը սենյակում $0-4^{\circ}\text{C}$ ջերմաստիճանում, իսկ օրգանական լուծիչներով ֆրակցիոնացում կատարելիս՝ 0° -ից ցածր ջերմաստիճանում:
2. Ելային լուծամզվածքներում ֆերմենտը որպես կանոն բավականին կայուն է, ինչը բացատրվում է լուծույթում գտնվող այլ սպիտակուցներով: Մաքրման հետագա փուլերում հոմոգենատում գտնվող կողմնակի սպիտակուցների և՛ կոնցենտրացիան, և՛ ֆերմենտի կայունությունը նվազում են: Այդ իսկ պատճառով կարևոր է մաքրումն իրականացնել շատ արագ: Դա հատկապես վերաբերվում է այն փուլերին, երբ ֆերմենտը ենթարկվում է կոշտ ազդեցությունների, օրինակ օրգանական լուծիչներով ֆրակցիոնացմանը:
3. Ֆերմենտները զգայուն են թթուների և հիմքերի ազդեցության նկատմամբ և սովորաբար ինակտիվանում են $\text{pH}<5$ և $\text{pH}>9$ ար-

ժեքների դեպքում: Դրանց մաքրման ժամանակ կարևոր է անընդհատ կարգավորել ջրածնային ցուցիչի մեծությունը: Դա հարմար է կատարել պոտենցիամետրի օգնությամբ: Հիմք կամ բթու ավելացնելիս պետք է այն պիպետով կամ կաթոցիկի օգնությամբ ինտենսիվ խառնելով սահեցնել ամոթի պատին: Դա բույլ կտա կանխել ֆերմենտային լուծույթի և բթվի կամ հիմքի հպման սահմանին pH-ի կտրուկ փոփոխությունը:

4. Աշխատանքի ժամանակ օգտագործվող քիմիական ռեակտիվները կարող են պարունակել խառնուրդներ, որոնք շատ ֆերմենտների վրա թողնում են քայքայիչ ազդեցություն: Այդ իսկ պատճառով հեղուկ քիմիական ռեակտիվները (սպիրտ, ացետոն և այլն) օգտագործելուց առաջ պետք է ենթարկել թորման, իսկ չոր ռեակտիվները՝ վերաբյուրեղացման: Շատ դեպքերում ֆերմենտի մաքրումն ավարտվում է ամոնիումի սուլֆատով այն վերաբյուրեղացման ենթարկելով: Հատուկ ուշադրություն պետք է դարձնել վերջինիս որակի վրա: Երբ անջատվող ֆերմենտը բնութագրվում է ծանր մետաղների աղերի նկատմամբ բարձր զգայությամբ, ապա ամոնիումի սուլֆատով վերաբյուրեղացումն իրականացվում է կոմպլեքսագոյացուցիչների առկայությամբ (օրինակ վերսենի):

Լաբորատորիայում օգտագործվող թորած ջուրը նույնպես կարող է պարունակել ծանր մետաղների աղեր, այդ իսկ պատճառով ջուրը պետք է կրկնակի անգամ թորել:

5. Ֆերմենտների հետ աշխատելիս պիտանի է համարվում իոնափոխակային աշտարակների միջով անցկացված ջուրը: Նպատակահարմար է աշտարակով անցկացնել ոչ թե ծորակի, այլ թորած ջուրը, ինչը մի քանի անգամ ավելացնում է խեժի գործունեության ժամանակը:
6. Ֆերմենտների անջատման և մաքրման տարբեր փուլերում անհրաժեշտություն է առաջանում ինտենսիվ խառնել ֆերմենտային լուծույթները: Որպես կանոն լուծույթը այդ ընթացքում ուժեղ փրփրում է (պայմանավորված է սպիտակուցի քանակու-

թյամբ), ինչի արդյունքում բաժանման մակերևույթին շատ ֆերմենտներ կարող են բնափոխման ենթարկվել: Փրփրումից կարելի է խուսափել օգտագործելով տարբեր տիպի խառնիչներ: Եթե ֆերմենտային լուծույթի ծավալը շատ մեծ չէ, ապա հարմար է օգտագործել մագնիսական խառնիչ:

7. Աղերով ֆրակցիոնացման ժամանակ հնարավոր է օդի պղպրձակների ինտենսիվ անջատում: Այդ իսկ պատճառով աղերը պետք է ավելացնել զգուշությամբ, քիչ քանակներով: Լուծույթը մի անոթից մյուսը դատարկել դանդաղ, անոթի պատերին սահեցնելով:
8. Ֆրակցիոնացման ժամանակ առաջացող նստվածքներն առանձնացնելու նպատակով պետք է օգտագործել սառեցնող ցենտրիֆուգաներ: Մեթոդով նախատեսված ցենտրիֆուգման արագությունը կարելի է իջեցնել՝ երկարացնելով ցենտրիֆուգման տևողությունը: Միշտ պետք է ձգտել ստանալ առավելագույն խտությամբ նստվածք: Այն զգալիորեն մեծացնում է ֆրակցիոնացման արդյունավետությունը, եթե ֆերմենտը գտնվում է նստվածքում և բարձրացնում է նրա ընդհանուր ելքը, եթե այն գտնվում է լուծույթում: Առավել բարձր խտությամբ ֆերմենտ պարունակող նստվածքների ստացումը առավելություն ունի նաև օրգանական լուծիչներով ֆերմենտների ֆրակցիոնացման ժամանակ, քանի որ այդ պայմաններում շատ քիչ ծավալի ջրով կամ բուֆերով կարելի է օրգանական լուծիչի կոնցենտրացիան արագ իջեցնել մինչև հարաբերականորեն անվտանգ մեծություն:

Ցենտրիֆուգման տևողությունը ցանկալի չէ երկարացնել այն դեպքում, երբ ֆերմենտը գտնվում է անբարենպաստ պայմաններում, օրինակ օրգանական լուծիչներով նստվածքների անջատման ժամանակ: Անոնիումի սուլֆատով նստեցման փուլում ցենտրիֆուգման տևողությունը ոչ մի ազդեցություն չունի ինչպես ֆերմենտի մաքրման աստիճանի, այնպես էլ դրա ընդհանուր ելքի վրա:

Եթե պետք է գործ ունենալ մեծ ծավալների և նստվածքների հետ, որոնք դժվար են ցենտրիֆուգվում, ապա կարելի է ֆիլտրել սովորական մեծ տրամագծով քիմիական ձագարներով կամ ծալքավոր ֆիլտրերով: Վակուումային ֆիլտրման ժամանակ հնարավոր է գոլորշիացում տեղի ունենա, և որպես հետևանք լուծույթում գտնվող ֆերմենտը ենթարկվի բնափոխման:

Օրգանական լուծիչներով ֆրակցիոնացման փուլում նպատակահարմար չէ ցենտրիֆուգումը փոխարինել ֆիլտրումով: Բացառություն են կազմում այն դեպքերը, երբ աշխատում են շատ մեծ ծավալների և դժվար նստեցվող նյութերի հետ:

5.2. ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԱՐՏԱՀԱՅՏՄԱՆ ՁԵՎԵՐԸ

Սովորաբար ֆերմենտի առկայության մասին դատում են սպեցիֆիկ ֆերմենտային ռեակցիայի իրականացման դեպքում, իսկ դրա քանակությունը որոշում են քիմիական ռեակցիայի արագությամբ և արտա-հայտում պայմանական «ֆերմենտային միավորներով»:

Որպես ֆերմենտային միավոր (E) ընդունում են ֆերմենտի այն քանակությունը, որը տվյալ պայմաններում կատալիզում է 1 մկմոլ սուբստրատի վերափոխումը 1 րոպեում: Երաշխավորված ջերմաստիճան է համարվում 25°C, (հատուկ դեպքերում պետք է նշել փաստացի ջերմաստիճանը, որի պայմաններում իրականացվել է կատալիզը), մյուս պայմանները (pH, սուբստրատի կոնցենտրացիա և այլն) պետք է լինեն օպտիմալ:

Տեսակարար ակտիվություն – ստացված ֆերմենտային պատրաստուկի մաքրությունը բնութագրվում է դրա տեսակարար ակտիվության մեծությամբ: Տեսակարար ակտիվությունը արտահայտվում է 1 մգ սպիտակուցին բաժին ընկնող ֆերմենտի ակտիվության միավորներով (E/մգ):

Եթե ֆերմենտը ստացվել է մաքուր վիճակում, ապա կարելի է որոշել դրա տեսակակար ակտիվությունը և բացարձակ պարունակությունը (օրինակ 1 մգ սպիտակուցում):

Մոլեկուլային ակտիվություն – բնութագրվում է սուբստրատի այն մոլեկուլների թվով, որոնք վերափոխման են ենթարկվում 1 մոլեկուլ ֆերմենտով 1 րոպեում:

Կատալիտիկ կենտրոնի ակտիվություն – երբ հայտնի է ֆերմենտի մոլեկուլում պարունակվող կատալիտիկ կենտրոնների թիվը, կարելի է հաշվել կատալիտիկ կենտրոնի ակտիվությունը: Այն բնութագրվում է սուբստրատի այն մոլեկուլների թվով, որոնք վերափոխման են ենթարկվում 1 րոպեում 1 կատալիտիկ կենտրոնի հաշվարկով:

Եթե ֆերմենտն ունի մեկ ակտիվ կենտրոն, ապա կատալիտիկ կենտրոնի ակտիվությունը համընկնում է մոլեկուլային ակտիվության մեծության հետ:

Ֆերմենտի կոնցենտրացիայի արտահայտումը – լուծույթում ֆերմենտի կոնցենտրացիան արտահայտում են 1 մլ լուծույթին բաժին ընկնող ֆերմենտի ակտիվության միավորներով (E/մլ):

5.3. ՏԱՐԲԵՐ ԴԱՍԵՐԻՆ ՊԱՏԿԱՆՈՂ ՄԻ ՇԱՐՔ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

5.3.1. ՄԿԱՆՆԵՐԻ ՅԻՏՈՔՐՈՄՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ցիտոքրոմօքսիդազը բուսական և կենդանական օրգանիզմներում տարածված ֆերմենտ է, որը հանդիսանալով էլեկտրոնների փոխանցման շղթայի եզրափակող օղակ՝ կատալիզում է էլեկտրոնների փոխանցման պրոցեսը դեպի օդի թթվածնի ատոմներ: Զիմիական բնույթով ցիտոքրոմօքսիդազը պղինձ պարունակող հեմոպրոտեին է, որտեղ հեմը և պղինձը գտնվում են պրոստետիկ խմբի կազմում: Ցիտոքրոմօքսիդազը,

ինչպես և բոլոր ցիտոքրոմները, ամուր կապված են բջջային կառույցների հետ:

Հետազոտման օբյեկտ – մկանային հյուսվածք

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – հավանգ, փորձանոթներ, ձագար, ապակյա ձողիկներ, պիպետներ

Ռեակտիվներ

1. պ-ֆենիլենդիամինի 1% ջրային լուծույթ
2. α -նավթոլի 1% սալիտային լուծույթ

Աշխատանքի ընթացքը

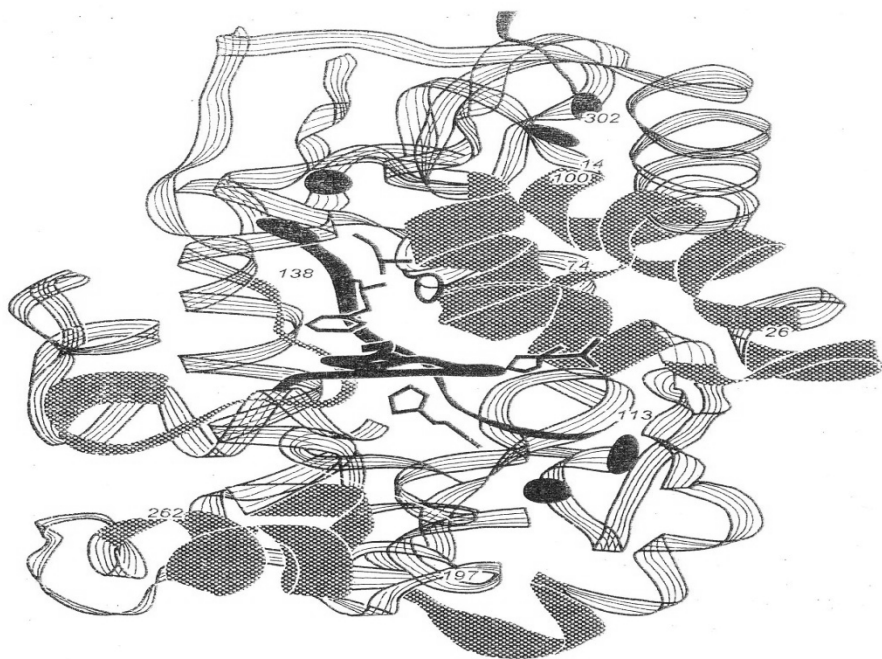
1. Ֆերմենտային պատրաստուկ ստանալու նպատակով 0.3-0.5 գ. քարմ մկանը տրորել հավանգում 20-ապատիկ ծավալի թորած ջրով: Այնուհետև ջուրը զգուշությամբ թափել, իսկ մկանային խյուսը քամել ֆիլտրի թղթով:
2. Վերականգնող նյութերից և ջրալույծ ֆերմենտներից զուրկ մկանային խյուսը բաժանել 2 մասի: Մի մասը տեղադրել ֆիլտրի թղթի վրա, մյուս մասը՝ փորձանոթի մեջ: Փորձանոթի մեջ ավելացնել 1 մլ թորած ջուր և եռացնել 5 րոպե: Սառեցնելուց հետո հեղուկը զգուշությամբ հեռացնել փորձանոթից, իսկ մկանը ձողիկով տեղափոխել ֆիլտրի թղթի վրա:
3. Մկանների մուշների վրա հերթով ավելացնել 1-2 կաթիլ պ-ֆենիլենդիամինի և α -նավթոլի լուծույթներ: 5-10 րոպե հետո մուշներից մեկը կստանա կապտամանուշակագույն գունավորում: Գունավորումը պայմանավորված է ինդոֆենոլային կապույտի առաջացմամբ, որը հանդիսանում է պ-ֆենիլենդիամինի և α -նավթոլի օքսիդացման և կոնդենսացման արգասիք: Ռեակցիան կատալիզում է մկանների ցիտոքրոմօքսիդազը: Ջերմային մշակման ենթարկված մկանային մուշը չի գունավորվում ֆերմենտի բնավոխման հետևանքով:

5.3.2. ՊԵՐՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԿԱԼԻՈՒՄԻ ՖԵՐՈՑԻԱՆԻԴՈՎ

Պերօքսիդազը բուսական և կենդանական օրգանիզմների ամենատարածված ֆերմենտն է: Ֆերմենտը հեն պարունակող գլիկոպրոտեին է, կազմված է 300 ամինաթթվային մնացորդներ ունեցող պոլիպեպտիդային շղթայից, հեմինից և մակերևութային ածխաջրերից: Պերօքսիդազը կատալիզում է սուլատրատների օքսիգենազային (PO_1), օքսիդազային (PO_2) և պերօքսիդազային (PO_3) օքսիդացումները:

Ֆերմենտի սուլատրատների շարքին են դասվում դիօքսիֆումարաթթուն և այլ նյութեր, որոնց օքսիդացումը ուղեկցվում է ազատ ռադիկալային օքսիդացման արգասիքների առաջացմամբ: Պերօքսիդազային օքսիդացման ռեակցիաներում ֆերմենտի համար որպես սուլատրատ կարող են հանդես գալ անօրգանական և օրգանական միացություններ, որոնք օքսիդանում են ջրածնի պերօքսիդով: Ենթադրվում է, որ պերօքսիդազային օքսիդացման ռեակցիաներում ֆերմենտի մակերեսին հայտնվում է մի շրջան, որի կազմում կան երկու հատվածներ, որտեղ տեղի է ունենում սուլատրատի կապումը կարգավորիչ հատվածի հետ: Ընդ որում պերօքսիդազի հեմը այնպես է կողմնորոշված սպիտակուցային գլոբուլի կառուցվածքում, որ նրա վինիլային խմբերը ուղղված են դեպի սպիտակուցային հատվածի ներսի կողմը, իսկ պրոպիոնաթթվային մնացորդները ուղղված են դեպի դուրս և ի հաշիվ սպիտակուցի ֆունկցիոնալ խմբերի հետ իոնային կապերի մասնակցում են ապոֆերմենտի հետ հեմի կապմանը, կողմնորոշմանը և տեղադրմանը (նկար 3):

Ածխաջրերը, որոնք տեղաբաշխված են սպիտակուցային գլոբուլի մակերեսին, կատարում են հետևյալ ֆունկցիաները. կողմնորոշում են ֆերմենտին թաղանթի մակերևութի վրա, պաշտպանում են սպիտակուցային գլոբուլին ազատ ռադիկալների քայքայող ազդեցությունից, բարձրացնում են պերօքսիդազների կայունությունը բարձր ջերմաստիճանի նկատմամբ:



Նկար 3

Պերօքսիդազի սխեմատիկ տեսքը: Ներկայացված են ակտիվ կենտրոնի կազմի մեջ մտնող հենը և ամինաթթվային մնացորդները, կալցիումի իոնները (գնդերի ձևով) և դիսուլֆիդային կապերը (գլանի ձևով):

Առանձին և համատեղ պերօքսիդազային օքսիդացման ռեակցիաներում պերօքսիդազների համար որպես սուբստրատներ կարող են ծառայել հակաօքսիդանտները (ասկորբինաթթու, դիհիդրոկվերցետին, կվերցետին, հիդրոլիսինոն և այլն): Հակաօքսիդանտները քիչ քանակներով խթանում են պերօքսիդազային օքսիդացումը, իսկ դրանց բարձր կոնցենտրացիաները իջեցնում են պերօքսիդազների կատալիտիկ ակտիվությունը՝ արգելակելով ֆերմենտին: Կախված հակաօքսիդանտի բնույթից սուբստրատների համատեղ օքսիդացման ժամանակ դիտվում է պերօքսիդազի ակտիվության խթանման էֆեկտ: Այս դեպքում երևան է գալիս ֆերմենտի ազդեցության սպեցիֆիկ մեխանիզմ:

Պերօքսիդազի ակտիվության որոշման համար օգտագործվում են անօրգանական և օրգանական միացություններ, որոնց օքսիդացման ժամանակ առաջանում են գունավոր արգասիքներ: Որպես սուբստրատներ կարելի է օգտագործել օ-դիանիզոլինը և կալիումի ֆերոցիանիդը, որոնց պերօքսիդազային օքսիդացման արգասիքների կլանման մաքսիմումները դիտվում են համապատասխանաբար 460 և 420 նմ ալիքի երկարության պայմաններում:

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի սերմերից ստացված վերնատվածք (էջ 24):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, սպեկտրաֆոտոմետր կամ ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, ցենտրիֆուգա, կոլբաներ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր, pH 7,0 (հավելված 4),
2. 25 մՄ կալիումի ֆերոցիանիդի լուծույթ – 460 մգ աղը լուծել 50 մլ թորած ջրում,
3. 15,4 մՄ ջրածնի պերօքսիդի լուծույթ – պատրաստել սպեկտրաֆոտոմետրի օգնությամբ (պայմանական կլանումը 1,12-1,15) 230 նմ ալիքի երկարության տակ ($\varepsilon=72,7 \text{ մՄ}^{-1}\text{սմ}^{-1}$):

Աշխատանքի ընթացքը

0,5 սմ լայնությամբ սպեկտրաֆոտոմետրի կյուվետի մեջ լցնել 2,6 մլ 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7,0), 0,2 մլ ցորենի հոմոգենատի վերնատվածք (էջ 24), 0,1 մլ 25 մՄ կալիումի ֆերոցիանիդ, խառնել և ռեակցիան խթանելու նպատակով ավելացնել 0,1 մլ 15,4 մՄ ջրածնի պերօքսիդ, մորից խառնել և յուրաքանչյուր 15-20 վայրկյան ընդմիջումներով 2 րոպեի ընթացքում գրանցել կլանման ցուցանիշները ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով 400-440 նմ, կամ սպեկտրաֆոտոմետրով 420 նմ ալիքի երկարության պայմաններում: Կլանման ցուցանիշները գրանցել աղյուսակ 2-ում, կազմել կլանման փոփոխության կախվածությունը ռեակցիայի տևողությունից արտահայտող գրաֆիկ:

Աղյուսակ 2

Պերօքսիդազի առկայությամբ կայունի ֆերոցիանիդի օքսիդացման արգասիքի կլանման մեծության կախումը ռեակցիայի փնտղությունից

Չափումներ	Ռեակցիայի տևողությունը (t), վ.	Կլանումը (D) պայմ. միավ.
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Հաշվարկի մեթոդ

Պերօքսիդազի ակտիվությունը կարելի է որոշել հետևյալ բանաձևով

$$v_o = \frac{dDV_1V_2}{dtPV_3\epsilon l} \quad (\text{մկմոլ/րոպե գ հյուսվածքում})$$

որտեղ

dD-կլանման մեծությունն է, (պայմ. միավոր),

dt-ռեակցիայի տևողությունը, րոպե,

ϵ -մոլային կլանման գործակիցը, $\text{U}^{-1}\text{սմ}^{-1}$ ($\epsilon=1000 \text{ U}^{-1}\text{սմ}^{-1}$),

l- կյուվետի լայնությունը, սմ,

P-բուսական հյուսվածքի զանգվածը, գ,

V1- լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

V2- նմուշի վերջնական ծավալը կյուվետում, մլ,

V3 –վերնստվածքի ծավալը կյուվետում, մլ:

Պերօքսիդազի ակտիվության կախումը միջավայրի pH-ից

Միջավայրի մի շարք գործոններ՝ pH, ջերմաստիճան, ինչպես նաև տարբեր խթանիչներ և արգելակիչներ կարող են ազդել ֆերմենտի ակտիվության վրա: Պերօքսիդազը կենսածին հյուսվածքների ամենատարածված ֆերմենտն է, կատալիզում է սուլֆատրատների առանձին և համատեղ օքսիդացման ռեակցիաները, հանդիսանում է հակաօքսիդանտային համակարգի բաղադրամաս: Պերօքսիդազը դասվում է երկբադադրիչ ֆերմենտների շարքին, որոնց կազմում կա հեմին (եռարժեք երկաթի հետ կոմպլեքս առաջացրած պրոտոպորֆիրին IX) և պոլիպեպտիդային շղթա: Վերջինս իր մեջ ներառում է 203-308 ամինաթթվային մնացորդներ և կախված իզոֆերմենտի բնույթից՝ ձևավորում է կոմպակտ երրորդային կառուցվածք, որը ներկայացած է երկու դոմեններով (մեծ և փոքր): Ֆերմենտն ունի սպիտակուցային գլոբուլին համապատասխանող չափս՝ 50 Å, և պարունակում է 43 % α-պարուրաձև հատվածներ:

Հեմինը ոչ կովալենտ ձևով ամրացած է պոլիպեպտիդային շղթայի խորքում՝ դոմենների միջև, այնտեղ պահվում է հիդրոֆոր կապերով և աղային կամրջակի հաշվին, որն առաջանում է հեմինի պրոպիոնաթթվային մնացորդի և ապոսպիտակուցի ամինոխմբերից մեկի միջև: Հեմինը դարձելի ձևով կարելի է առանձնացնել սպիտակուցից թթվային pH-ի պայմաններում: Ֆերմենտի օպտիմալ ակտիվությունը դիտվում է թթվային pH-ի պայմաններում և կախված է սուլֆատրատի բնույթից:

Հետազոտման օբյեկտ – Յորենի սերմերից ստացված վերնստվածք (էջ 24),

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, ցեմտրիֆուգա, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ Na-ացետատային բուֆեր, pH 4,0; 5,0 և 6,0 (հավելված 4),
2. 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր, pH 7,0 և 8,0 (հավելված 4),
3. 1Մ HCl,

4. 25 մՄ կալիումի ֆերոցիանիդի լուծույթ – 460 մգ աղը լուծել 50 մլ թորած ջրում,
5. 15.4 մՄ ջրածնի պերօքսիդի լուծույթ – պատրաստել սպեկտրաֆոտոմետրով (պայմանական կլանումը 1,12-1,15) 230 նմ ալիքի երկարության տակ ($\varepsilon=72,7 \text{ Մ}^{-1}\text{սմ}^{-1}$):

Աշխատանքի ընթացքը

6 փորձանոթների (որոնցից մեկը ստուգիչ) մեջ հաջորդաբար լցնել 0.2–ական մլ վերնստվածք, 2.6 մլ 0.1 Մ բուֆերային լուծույթներ (pH 4.0; 5.0; 6.0; 7.0 և 8.0), 0.1-ական մլ 4.3 մՄ օ-դիանիզիդինի լուծույթ, խառնել և ռեակցիան սկսելու նպատակով բոլոր փորձանոթների մեջ բացառությամբ ստուգիչ տարբերակի ավելացնել 0.1-ական մլ 15.4 մՄ ջրածնի պերօքսիդի լուծույթ: Ստուգիչ փորձանոթի մեջ ջրածնի պերօքսիդի փոխարեն լցնել թորած ջուր: Նորից խառնել, թողնել 1 թույն և ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով ավելացնել 1-ական մլ 1Մ HCl: Այնուհետև ֆոտոկոլորիմետրիկ եղանակով 460-500 նմ ալիքի երկարության (կանաչ լուսաֆիլտր) տակ չափել լուծույթի կլանումը յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ:

Հաշվարկի մեթոդ

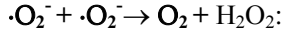
Պերօքսիդազի ակտիվությունը հաշվարկել յուրաքանչյուր փորձանոթում (էջ 44): Կառուցել ֆերմենտի ակտիվության կախումը pH-ից արտահայտող գծապատկեր, որոշել պերօքսիդազի ակտիվության pH օպտիմումը:

5.3.3. ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴԻՍՍՈՒՏԱԶԻ ՊԵՏՐԵՍՏՈՒԿԻ ՍՏԱՅՈՒՄԸ ԵՎ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Սուպերօքսիդիսմուտազը (KΦ 1.15.1.1) (ՍՕԴ) օրգանիզմի հակաօքսիդանտային համակարգի ֆերմենտներից է: Սուպերօքսիդիսմուտազների ընտանիքի մեջ ներառված են մի քանի ֆերմենտներ՝ ցիտոպլազմային Cu, Zn-կախյալ ՍՕԴ, միտոքոնդրիումային Mn-կախյալ ՍՕԴ և արտաբջջային ՍՕԴ: Մարդու սուպերօքսիդիսմուտազի ապո-

ֆերմենտն իրենից ներկայացնում է տետրամեր, որի մոլեկուլային զանգվածը 135 000 Դա է:

Սուպերօքսիդի սմուտագը նվազեցնում է սուպերօքսիդանիոն ռադիկալի կոնցենտրացիան՝ կատալիզելով հետևյալ ռեակցիան



Սուպերօքսիդի սմուտագի ակտիվությունը որոշելու համար օգտագործում են ինչպես ուղղակի, այնպես էլ անուղղակի մեթոդներ: Ուղղակի մեթոդով ֆերմենտի ակտիվության որոշման նպատակով անհրաժեշտ է ստեղծել $\cdot\text{O}_2^-$ -ի բարձր կոնցենտրացիա, ինչը դժվար է իրագործել, ուստի առավել հաճախ կիրառում են ՍՕԴ-ի ակտիվության որոշման անուղղակի մեթոդներ, երբ սուպերօքսիդանիոն ռադիկալը գեներացվում է անընդհատ հոսքով, օրինակ հիմնային միջավայրում ադրենալինի կամ կվերցետինի ինքնաօքսիդացման ժամանակ:

Ֆերմենտային պատրաստուկի ստացումը

Հետազոտման օբյեկտ – Առնետի լյարդ

Անջատման միջավայր

0,25 Մ սախարոզ, 0,5 մՄ ԷԴ-SU, 5 մՄ տրիս-HCl բուֆեր (pH 7,2)

Աշխատանքի ընթացքը

Լյարդը կշռել, լվանալ սառեցված անջատման միջավայրով, մկրատով մանրացնել և հոմոգենիզացնել 0,25 Մ սախարոզի վեցապատիկ ծավալի լուծույթով: Հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 52 000 g արագությամբ 60 րոպե:

Նստվածքը թափել, իսկ վերնստվածքը ենթարկել ջերմային մշակման 60° C ջերմաստիճանում 2 րոպե տևողությամբ: Առաջացած նրստվածքը հեռացնելու նպատակով ստացված զանգվածը ցենտրիֆուգել 9000 g արագությամբ 25 րոպե: Վերնստվածքում որոշել սպիտակուցի քանակությունը Բիուրետի եղանակով (հավելված 3):

Սուպերօքսիդիդիսմուտազի ակտիվության որոշումը ադրենալինի ինքնաօքսիդացման գործընթացի ժամանակ

Սուպերօքսիդիդիսմուտազի ակտիվության որոշման մեթոդի հիմքում ընկած է ադրենալինի ինքնաօքսիդացման ինտենսիվության չափումը, որը հրահրվում է սուպերօքսիդ ռադիկալներով, որոնք առաջանում են հիմնային միջավայրում մետաղների հետքերի հետ ադրենալինի փոխազդեցությունից: Սուպերօքսիդիդիսմուտազը արգելակում է այդ գործընթացը՝ փոխազդելով թթվածնի մեկ էլեկտրոնային վերականգնման արգասիքների հետ: Օքսիդացած ադրենալինի քանակը գնահատվում է 347 նմ ալիքի երկարության պայմաններում ադրենալինի օքսիդացման արգասիքի կլանման մաքսիմումով (A).

Հետազոտման օբյեկտ – Սուպերօքսիդիդիսմուտազի պատրաստուկ, 35 մկՄ

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, սպեկտրաֆոտոմետր, ցենտրիֆուգա, կոլբաներ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. Բիկարբոնատային բուֆեր, 0,2 Մ, pH 10,65

2. ադրենալինի 1 % լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը – Պատրաստել ստուգիչ և փորձնական տարբերակներ: Որպես փորձնական նմուշ սպեկտրաֆոտոմետրի կյուվետի մեջ լցնել 1,8 մլ բիկարբոնատային բուֆեր, 0,1 մլ ՍՕԴ-ի պատրաստուկ (վերջնական կոնցենտրացիան 1,75 մկՄ) և լավ խառնել: Չափել նմուշի օպտիկական խտությունը 347 նմ ալիքի երկարության պայմաններում (ելակետային օպտիկական խտությունը համարել 0,000 միավոր): Կյուվետի մեջ ավելացնել 0,1 մլ ադրենալինի լուծույթ (ռեակցիայի սկիզբ), արագ խառնել և սկսել ռեակցիայի ժամանակի հաշվարկը: Լուծույթի օպտիկական խտությունը չափել 3 թույլի ընթացքում 20 վայրկյան ընդմիջումներով:

Նման ձևով չափել նաև ստուգիչ նմուշի օպտիկական խտությունը՝ ադրենալինի ինքնօքսիդացման ինտենսիվությունը գնահատելով

առանց արգելակիչի առկայության, որը ՍՕԴ-ի լուծույթի փոխարեն պարունակում է 0,1 մլ թորած ջուր:

Սուպերօքսիդի սնմուտազի ակտիվությունը գնահատել ըստ ադրենալինի ինքնաօքսիդացման ռեակցիայի արագության արգելակման աստիճանի: Ռեակցիայի արագության արգելակման աստիճանը (%) հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$\text{Արգելակման (\%)} = (1 - \Delta D_{\text{փ}} / \Delta D_{\text{ստ}}) * 100\%,$$

որտեղ,

$\Delta D_{\text{փ}}$ – փորձական նմուշի 0 և 3 թույեների ժամանակ գրանցված օպտիկական խտությունների տարբերությունն է

$\Delta D_{\text{ստ}}$ – ստուգիչ նմուշի 0 և 3 թույեների ժամանակ գրանցված օպտիկական խտությունների տարբերությունն է:

5.3.4. ԼՅԱՐԳԻ ՈՒՐՈԿԱՆԻՆԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ուրոկանինազը լյարդի մասնագիտացված ֆերմենտներից է, որը կատալիզում է ուրոկանինաթթվի (իմիդազոլ-4-ակրիլաթթվի) ճեղքումը՝ առաջացնելով գլուտամինաթթու և մի շարք այլ արգասիքներ: Արյան մեջ ուրոկանինազի որոշումը հետաքրքրություն է ներկայացնում լյարդի և լեղուղիների հիվանդությունների տարբերակված ախտորոշման և կանխորոշման տեսակետից:

Ֆերմենտի ակտիվությունը գնահատելու համար կոլորիմետրիկ եղանակով որոշում են ուրոկանինաթթվի քանակը ֆերմենտի հետ ինկուբացումից առաջ և հետո: Մեթոդի հիմքում ընկած է Պաուլի ռեակցիան՝ ուրոկանինաթթվի և սուլֆանիլալին թթվի փոխազդեցությունը հիմնալին միջավայրում, որի արդյունքում գոյանում են գունավոր արգասիքներ:

Հետազոտման օբյեկտ – առնետի լյարդ,

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – թերմոստատ, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, հավանգ, փորձանոթներ, պլպետներ,

Ռեակտիվներ

1. K-ֆոսֆատային բուֆեր, 0.02 Մ, (pH 7.2)
2. Ուրոկանինաթթվի 0.01 Մ լուծույթ
3. 96% էթիլ ալիքտ
4. Na_2CO_3 -ի հազեցած լուծույթ
5. Դիագնոստիկական –սուլֆանիլային թթվի և NaNO_2 -ի լուծույթների 1:2 հարաբերությամբ խառնուրդ
6. Ացետատային բուֆեր, 3 Մ (pH 4.8)

Աշխատանքի ընթացքը

1. Ֆերմենտային պատրաստուկի ստացումը

Հյուսվածքային լուծամզվածքի ստացման նպատակով 1-2 գ լյարդը մանրացնել, տրորել հավանգում կամ ապակյա ավազով 2-3 մլ 0.02 Մ K-ֆոսֆատային բուֆերում (pH 7.2): Այնուհետև հոմոգենատը նոսրացնել նույն բուֆերով 20 անգամ: Չքայքայված բջիջների և հյուսվածքի մնացորդների հեռացման նպատակով հոմոգենատը ցենտրիֆուգել կամ ֆիլտրել թղթյա ֆիլտրով: Ստացված լուծամզվածքը կարելի է պահել 1-2 օր -4°C մինչև -8°C ջերմաստիճանում:

2. Ուրոկանինազի ակտիվության որոշումը

3 տարբեր փորձանոթներում պատրաստել ինկուբացիոն խառնուրդներ համաձայն աղյուսակ 3-ի:

Աղյուսակ 3

Ուրոկանինազի ակտիվության որոշումը

Նմուշ	K-ֆոսֆատային բուֆեր (pH 7.2), մլ	Ուրոկանինաթթու, մլ	Ֆերմենտային պատրաստուկ, մլ
Փորձնական	1,7	0,15	0,15
Ստուգիչ 1	1,85	-	0,15
Ստուգիչ 2	1,7	-	0,15

Նմուշներն ինկուբացնել թերմոստատում 37°C ջերմաստիճանում 20 րոպե: Այնուհետև ստուգիչ թիվ 2 փորձանոթում ավելացնել 0,15 մլ ուրոկանինաթթվի 0.01 Մ լուծույթ և անմիջապես բոլոր փորձանոթների

մեջ սպիտակուցների նստեցման նպատակով ավելացնել 0,6 մլ 3 Մ ացետատային բուֆեր (pH 4.8):

Բոլոր փորձանոթները լավ թափահարել և դնել եռացող ջրային բաղնիք 3 րոպե: Սպիտակուցի նստվածքը մնուշներից հեռացնել ֆիլտրելով թղթյա ֆիլտրով:

Գունավորման ռեակցիան իրականացնելու նպատակով սպիտակուցը հեռացնելուց հետո բոլոր մնուշներին ավելացնել 0,5 մլ Na_2CO_3 -ի հազեցած լուծույթ, 0,5 մլ 96% էթիլ սպիրտ և 0,6 մլ թարմ պատրաստված դիագոռեակտիվ: Լուծույթները խառնել սառցե բաղնիքի վրա: Դիագոռեակտիվ ավելացնելուց հետո բոլոր փորձանոթների պարունակությունը ստանում է դեղնա-նարնջագույն գունավորում, որը մի քանի ժամ կարող է պահպանվել շնորհիվ սպիրտի առկայության:

Փորձանոթների պարունակությունը լցնել կյուվետների մեջ և ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով չափել փորձնական և ստուգիչ թիվ 2 մնուշների օպտիկական խտությունները ստուգիչ 1 մնուշի նկատմամբ 450-480 մմ ալիքի երկարության պայմաններում (կապույտ լուսաֆիլտր): Փորձնական և ստուգիչ թիվ 2 (սուբստրատը ավելացվում է ֆերմենտային ռեակցիայի ավարտից անմիջապես առաջ) մնուշներում ուրոկանինաթթվի կոնցենտրացիան որոշել տրամաչափական կորի միջոցով:

3. Ֆերմենտի ակտիվության հաշվարկը

Ուրոկանինազի ակտիվությունը որոշել փորձնական և ստուգիչ թիվ 2 մնուշներում ուրոկանինաթթվի կոնցենտրացիաների տարբերությամբ: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտել ֆերմենտային պատրաստուկում պարունակվող 1 մգ սպիտակուցի հաշվարկով 1 րոպեում ճեղքված ուրոկանինաթթվի մանոմոլերի քանակով:

Հաշվարկի օրինակ – ստուգիչ թիվ 2 մնուշի օպտիկական խտությունը կազմել է 0,60, որը ըստ տրամաչափական կորի համապատասխանում է 82 մմոլ ուրոկանինաթթվի (սուբստրատի ելային քանակ), իսկ փորձնական մնուշի օպտիկական խտությունը 0,36 է, որը համապատասխանում է 49 մմոլ ուրոկանինաթթվի (ֆերմենտի հետ 20 րոպե ինկուբացիայից հետո սուբստրատի մնացորդային քանակ): Սպիտակուցի

պարունակությունը 0,15 մլ ֆերմենտային պրեպարատում հավասար է 0,8 մգ: Որտեղից

$$\text{Ֆերմենտի տեսակարար ակտիվություն} = \frac{82 - 49}{0,8 \times 20} :$$

**5.3.5. ԱՍՊԱՐՏԱՏԱՄԻՆՈՏՐԱՆՍԶԵՐԱԶԻ ԵՎ
ԱԼԱՆԻՆԱՄԻՆՈՏՐԱՆՍԶԵՐԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ**

Տրանսամինացման գործընթացը ներառում է ամինոխմբի միջմոլեկուլային փոխանցումը դոնոր ամինաթթվից ակցեպտոր հանդիսացող α-կետոթթվի վրա առանց միջանկյալ ամոնիակի առաջացման: Տրանսամինազները մեծ քանակով հայտնաբերված են կենդանիների լյարդում, սրտում, մկաններում, երիկամներում: Տրանսամինացման ռեակցիաները հանգուցային դեր են խաղում միջանկյալ նյութափոխանակության գործընթացներում՝ ապահովելով կենդանական օրգանիզմներում ամինաթթուների սինթեզն ու քայքայումը: Օրինակ, գլուտամինաթթուն, ասպարազինաթթուն և ալանինը վերափոխվում են համապատասխան α-կետոթթուների, որոնք հանդիսանում են եռկարբոնատային ցիկլի բաղադրիչ մասեր և կարող են ծառայել որպես էներգիայի աղբյուր: Տրանսամինազների պրոստետիկ խումբը պիրիդօքսալֆոսֆատն է, որն իրականացնում է ամինոխմբի փոխադրումը:

Ասպարտատամինոտրանսֆերազի (ԱսՏ) և ալանինամինոտրանսֆերազի (ԱլՏ) ազդեցությամբ իրականացվող վերաամինացման արդյունքում առաջանում են համապատասխանաբար թրթնջկաքացախաթթու և պիրիդիսադոլաթթու:

Ասպարազինաթթու + α-կետոգլուտարաթթու → թրթնջկաքացախաթթու
+ գլուտամինաթթու

Ալանին + α-կետոգլուտարաթթու → պիրիդիսադոլաթթու + գլուտամինաթթու:

Թրթնջկաքացախաթթուն հետագայում համեմատաբար հեշտությամբ փոխարկվում է պիրոլսադողաթթվի, որը 2.4-դինիտրոֆենիլիդրազինի առկայությամբ հիմնային միջավայրում առաջացնում է պիրոլսադողաթթվի գունավոր հիդրազոն: Հիդրազոնի գունավորման ինտենսիվությունը ուղիղ համեմատական է պիրոլսադողաթթվի կոնցենտրացիային և որոշվում է կոլորիմետրիկ եղանակով:

Հետազոտման օբյեկտ – արյան շիճուկ:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, թերմոստատ, անալիտիկ կշեռք, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր, pH 7,4 (հավելված 4)
2. ԱսS ակտիվության որոշման սուբստրատային լուծույթ (ռեակտիվ 1) - 29.2 մգ α -կետոգլյուտարաթթուն և 2.66 գ D,L-ասպարազինաթթուն լուծել 1 Մ NaOH-ի լուծույթում: NaOH-ի լուծույթը դանդաղ ավելացնել մինչև նստվածքի լրիվ լուծվելը: Լուծույթը տեղափոխել 100 մլ տարողությամբ չափիչ կոլբայի մեջ և 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆերով ծավալը հասցնել մինչև նիշը, խառնել, որոշել pH-ի արժեքը (7,4): Ստացված սուբստրատային լուծույթին ավելացնել 1 կաթիլ քլորոֆորմ և պահել սառցախցիկում:
3. ԱլS ակտիվության որոշման սուբստրատային լուծույթ (ռեակտիվ 2) - 29.2 մգ α -կետոգլյուտարաթթուն և 1.78 գ D,L-ալանինը լուծել այնպես, ինչպես ռեակտիվ 1-ի պատրաստման ընթացքում:
4. Դինիտրոֆենիլիդրազինի լուծույթ – 19.8 մգ դինիտրոֆենիլիդրազինը լուծել քիչ քանակությամբ 1 Մ HCl-ի լուծույթում՝ տաքացնելով ջրային բաղնիքի վրա: Սառեցնելուց հետո ծավալը հասցնել 100 մլ: Լուծույթը թողնել 1 օր, ֆիլտրել և պահել (մինչև 1 տարի) սառնարանում մուգ ապակյա տարայով:
5. 0.4 Մ NaOH -ի լուծույթ:

6. Պիրոլիսադողաթթվային նատրիումի 1 մՄ ստանդարտ լուծույթ - 11 մգ նատրիումի պիրուվատը (սպիտակ գույնի) լուծել 100 մլ տարողությամբ չափիչ կուլբայի մեջ և ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև միշը: Ստանդարտ լուծույթը օգտագործել տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով:

Աշխատանքի ընթացքը

Տրամաչափական կորի կառուցումը

Տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով նատրիումի պիրուվատի ստանդարտ լուծույթը փորձանոթների մեջ լցնել այնպես, ինչպես ցույց է տրված աղյուսակ 4-ում: Յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ ավելացնել 0.5 մլ դինիտրոֆենիլհիդրազինի լուծույթ, ինկուբացնել 20 րոպե, ավելացնել 5 մլ 0.4 Մ NaOH: Չափել նմուշների կլանումը ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով կանաչ լուսաֆիլտրով (530 մմ)՝ համեմատելով ստուգիչ նմուշի հետ, որը նատրիումի պիրուվատի փոխարեն պարունակում է թորած ջուր:

Աղյուսակ 4

Տրանսամինազների ակտիվության որոշման տրամաչափական կորի կառուցման համար անհրաժեշտ նմուշների բաղադրությունը

Փորձանոթներ	Նատրիումի պիրուվատի ստանդարտ լուծույթ, մլ	Թորած ջուր, մլ	Կլանումը (D, պայմ. միավոր)	Տրանսամինազների ակտիվությունը 1 մլ արյան շիճուկում 1 ժամ ինկուբացնելիս մկմոլ/ժամ	
				ԱսՏ	ԱլՏ
1	0.05	0.55		0.5	1.0
2	0.10	0.50		1.0	2.0
3	0.10	0.45		1.5	3.0
4	0.20	0.40		2.0	4.0
5	0.25	0.35		2.5	5.0

Տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով օրդինատների առանցքի վրա տեղադրել լուծույթի կլանման արժեքները (D, պայմ. միավոր), իսկ աբսցիսների առանցքի վրա՝ 1 մլ արյան շիճուկում 1 ժամ ինկուբացման ընթացքում դրան համապատասխանող ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտված մկմոլ/ժամ (v, մկմոլ/ժամ):

Ամինոտրանսֆերազների ակտիվության որոշումը արյան շիճուկում: Արյան շիճուկում ԱսՏ և ԱլՏ ակտիվությունները որոշելու նպատակով մնուշներում ռեակտիվները լցնել աղյուսակ 5-ում ներկայացված հաջորդականությամբ:

Փորձնական և ստուգիչ մնուշները խառնել, ինկուբացնել թերմոստատում 37°C ջերմաստիճանում ԱսՏ-ի դեպքում 1 ժամ, իսկ ԱլՏ-ի դեպքում 30 րոպե տևողություններով: Այնուհետև բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 0.5 մլ դինիտրոֆենիլհիդրազինի լուծույթ և հիդրազոնի առաջացման նպատակով 20 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 5 մլ 0.4M NaOH, խառնել և գունավորման առաջացման նպատակով թողնել ևս 10 րոպե: Նմուշների օպտիկական խտությունը կոորիմետրել կանաչ լուսաֆիլտրով (500-560 նմ) ստուգիչ մնուշի դիմաց:

Աղյուսակ 5

Ամինոտրանսֆերազների ակտիվության որոշման նպատակով անհրաժեշտ մնուշների բաղադրությունը

Ռեակտիվներ	ԱսՏ		ԱլՏ	
	Փորձնական	Ստուգիչ	Փորձնական	Ստուգիչ
Սուրստրատ, մլ	0.5	0.5	0.5	0.5
Արյան շիճուկ, մլ	0.1	-	0.1	-
Թորած ջուր, մլ	-	0.1	-	0.1
Կլանումը (D, պայմ. միավոր)				

Հաշվարկի մեթոդ – ԱսՏ և ԱլՏ ակտիվությունները որոշել տրամաչափական կորով:

5.3.6. ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Օրգանիզմում սպիտակուցների հիդրոլիզն ընթանում է պրոտեազների մասնակցությամբ և որպես հիդրոլիզի վերջնական արգասիք առաջանում են ամինաթթուներ:

Պրոտեազների (պեպտիդիդրոլազներ) ակտիվության որոշման հիմքում ընկած է թիրոզինի (կամ թիրոզին պարունակող պեպտիդների) քանակի որոշումը, որն անջատվում է պրոտեազներով սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթների (հեմոգլոբին, կազեին, ալբումին) հիդրոլիզի արդյունքում: Չճեղքված սպիտակուցը նստեցնում են եռլորթաքայլաթթվով և ֆիլտրում: Ֆիլտրատում պարունակվող թիրոզինի հետ Ֆոլինի ռեակտիվը տալիս է գունավորման ռեակցիա, լուծույթի օպտիկական խտությունը չափվում է ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով 280 նմ ալիքի երկարության տակ:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (ՊԱ) դա ֆերմենտի սպիտակուցները մինչև պեպտիդներ կամ ամինաթթուներ կատալիզելու ընդունակությունն է: Որպես պրոտեոլիտիկ ակտիվության միավոր ընդունվում է ֆերմենտի այն քանակը, որը 1 րոպեում 30°C ջերմաստիճանում 1 մկմոլ քանակով թիրոզինին համապատասխանող կազեինը լրիվ հիդրոլիզում է (1 մկմոլ թիրոզինը հավասար է 0,181 մգ), ակտիվությունը արտահայտվում է 1 մգ սպիտակուցում ֆերմենտային միավորներով (E/մգ):

Սնկային և բակտերիալ պրոտեազների ակտիվությունները որոշում են pH-ի հետևյալ արժեքների դեպքում.

pH 2,3 - 5,7 –թթվային պրոտեազներ

pH 7,0 - 7,4 - չեզոք պրոտեազներ

pH 9,3 - 9,7 –հիմնային պրոտեազներ:

Չեզոք պրոտեազների ակտիվության որոշումը

Մեթոդի հիմքում ընկած է հետազոտվող ֆերմենտային պատրաստուկի ազդեցությամբ կազեինի հիդրոլիզը և չհիդրոլիզված սպիտակուցի նստեցումը Ե.Զ.Զ-ով:

Հետազոտվող սուբստրատ – 2% կազեինի լուծույթ – 2 գ կազեինը լուծել (30 րոպե եռացնելով ջրային բաղնիքում) 90 մլ ունիվերսալ բուֆերում (pH 7,2): Եթե լուծույթի pH-ը ցածր է 7,2-ից, այն կարելի է կարգավորել կաթիլներով 1 Մ NaOH ավելացնելով: Այնուհետև ստացված լու-

ծույթը տեղափոխել 100 մլ չափիչ կոլբայի մեջ և ծավալը նույն բուֆերով հասցնել 100 մլ-ի:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ pH-մետր, ջրային բաղնիք, Ֆոտոկոլորիմետր, պիպետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ ունիվերսալ բուֆերային խառնուրդ

Լուծույթ Ա - 0,1 Մ քացախաթթվի լուծույթ - 5,7 մլ սառցային քացախաթթուն լուծել թորած ջրում և ծավալը հասցնել 1 լ:

Լուծույթ Բ - 0,1 Մ ֆոսֆորական թթվի լուծույթ - 6,45 մլ ֆոսֆորական թթուն լուծել թորած ջրում և ծավալը հասցնել 1 լ:

Լուծույթ Գ - 0,1 Մ օրթոֆորաթթվի լուծույթ - 6,18 գ օրթոֆորաթթուն լուծել թորած ջրում և ծավալը հասցնել 1 լ

Լուծույթ Դ- 1 Մ նատրիումի հիդրօքսիդի լուծույթ - 40 գ NaOH լուծել թորած ջրում և ծավալը հասցնել 1 լ:

Ա, Բ և Գ լուծույթները հաժաաար ծավալներով խառնելու դեպքում ստացվում է բուֆերային խառնուրդ, որի $\text{pH} = 1,8$, իսկ այդ խառնուրդին Դ լուծույթ ավելացնելիս կարելի է ստանալ pH տարբեր արժեքներով (1,8 - 12,0) բուֆերային լուծույթներ:

2. Ֆերմենտային պատրաստուկի աշխատանքային լուծույթ (ռեակցիոն խառնուրդի pH 7,0 - 7,4) – 0,1-1,0 գ հետազոտվող ֆերմենտային պատրաստուկը (պեպսին) ապակյա ձողիկով լուծել բաժակի մեջ քիչ քանակի 0,1 Մ ունիվերսալ բուֆերում (pH 7,2): Ստացված լուծույթը տեղափոխել 100 մլ չափիչ կոլբայի մեջ և ծավալը նույն բուֆերով հասցնել 100 մլ-ի: Հետագա բոլոր մուսրացումները կատարել նույն բուֆերով:

Ֆերմենտային հիդրոլիզի իրականացման պայմանները – Նախքան հիդրոլիզն իրականացնելը սուբստրատի և ֆերմենտի լուծույթները թողնել թերմոստատում 30°C ջերմաստիճանում: Հիդրոլիզն իրականացնելու նպատակով 1 մլ սուբստրատին ավելացնել 1մլ ֆերմենտի լուծույթ, խառնել և 10 րոպե պահել թերմոստատում 30°C ջերմաստիճանում: Ռեակցիան կանգնեցնելու և սուբստրատի չիիդրոլիզված մասը նստեց-

նելու նպատակով ավելացնել 2 մլ 5% ԵԶԲ-ի լուծույթ, պահել 20 րոպե 30⁰ C ջերմաստիճանում և ֆիլտրել: Ֆերմենտի քանակը պետք է հաշվարկել այնպես, որ առկա լինի սուբստրատի մեծ ավելցուկ և կոլորիմետրման ժամանակ չեզոք պրոտեազների համար չափվող օպտիկական խտությունները ընկած լինեն 0,2-0,6 տիրույթում: Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշել ֆերմենտի աշխատանքային լուծույթների տարբեր նոսրացումների համար (5-8 կետեր):

Աշխատանքի ընթացքը – Համապատասխան փորձանոթների (5-8) մեջ լցնել 1-սական մլ սուբստրատ և դնել 30⁰ C թերմոստատի մեջ: 10 րոպե հետո յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ լցնել համապատասխան նոսրացումով 1 մլ ֆերմենտային լուծույթ, թափահարել և իրականացնել հիդրոլիզ 10 րոպե 30⁰ C ջերմաստիճանում: Ժամանակը լրանալուց հետո հիդրոլիզը դադարեցնելու, սպիտակուցը և ռեակցիայի բարձրամոլեկուլային արգասիքները մատեցնելու նպատակով ավելացնել 2 մլ 5% ԵԶԲ: Արագ խառնել և լրիվ մատեցումն ապահովելու նպատակով փորձանոթները ևս 10 րոպե թողնել 30⁰ C թերմոստատում, այնուհետև ֆիլտրել: Ֆիլտրատը պետք է լինի լրիվ թափանցիկ: Ֆիլտրատների օպտիկական խտությունները որոշել սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով 280 նմ ալբի երկարությամբ, ստուգիչի դիմաց, 10 մմ հաստությամբ կյուվետներով:

Ստուգիչ տարբերակը պատրաստել ռեակտիվները լցնելով հակառակ հաջորդականությամբ: 1 մլ ֆերմենտային լուծույթին (նույն նոսրացման աստիճանով ինչ և փորձնական տարբերակը) ավելացնել 2 մլ 5% ԵԶԲ, թողնել 30⁰ C թերմոստատում 10 րոպե, ապա ավելացնել 1 մլ սուբստրատ և ևս 20 րոպե թերմոստատում թողնելուց հետո ֆիլտրել:

Տրամաչափական կորի կառուցումը – պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշման նպատակով անհրաժեշտ է կառուցել տրամաչափական կոր և կորի միջոցով գտնել թիրոզինային համարժեքը, այսինքն այն օպտիկական խտությունը, որը կունենար 1 մկմոլ թիրոզին պարունակող 1 մլ ստանդարտ լուծույթը: Այդ համարժեքը անհրաժեշտ է հաստատել յուրաքանչյուր սպեկտրաֆոտոմետրի համար: Կորի կառուցման նպատակով պատրաստել 0,001 Մ կոնցենտրացիայով թիրոզինի լուծույթ հետ-

կյալ կերպ: 181,19 մգ մաքուր քիթոզինը լուծել 1 լ տարողությամբ 0,2 Մ աղաթթու պարունակող չափիչ կոլբայի մեջ: Ստացված ելային լուծույթից պատրաստել քիթոզինի տարբեր կոնցենտրացիաների լուծույթներ՝ 0,02 մկնչև 0,3 մկմոլ: Չոր կյուվետների մեջ լցնել 3-ական մլ քիթոզինի տարբեր կոնցենտրացիաների լուծույթներ և որոշել դրանց օպտիկական խտությունները 280 նմ ալիքի երկարության տակ թորած ջրի դիմաց 10 մմ հաստությամբ կյուվետներով:

Անհրաժեշտ է պատրաստել քիթոզինի 2 տարբեր լուծույթներ և դնել 2 զուգահեռ փորձեր: 2 փորձերի արդյունքում ստացված տվյալների միջին արժեքներով կառուցել տրամաչափական կոր՝ օրդինատների առանցքին տեղադրելով քիթոզինի քանակները (c մկմոլ/մլ), իսկ աբսցիսների առանցքին՝ համապատասխան օպտիկական խտությունները (D) արժեքները:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվության հաշվարկը – ֆերմենտային լուծույթի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (ՊԱ) արտահայտված E/մլ-ով հաշվել հետևյալ բանաձևով

$$\text{ՊԱ} = \frac{D \cdot V}{T_E \cdot 10 \cdot V_e} \text{ E/մլ}$$

որտեղ,

D - օպտիկական խտությունն է,

T_E - տրամաչափական կորով որոշվող քիթոզինային համարժեքը, մկմոլ/մլ,

10 - սուբստրատի հիդրոլիզի տևողությունը, րոպե,

V_e - հիդրոլիզի նպատակով վերցված ֆերմենտային լուծույթի ծավալը, մլ,

V – ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը ԵԶՔ ավելացնելուց հետո, մլ:

Այս բանաձևով հաշվել 5-8 տարբեր նոսրացումներով 1 մլ ծավալով ֆերմենտային լուծույթի ակտիվությունը: Որոշել ելային աշխատանքային ֆերմենտային լուծույթում և 5-8 նոսրացված լուծույթներում սպիտակուցի քանակը Լոուրիի մեթոդով (հավելված 3): Կառուցել ֆերմենտի

ակտիվության (արագության) կախումը լուծույթի սպիտակուցի քանակից արտահայտող կոր: Աբսցիսների առանցքի վրա տեղադրել սպիտակուցի քանակը (մգ/մլ), իսկ օրդինատների առանցքի վրա՝ համապատասխան պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (E/մլ):

Պարզելով սպիտակուցի այն քանակը, որի դեպքում ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը համեմատական է ռեակցիոն միջավայրում ֆերմենտի կոնցենտրացիային հաշվել տեսակարար ակտիվությունը (E/մգ):

$$\mathbf{\Phi U_{տես.} = \Phi U / c (E/մգ)}$$

որտեղ, c –պրոտեոլիզի նպատակով վերցված 1 մլ ֆերմենտային լուծույթում պարունակվող սպիտակուցի քանակն է (մգ):

5.3.6.1. ԳՈՒՆԱՎՈՐ ԼՈՒՇՈՒՅԹՆԵՐԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Գունավորում ունեցող ֆերմենտային պատրաստուկների պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշման ժամանակ ԵԲԶ-ով նստեցնելուց հետո կարող է ստացվել գունավորված ֆիլտրատ: Այդ դեպքում կազեինի հիդրոլիզի արգասիքների որոշումը պետք է իրականացնել Ֆոլինի ռեակտիվի (հավելված 1) օգնությամբ:

Աշխատանքի ընթացքը – մնուշները պատրաստել ինչպես 5.3.1 աշխատանքում: Ֆերմենտային ռեակցիան կանգնեցնել 2 մլ 5% ԵԲԶ-ով, խառնել և 10 րոպե պահել թերմոստատում չհիդրոլիզված սպիտակուցի լրիվ նստեցման նպատակով, ապա ֆիլտրել: Գունավոր ֆիլտրատից վերցնել 1 մլ, ավելացնել 5 մլ 0,5 Մ Na_2CO_3 և 1 մլ Ֆոլինի ռեակտիվ (նուսրացված 1:3), պահել մթության մեջ 20 րոպե և ֆոտոկլորիմետրել 670 նմ ալիքի երկարությամբ, 10 մմ հաստությամբ կյուվետներով, ստուգիչի դիմաց:

Ստուգիչ մնուշը պատրաստել ռեակտիվներն ավելացնելով հակառակ հաջորդականությամբ՝ 1 մլ ֆերմենտային լուծույթին (փորձնական մնուշին համապատասխանող նոսրացման աստիճանով) ավելացնել 2 մլ

5% ԵԶԶ, հետո ավելացնել 1 մլ սուրստրատ, 10 րոպե թողնել թերմոստատում և ֆիլտրել:

ՊԱ և ՊԱ_{տես.} ակտիվությունները հաշվել այնպես, ինչպես 5.3.1 աշխատանքում՝ նախապես կառուցելով թիրոզինի տրամաչափական կոր և կորի միջոցով որոշել թիրոզինի մոլային կլանման էքստինկցիայի գործակիցը (մկմոլ/մլ):

5.3.6.2. ԹԹՎԱՅԻՆ ՊՐՈՏԵԱՋՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄՆ ԱՆՍՈՐԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Մեթոդի հիմքում ընկած է հետազոտվող ֆերմենտային պատրաստուկի ազդեցությամբ հեմոգլոբինի հիդրոլիզը և չհիդրոլիզված սպիտակուցի նստեցումը ԵԶԶ-ով:

Հետազոտվող սուրստրատ – հեմոգլոբինի 1 % լուծույթ (պատրաստված Ֆոսֆատ-լիմոնաթթվային բուֆերում, pH 2,2)

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, թերմոստատ, ֆոտոկոլորիմետր, կոլբաներ, պիպետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. Ֆոսֆատ-լիմոնաթթվային բուֆեր pH 2,2 (196 մլ 0,1 Մ լիմոնաթթվի լուծույթը խառնել նատրիումի հիդրոֆոսֆատի 4 մլ 0,2 Մ մլ լուծույթի հետ):
2. Ացիդին-պեպսինի 1 % (պրեպարատի 4 հաբերը լուծել 100 մլ ջրում) կամ պեպսինի 0,1 % լուծույթ պատրաստված 0,2 % աղաթթվում (4,5 մլ խիտ աղաթթուն նոսրացնել, ծավալը հասցնելով 1 լ):
3. Na_2CO_3 (կամ NaOH) 0,5Մ լուծույթ:
4. ԵԶԶ-ի 5 % լուծույթ:
5. 1 մլ-ում 500 մկմոլ թիրոզին պարունակող լուծույթ տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով (4,53 մգ թիրոզինը լուծել 50 մլ 0,2% աղաթթվի մեջ):

6. Ֆոլինի ռեակտիվ (հավելված 1) – նոսրացնել 1:2 հարաբերությամբ:

Աշխատանքի ընթացքը – 2 փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ հեմոգլոբինի լուծույթ և 1,5-ական մլ Ֆոսֆատա-լիմոնաթթվային բուֆեր (pH 2,2), խառնել, փորձանոթները 5 թույն տեղադրել 37-38°C թերմոստատի մեջ: Միաժամանակ թերմոստատում պահել մաս պեպսինի լուծույթը: 5 թույն անց փորձանոթներից մեկի մեջ (ստուգիչ) ավելացնել 5 մլ 5 % ԵԲԲ և խառնել: 2 փորձանոթների մեջ ավելացնել թերմոստատում տեղադրված 0,5 մլ ալիդին-պեպսին (կամ պեպսին), պարունակությունը խառնել և փորձանոթները 30 թույն տեղադրել 37-38° C թերմոստատում: Ինկուբացումից հետո փորձնական մուշին ավելացնել 5 մլ 5 % ԵԲԲ և թողնել թերմոստատում 10-15 թույն չճեղքված սպիտակուցի և ֆերմենտի մատեցման նպատակով: 2 փորձանոթների պարունակությունը ֆիլտրել և թափանցիկ ֆիլտրատում որոշել ֆերմենտային հիդրոլիզի արգասիք հանդիսացող թիրոզինի (կամ թիրոզին պարունակող պեպտիդների) քանակը: ԵԲԲ-ն չի մատեցնում սպիտակուցի ճեղքման արգասիքը:

2 մաքուր փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ ֆիլտրատ համապատասխանաբար ստուգիչ և փորձնական տարբերակներից: Յուրաքանչյուրի մեջ դանդաղ ավելացնել 5 մլ 0,5 M Na_2CO_3 (կամ NaOH) լուծույթ և 1-ական մլ նոսրացված Ֆոլինի ռեակտիվ: Փորձանոթների պարունակությունը խառնել, 20 թույն թողնել սենյակային ջերմաստիճանում, այնուհետև ստուգիչ և փորձնական տարբերակների գունավորման ինտենսիվությունները չափել ֆոտոլեկտրակոլորիմետրով (կարմիր լուսաֆիլտր): Նմուշներում թիրոզինի քանակը որոշել տրամաչափական կորի միջոցով:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը արտահայտել 1 թույնում 1 մգ սպիտակուցում (կամ 1 մլ ֆերմենտային լուծույթում) անջատված թիրոզինի մգ-ների (կամ մկմոլերի) քանակով՝ հաշվի առնելով այն, որ ինկուբացիայի տևողությունը կազմել է 30 թույն:

Եզրակացություններ – գրանցել հետազոտության արդյունքները և եզրակացություն անել ֆերմենտային պատրաստուկի ակտիվության վերաբերյալ:

5.3.6.3. ՏՐԻՊՍԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվում է կազեինի ճեղքման արգասիք հանդիսացող թիրոզինի քանակով: Որպես թիրոզինի հայտնաբերման ազդանյութ օգտագործվում է ֆենոլային ռեակտիվը (Ֆոլինի ռեակտիվ), որը թիրոզինի հետ առաջացնում է կապույտ գունավորում, իսկ վերջինիս ինտենսիվությունը որոշվում է կոլորիմետրիկ եղանակով:

Հետազոտվող սուբստրատ – 0,4 % կազեինի լուծույթ պատրաստված 0,2 Մ նատրիումի ալբումինատում

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH–մետր, ջրային բաղնիք, ֆոտոկոլորիմետր, կուբաներ, պլիպետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. 1/15 (0,067 Մ) ֆոսֆատային բուֆեր pH 8 (KH_2PO_4 - 9.07 գ/լ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ -23.87 գ/լ): pH 8 բուֆերի ստացման նպատակով NaH_2PO_4 –ի և KH_2PO_4 –ի լուծույթները խառնել 95 : 5 ծավալային հարաբերությամբ,
2. 10 % ԵԶԸ–ի լուծույթ,
3. NaOH –ի 0,5 Մ լուծույթ,
4. ֆենոլային ռեակտիվ (Ֆոլինի ռեակտիվ):

Աշխատանքի ընթացքը

1. երկու փորձանոթներում պատրաստել ինկուբացիոն խառնուրդներ համաձայն աղյուսակ 6-ի:

Աղյուսակ 6

Տրիպսինի պրոպերտիզիկ ակտիվության որոշումը

Նմուշ	Կազեինի լուծույթ, մլ	Ֆոսֆատային բուֆեր, մլ	ԵԲԲ-ի լուծույթ, մլ	Տրիպսինի լուծույթ, 1 մգ/մլ
Փորձնական	1	1,5	-	0,5
Ստուգիչ	1	1,5	3	0,5

2. Նմուշները լավ խառնել և ինկուբացնել 37°C –ում 20 րոպե: Ինկուբացումից հետո փորձնական նմուշի մեջ ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով ավելացնել 3 մլ ԵԲԲ-ի լուծույթ: 5-10 րոպե հետո նմուշները ֆիլտրել:
3. 2 առանձին փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական մլ NaOH–ի լուծույթ, դրանցից մեկի մեջ ավելացնել 2,5 մլ փորձնական նմուշի ֆիլտրատ, մյուսի մեջ՝ 2,5 մլ ստուգիչ նմուշի ֆիլտրատ: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 0,5-ական մլ ֆենոլային ռեակտիվ: Խառնուրդները խառնել և 20 րոպե հետո առաջացած կապույտ գունավորման ինտենսիվությունը չափել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով 630-690 նմ ալիքի երկարության տակ 1 սմ հաստությամբ կյուվետով ստուգիչի դիմաց: Տրամաչափական կորի միջոցով որոշել կազեինի ֆերմենտային հիդրոլիզի արդյունքում լուծույթում առաջացած թիրոզինի քանակության աճը:
4. Տրիպսինի ակտիվությունը որոշել ֆերմենտային միավորներով 1 մլ ֆերմենտի լուծույթում (ընդհանուր ակտիվություն) և 1 մգ սպիտակուցի հաշվարկով (տեսակարար ակտիվություն): Հաշվի առնելով նոսրացումը՝ ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվությունը հաշվել հետևյալ կերպ

$$\frac{\text{Թիրոզինի քանակը, մկմոլ/նմուշ}}{2.5 \text{ մլ} \times 0.5 \text{ մլ} \times 20 \text{ րոպե}} = \text{ակտիվության միավորների քանակը 1 մլ ֆերմենտային լուծույթում:}$$

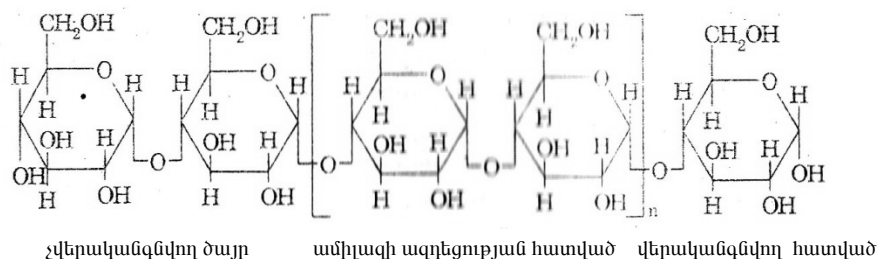
Տեսակարար ակտիվությունը որոշելիս հաշվի առնել, որ ֆերմենտի 1 մլ-ը պարունակում է 0.5 մգ տրիպսին:

5.3.7. ԱՄԻԼԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

5.3.7.1. α -ԱՄԻԼԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ամիլազները ֆերմենտներ են, որոնք պատկանում են հիդրոլազների դասին, կատալիզում են օսլայի և այլ ազգակից պոլիսախարիդների հիդրոլիզը՝ ազդելով ինչպես չփոփոխված սերմերի օսլայի, այնպես էլ եփված սոսնձանման օսլայի վրա: Ընդ որում ամիլազների ազդեցությունը եփված սոսնձանման օսլայի վրա ավելի արդյունավետ է:

α -ամիլազը (α -1,4-D-գլյուկան-գլյուկանահիդրոլազ) կատալիզում է օսլայի α -1,4 գլիկոզիդային կապերի հիդրոլիզը: Օսլայի հիդրոլիզի վերջնական արգասիքներ են համարվում մալտոզը և մալտոտրիոզը:



Նկար 4

Ամիլազի ազդեցությունը օսլայի և ամիլոզի
 α -1,4-գլիկոզիդային կապերի վրա:

Մարդու և կենդանիների մոտ ամիլազի հիմնական աղբյուր են համարվում ենթաստամոքսային գեղձը և բրնձեղձերը: Ֆերմենտի երկու ձևերն էլ կատալիտիկ հատկություններով իդենտիկ են և էլեկտրաֆորետիկ շարժունակությամբ համարյա չեն տարբերվում: Ֆերմենտի pH-օպտիմումը ընկած է 6,5-7,5 սահմաններում: Ամիլազի ակտիվությունը քլորիդ իոնների առկայության պայմաններում բարձրանում է: Ֆերմենտի յուրաքանչյուր մոլեկուլը պարունակում է կալցիումի մեկ իոն, այդ պատճառով էլ ԷԴ-SU-ի, օքսալատի և լիմոնաթթվի առկայությամբ ամի-

լազի ակտիվությունը արգելակվում է, քանի որ այդ միացությունները կապում են կալցիումի իոնները:

Ամիլազի ակտիվության որոշման հիմքում ընկած է գունավոր չլուծվող օսլայի ճեղքումը ամիլազով, որն ուղեկցվում է ջրում լուծվող ներկանյութ համարվող ազատ կապույտի անջատմամբ: Միավոր ժամանակում ազատված ներկանյութի քանակությունը ուղիղ համեմատական է ֆերմենտի ակտիվությանը:

Հետազոտվող սուբստրատ – գունավոր օսլա:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, սպեկտրաֆոտոմետր, ցենտրիֆուգա, մագնիսական խառնիչ, ջերմաչափ, կոլբաներ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. Խիտ բուֆերային լուծույթ (0,1 M NaCl պատրաստված 0,6 M ֆոսֆատային բուֆերում, pH 7),
2. Նստեցնող լուծույթ -1.85 M MgSO₄ պատրաստված 3% ԵԶԶ-ում

Աշխատանքի ընթացքը

1. Սուբստրատի սուսպենզիայի պատրաստումը

50 մլ տարողությամբ չափիչ կոլբայի մեջ լցնել 5 մլ խիտ բուֆերային լուծույթ և ջրով նոսրացնել՝ հացնելով մինչև նիշը: 10 մլ նոսրացված բուֆերային լուծույթը լցնել 50 մլ տարողությամբ բաժակի մեջ, միացնել մագնիսական խառնիչը և դանդաղ ավելացնել 0,1 գ. սուբստրատ (գունավոր օսլա): Խառնելը շարունակել մինչև հոմոգեն սուսպենզիայի առաջացումը (15-20 րոպե): Այս ճանապարհով ստացված սուսպենզիան կարելի է մեկ շաբաթ պահել +1 - +4° C ջերմաստիճանում:

2. α-ամիլազի ակտիվության որոշումը

Փորձնական և ստուգիչ փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ սուբստրատի սուսպենզիա: Փորձանոթները տաքացնել 5 րոպե 37° C ջերմաստիճանում, այնուհետև փորձնական մմուշի մեջ ավելացնել 1 մլ արյան պլազմա (կամ հյուսվածքային վերնստվածք, որտեղ որոշվում է ֆերմենտի ակտիվությունը), իսկ ստուգիչ տարբերակի մեջ՝ 1 մլ թորած ջուր: Փորձանոթների պարունակությունը խառնել և ինկուբացնել 15 րոպե 37° C ջերմաստիճանում, ապա ավելացնել 2 մլ նստեցնող լուծույթ և

խառնել 15 րոպե: Նստվածքը հեռացնելու նպատակով փորձանոթների պարունակությունը ցնտրիֆուգել 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ 5-10 րոպե, վերնստվածքը տեղափոխել 0,5 սմ լայնությամբ կյուվետի մեջ և 590 մմ ալիքի երկարության տակ չափել փորձնական մմուշի օպտիկական խտությունը (D) ստուգիչ տարբերակի դիմաց:

Հաշվարկի մեթոդ – α -ամիլազի ակտիվությունը մմուշում որոշել հետևյալ բանաձևով

$$v=D \cdot 1083 \text{ (E/l)}$$

5.3.7.2. ԱԾԻԿԻ α -ԵՎ β -ԱՄԻԼԱԶՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ըստ հատկությունների, բնության մեջ տարածվածության և օսլայի վրա ազդելու եղանակի տարբերում են α -ամիլազ, β -ամիլազ, գլյուկո-ամիլազ, ամիլոպեկտին-1,6-գլյուկոհիդրոլազ ֆերմենտները: α -ամիլազը (K.Փ. 3.2.1.1.) (1,4- α -D-գլյուկան-գլյուկանհիդրոլազ) պարունակվում է թքի և ենթաստամոքսահյութի կազմում, բորբոսասանկերում, գարու, ցորենի և տարեկանի ծլած սերմերում: α -ամիլազը հիդրոլիզում է օսլայի և դրա ազգակից պոլիսախարիդների α -1,4 գլիկոզիդային կապերը անկանոն ձևով, արդյունքում առաջանում են դեքստրիններ և աննշան քանակությամբ մալթոզ:

α -ամիլազը զգայուն է թթվային միջավայրի նկատմամբ (օպտիմում pH 5,6-6,3) և ջերմակայուն է (ջերմաստիճանային օպտիմումը 65° C):

Ցորենի ալյուրում բարձր α -ամիլազային ակտիվության պատճառով (հաճախ ստացվում է ծլած ցորենի հատիկներից) խմորի մեջ տեղի է ունենում դեքստրինների կուտակում (դեքստրինները խմորասանկերի կողմից չեն խմորվում), ինչը հանգեցնում է հացի որակի (ծակոտկենություն, համ և ալյւն) վատացմանը:

β -ամիլազը (KՓ 3.2.1.2.) (1,4- α -D-գլյուկան-մալտոհիդրոլազ) պարունակվում է չծլած ցորենի, տարեկանի, գարու սերմերում և սոյայի ուն-

դերում, հիդրոլիզում է օսլայի և դրա ազգակից պոլիսախարիդների α -1,4 գլիկոզիդային կապերը՝ հաջորդաբար անջատելով մալթոզի մոլեկուլներ շղթաների չվերականգնող ծայրերից: β -ամիլազը ամիլոզն ամբողջությամբ ճեղքում է մինչև մալթոզ, իսկ ամիլոպեկտինը հիդրոլիզում է՝ առաջացնելով մալտոզ և դեքստրիններ, որոնք յոդի հետ տալիս են կարմրա-դարչնագույն գունավորում (այս դեպքում դեքստրինները ավելի մեծ մոլեկուլային զանգված ունեն, քան α -ամիլազի ճեղքումից առաջացած դեքստրինները): β -ամիլազի ազդեցությունը ընդհատվում է ամիլոպեկտինի ճյուղավորման հատվածներում:

β -ամիլազը առավել ակտիվ է թթվային միջավայրում (օպտիմում pH 4,8), ջերմայաքիլ է (ջերմաստիճանային օպտիմում 51°C): Այս ֆերմենտը խմորի մեջ նպաստում է մալթոզի կուտակմանը, ինչը հանգեցնում է դրա ավելի ինտենսիվ խմորմանը:

Գլյուկոամիլազը (KՓ 3.2.1.3.) կամ էկզո-1,4- α -D-գլյուկոզիդազը (1,4- α -D-գլյուկան-գլյուկոհիդրոլազ) օսլան հիդրոլիզում է առաջացնելով գլխավորապես գլյուկոզ և քիչ քանակությամբ դեքստրիններ: Գլյուկոամիլազի պատրաստուկներ ստանում են բորբոսասնկերից: Այս ֆերմենտի շնորհիվ օսլայից ստանում են բյուրեղային գլյուկոզ:

Ամիլոպեկտին-1,6-գլյուկանոհիդրոլազը (KՓ 3.2.1.41) հիդրոլիզում է ամիլոպեկտինի և գլիկոզենի 1,6- α - գլիկոզիդային կապերը:

Ածիկում (ցորենի, տարեկանի և գարու սերմերի ծիլերում) պարունակվում են ակտիվ α - և β - ամիլազներ, որոնք լավ լուծվում են ջրում, և հետևաբար այդ ֆերմենտներին կարելի է անջատել ջրային լուծամթղվածքի ձևով:

Ածիկի ջրային լուծամթղվածքից α - և β - ամիլազների անջատումը պայմանավորված է նրանով, որ ջերմաստիճանի և միջավայրի pH-ի նկատմամբ այդ ֆերմենտները ունեն տարբեր կայունություն: Ածիկի լուծամթղվածքը մինչև 70°C տաքացնելու դեպքում β -ամիլազը ենթարկվում է քնափոխման, իսկ α -ամիլազը պահպանում է իր նախիվ կառուցվածքն ու ակտիվությունը: β -ամիլազի pH օպտիմումը կազմում է 4,8 այն դեպքում, երբ α -ամիլազի ակտիվություն այդպիսի pH-ի պայմաններում չի

հայտնաբերվում և միջավայրի pH-ը 3,3-ից իջեցնելիս վերջինս բնավոյվում է:

ԱՌԵԿԻ ՋՐԱՅԻՆ ԼՈՒՇԱՄԶՎԱԾՔԻ ՍՏԱՅՈՒՄԸ – 20 գ ածիկը տրորել հավանգում քիչ քանակի ջրով մինչև համասեռ զանգվածի ստացումը, տեղափոխել 100 մլ տարողությամբ չափիչ կոլբայի մեջ, ծավալը հասցնել մինչև նիշը, պարունակությունը խառնել և թողնել սառույցի վրա 2 ժամ (կարելի է մեկ գիշեր թողնել սառնարանում): Ստացված լուծամրգվածքը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ և վերնստվածքն օգտագործել որպես ամիլազի աղբյուր:

α- ԱՄԻԼԱԶԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄԸ – փորձանոթի մեջ լցնել 5 մլ α- և β- ամիլազների պարունակող ածիկի լուծամրգվածք, դանակի ծայրով ավելացնել կալցիումի ացետատի փոշի և փորձանոթը 15 րոպե պահել 68° C ջրային բաղնիքում (տաքացման ընթացքում ջրի ջերմաստիճանը չպետք է բարձր լինի 70° C-ից և ցածր՝ 66° C-ից): Այնուհետև փորձանոթները սառեցնել: Այդպիսի պայմաններում β-ամիլազը լրիվ ինակտիվանում է և ստացված լուծույթում կարելի է որոշել α-ամիլազի ակտիվությունը:

β-ԱՄԻԼԱԶԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄԸ – 50 մլ տարողությամբ կոլբայի մեջ լցնել 5 մլ α- և β- ամիլազների պարունակող ածիկի լուծամրգվածք, ավելացնել 4 մլ ջուր, 1 մլ 0,1 մոլ/լ կոնցենտրացիայով աղաթթու (ստացված խառնուրդի pH-ը պետք է կազմի 3,3): Փորձանոթը 15 րոպե պահել սառույցի վրա (կարելի է թողնել սառնարանի սառցախցիկում): Այդպիսի պայմաններում α-ամիլազը լրիվ ինակտիվանում է, իսկ β-ամիլազը պահպանում է իր ակտիվությունը: 15 րոպե անց փորձանոթի պարունակությանն ավելացնել 2 մլ 0,15 Մ Na_2HPO_4 -ի լուծույթ՝ միջավայրի pH 6,0 հասցնելու նպատակով և լուծույթում որոշել β-ամիլազի ակտիվությունը:

ԱՃԻԿԻ ԱՄԻԼԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

(ըստ հիդրոլիզված օսլայի զանգվածի)

Օսլայի վրա ամիլազի ազդեցությունը կարելի է հայտնաբերել կամ օսլայի քանակի նվազեցմամբ, կամ դրա ճեղքման արգասիքների կուտակմամբ:

Մեթոդի հիմքում ընկած է փորձի նպատակով վերցված և փորձի արդյունքում մնացած չճեղքված օսլաների զանգվածների տարբերության հաշվարկը, որն իրականացվում է յոդի հետ օսլայի առաջացրած գունավորման ռեակցիայի ֆոտոմետրիկ վերլուծությամբ: Փորձի իրականացման ընթացքում ֆերմենտային պատրաստուկի լուծույթի ծավալը և ինկուբացիայի տևողությունը պետք է ընտրել այնպես, որ ֆերմենտ պարունակող փորձնական տարբերակներում օսլան լրիվ չհիդրոլիզվի: Այս մեթոդը թույլ է տալիս հաստատել օսլայի վրա ամիլազների ազդեցության սպեցիֆիկությունը և որոշել նրանց ակտիվությունները: Հիդրոլիզն առավել արդյունավետ է իրականանում ածիկային լուծամզվածքում պարունակվող ամիլազների համատեղ ազդեցության դեպքում:

Հետազոտման օբյեկտ – ածիկի լուծամզվածք, α -ամիլազ պարունակող լուծամզվածք, β -ամիլազ պարունակող լուծամզվածք

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, սպեկտրաֆոտոմետր, ցենտրիֆուգա, թերմոստատ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ.

1. Ացետատային բուֆեր pH 5,5 (57,4 մլ 1M CH_3COOH լուծույթին ավելացնել 50 մլ 1 M NaOH լուծույթ և ընդհանուր ծավալը թորած ջրով հասցնել 500 մլ):
2. Օսլայի 2 % լուծույթ (2 գ լուծելի օսլայով և 20 մլ սառը ջրով պատրաստել սուսպենզա, խառնելով ավելացնել 80 մլ եռացող ջուր, եռացնել 1 րոպե, սառեցնելուց հետո ծավալը հասցնել 100 մլ, խառնել):
3. 1 M աղաթթու:

4. 0,3 % J₂-ի լուծույթ պատրաստված 3 % KJ լուծույթում (0,3 գ բյուրեղային յոդը և 3 գ KJ խառնել 3-5 մլ թորած ջրով և յոդի լուծվելուց հետո ծավալը ջրով հասցնել 100 մլ):

Աշխատանքի ընթացքը

Վերցնել 6 փորձանոթ, որոնցից մեկը՝ ստուգիչ և ռեակտիվները լցնել այնպես, ինչպես ցույց է տրված աղյուսակ 8-ում:

Աղյուսակ 7

Ածիկի ամիլազների ակտիվության որոշումը

№ Նմուշ	Քաղաղրամասեր, մլ	Փորձանոթներ					
		1	2	3	4	5	6
1.	Ածիկի լուծամզվածք	-	0,1	0,2	-	-	-
2.	α-ամիլազ	-	-	-	0,2	0,4	-
3.	β-ամիլազ	-	-	-	-	-	1,0
4.	Ջուր	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	-
5.	Բուֆեր pH 5,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6.	Օսլա, 2%	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Նոսրացում R	-	10	5	5	2,5	2,4

Փորձանոթների պարունակությունը խառնել և թողնել թերմոստատում 37-38⁰ C ջերմաստիճանում 30 րոպե: Փորձի այսափսի դրվածքը թույլ է տալիս ածիկի լուծամզվածքում միաժամանակ որոշել ինչպես ամիլազների գումարային ակտիվությունը (α- և β-ամիլազների ակտիվությունները միասին), այնպես էլ առանձին α- և β-ամիլազների ակտիվությունները: Ինկուբացման ավարտից հետո փորձանոթները հանել թերմոստատից և յուրաքանչյուրի մեջ անմիջապես ավելացնել 2-ական մլ 1Մ աղաթթու և 3-ական կաթիլ յոդի ջրային լուծույթ: Փորձանոթները խառնել: Դեղին գունավորում ունեցող փորձանոթները հեռացնել, իսկ կապույտ, մանուշակագույն և կարմիր գունավորում ունեցող փորձանոթները թողնել հետագա գործողությունների համար (եթե յոդի լուծույթ ավելացնելուց հետո նույն ֆերմենտային պատրաստուկը պարունակող

փորձանոթները կուցենան դեղին գունավորում, ապա փորձը կրկնել՝ ֆերմենտային պատրաստուկը վերցնելով ավելի քիչ քանակությամբ):

Վերցնել 50 մլ տարողությամբ չափիչ կուլբաներ, համարակալել այնպես, ինչպես և փորձանոթները: Յուրաքանչյուր կուլբայի մեջ լցնել 30-40 մլ թորած ջուր, 0,5 մլ 1 Մ աղաթթու, 10 կաթիլ յոդի ջրային լուծույթ և համապատասխան համարակալումով փորձանոթից 0,5 մլ խառնուրդ: Ընդ որում նախքան խառնուրդը վերցնելը փորձանոթների պարունակությունը խառնել: Կուլբայի պարունակության ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև միշը, խառնել և կոլորիմետրել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով (կարմիր լուսաֆիլտր) ջրի դիմաց:

Ամիլազի ակտիվության հաշվարկը

Ամիլազի ակտիվությունը արտահայտել 1 գ ածիկի (կամ այլ աղբյուրի) հաշվարկով 1 թուպեում ճեղքված օսլայի մգ քանակով: Հաշվարկը կատարել հետևյալ կերպ:

1. Հաշվել ճեղքված օսլայի զանգվածը ըստ հետևյալ բանաձևի

$$m = \frac{E_k - E_o}{E_k} C,$$

որտեղ,

m – փորձի ընթացքում ճեղքված օսլայի զանգվածն է, մգ;

E_k – ստուգիչ լուծույթի օպտիկական խտությունն է;

E_o – փորձնական լուծույթի օպտիկական խտությունն է;

C – ներմուծված օսլայի զանգվածն է, մգ (3 մլ 2 % զանգվածային բաժնով օսլայի լուծույթը պարունակում է 60 մգ օսլա);

- ստացված թիվը բազմապատկել R նոսրացման աստիճանով (նայել աղյուսակ 7), այսինքն հաշվարկել ըստ 1 մլ էլային ֆերմենտային լուծամզվածքի և բաժանել ինկուբացման տևողությանը (30 թուպե), ինչը թույլ կտա ամիլազի ակտիվությունն արտահայտել 1 մլ ֆերմենտային լուծամզվածքում 1 թուպեում ճեղքված օսլայի մգ քանակով:

2. Ցանկացած կենսաբանական օբյեկտից անջատված ամիլազի ակտիվությունը կարելի է հաշվել հետևյալ բանաձևով՝

$$A = \frac{(E_k - E_o) \cdot 60 \cdot V}{E_k \cdot V_1 \cdot m \cdot 30},$$

որտեղ,

A –ամիլագի ակտիվությունն է արտահայտված 1 թուպեում 1 գ ածի-
կում (կամ այլ օբյեկտում) ճեղքված օսլայի մգ-ով,

E_k – ստուգիչ լուծույթի օպտիկական խտությունն է,

E_o – փորձնական լուծույթի օպտիկական խտությունն է,

60 – վերցված օսլայի զանգվածն է, մգ (3 մլ 2 % զանգվածային
բաժնով օսլայի լուծույթը պարունակում է 60 մգ օսլա,

V – ածիկի լուծամզվածքի ընդհանուր ծավալն է (100 մլ),

V_1 – ինկուբացման ենթարկված ֆերմենտային պատրաստուկի ծա-
վալն է, մլ,

30 – ինկուբացման տևողությունը, թուպե,

m – ածիկային լուծամզվածքի պատրաստման համար վերցված
ածիկի զանգվածը,

β-ամիլագի ակտիվությունը հաշվելիս անհրաժեշտ է համարիչը
բազմապատկել 2,4 թվով, որը համապատասխանում է β-ամիլագի ան-
ջատման ժամանակ կատարված նոսրացումներին:

5.3.7.3 ԱՄԻԼԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԸՍՏ ՎՈԼԳԵՄՈՒՏԻ

Այս մեթոդը կիրառվում է այն դեպքում, երբ պետք է գտնել ամիլագ
պարունակող հեղուկի (ածիկի լուծամզվածք, թուք, կաթ, արյան շիճուկ և
այլն) այն առավելագույն նոսրացման աստիճանը, որի դեպքում կա-
տարվում է որոշակի քանակով օսլայի լրիվ հիդրոլիզ:

Հետազոտման օբյեկտ – ածիկի լուծամզվածք (էջ 69)

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, սպեկտ-
րաֆոտոմետր, ցենտրիֆուգա, թերմոստատ, կոլբաներ, փորձանոթներ,
պիպետներ:

Ռեակտիվներ.

1. Օսլայի 1 % լուծույթ (1 գ լուծելի օսլայից պատրաստել սուսպենզիա 10 մլ սառը ջրով, ապա խառնելով ավելացնել 90 մլ եռացող ջուր, եռացնել 1 թպե, սառեցնելուց հետո ծավալը հասցնել 100 մլ և խառնել):
2. 10 % ծծմբական թթու (0,5 լ դանդաղ ավելացնել 60,6 մլ խիտ թթու և ծավալը հասցնել 1 լ) կամ 10 % աղաթթու (0,5 լ դանդաղ ավելացնել 236 մլ խիտ աղաթթու և ծավալը հասցնել 1 լ):
3. Յոդի ջրային լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը – վերցնել 7 համարակալված փորձանոթներ և յուրաքանչյուրի մեջ լցնել 1-ական մլ ջուր: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 1 մլ ածիկի լուծամզվածք, խառնել և թիվ 1 փորձանոթից 1 մլ խառնուրդ լցնել թիվ 2 փորձանոթի մեջ, խառնել և դրանից 1 մլ տեղափոխել թիվ 3 փորձանոթի մեջ և այսպես շարունակել: Խառնելուց հետո վերջին փորձանոթից 1 մլ խառնուրդ բափել: Այսպիսով ստացվում է նոսրացումների շարք, որտեղ յուրաքանչյուր հաջորդ փորձանոթում նախորդի համեմատությամբ ածիկային լուծամզվածքի պարունակությունը 2 անգամ ավելի քիչ է:

Այնուհետև յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ ավելացնել 2-ական մլ 1 % օսլայի լուծույթ, թափահարել: Բոլոր փորձանոթները դնել թերմոստատ 37-38°C 30 թպե: Ինկուբացիայի ավարտից հետո յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ ավելացնել 1 –ական մլ 10 % ծծմբական թթվի լուծույթ (ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով) և 3-ական կաթիլ յոդի ջրային լուծույթ: Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 8-ում:

Աղյուսակ 8

Յոդի հեղ ճմուռների գունավորումը ինկուբացումից հետո

	Փորձանոթների համարները և ածիկային լուծամզվածքի բաժինը, մլ						
	1	2	3	4	5	6	7
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Լուծույթի գույնը							

Ընտրել այն փորձանոթները, որտեղ օսլան լրիվ հիդրոլիզվել է (յոդի հետ առաջացրել է դեղին գունավորում) և այդ մմուշներում որոշել ամիլազի ակտիվությունը (ամիլազային թիվ): Ենթադրենք լրիվ հիդրոլիզ կատարվել է 1, 2, 3 և 4 մմուշներում, հետևաբար ամիլազի ակտիվությունը պետք է որոշել 4 փորձանոթով, որտեղ ամիլազի լուծամզվածքի բաժինը 1/16 մլ է: Հաշվելով ճեղքված օսլայի քանակը 1 մլ ամիլազի լուծամզվածքի համար, կստանանք 32 թիվը: Սա նշանակում է, որ 1 մլ չնոսրացված ամիլազի լուծամզվածքը այդ պայմաններում կարող է ճեղքել 32 մլ 1 % օսլայի լուծույթ, այսինքն ամիլազային թիվը կազմում է 32:

Կաթի ամիլազի ակտիվության որոշման ժամանակ նոսրացման աստիճանը նվազեցնել 8-10 անգամ, ինկուբացիայի տևողությունը երկարացնել մինչև 60 րոպե և օգտագործել 0,1 % օսլայի լուծույթ:

5.3.8. ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Արգինազը օրնիտինային ցիկլի վերջին ֆերմենտն է, որը հիդրոլիզում է արգինինը միզանյութի և օրնիտինի: Արգինազն ունի շատ լայն կենսաբանական տարածվածություն: Այն բարձր կոնցենտրացիաներով պարունակվում է ուրեթեյիկ օրգանիզմների լյարդում: Նրա ակտիվությունը հայտնաբերված է երիկամներում, փայծախում, կաթնագեղձերում, սրտամկանում, թոքային հյուսվածքում, կաթնասունների ուղեղում: Արգինազը հայտնաբերված է նաև ոչ ուրեթեյիկ օրգանիզմների որոշ օրգաններում, ինչպես նաև միկրոօրգանիզմների և բույսերի մոտ: Բջջի ներսում արգինազը հիմնականում տեղակայված է հիալոպլազմայում: Ֆերմենտի օպտիմալ pH-ը 9,5 է: Որոշ երկվալենտ իոնները (Mn, Co, Ni, Fe) համարվում են արգինազի խթանիչներ: Սակայն մեծ մասամբ ինտակտ օրգանիզմներում Mn^{2+} իոններն են հանդիսանում արգինազի իրական ակտիվատոր: Արգինազի ակտիվությունը զգալիորեն արգելակվում է ցիտրատային կամ բորատային բուֆերներով, ինչը հավանաբար պայմանավորված է երկվալենտ իոնների կապմամբ:

Արգինազի ակտիվությունը որոշում են որոշ հիվանդությունների կանխորոշման նպատակով, քանի որ հյուսվածքներում սպիտակուցների քայքայման ուժեղացումը (քաղցի, ալոքսանային դիաբետի, B1 վիտամինի անբավարարության դեպքում և այլն) բերում է լյարդում արգինազի ակտիվության բարձրացմանը: Հայտնաբերված է նաև ծանր ժառանգական հիվանդություն, որը պայմանավորված է ֆերմենտի անբավարարությամբ:

Արգինազի ակտիվությունը կարելի է գնահատել երկու եղանակներով.

1. Որոշելով սուբստրատի՝ արգինինի քանակության նվազումը,
2. Որոշելով ռեակցիայի քայքայման արգասիքներից (միզանյութ և օրնիտին) որևէ մեկի քանակությունը:

Միզանյութի քանակը կարելի է որոշել կոլորիմետրիկ եղանակով: Մեթոդի հիմքում ընկած է այն, որ միզանյութը ԴԱՄՕ-ի հետ քիսեմիկարբազիդի և երկաթի աղերի ներկայությամբ թթվային միջավայրում առաջացնում է կարմիր գունավորում ունեցող կոմպլեքս միացություն:

Հետազոտման օբյեկտ – արգինազի պատրաստուկ (լյարդի հոմոգենատ կամ լյարդի ացետոնային փոշու լուծամզվածք):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – pH-մետր, ֆոտոկոլորիմետր, ցենտրիֆուգա, թերմոստատ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. 0.05 Մ գլիցինային բուֆեր (pH-8,0; 9,0; 9,5; 10,0)
2. L-արգինին, 0,07% լուծույթ
3. ԵԶԶ, 5% լուծույթ
4. Գունավոր ռեակտիվ միզանյութի որոշման համար – 30 մլ 0,05% FeCl_3 -ի լուծույթին ավելացնել 20 մլ թորած ջուր, 1 մլ 2,5% ԴԱՄՕ-ի լուծույթ և 0,5 մլ 0,25% քիսեմիկարբազիդ: Պատրաստել անմիջապես օգտագործելուց առաջ:
5. Միզանյութի ստանդարտ լուծույթ - (0,02 մգ/մլ)

Աշխատանքի ընթացքը

Լյարդի հոմոգենատի պատրաստումը – գլխատված կենդանու լյարդը լվանալ 0,9 % նատրիումի քլորիդի սառը լուծույթով: 1-2 գ հյուս-

վածքը մկրատով մանրացնել սառույցի վրա և հոմոգենիզացնել 2-3 րոպեների ընթացքում 2-3 մլ գլիցինային բուֆերում: Հոմոգենիզացումը կրկնել երկու անգամ, հոմոգենատը բուֆերով նոսրացնել հյուսվածքի նկատմամբ 1:10 հարաբերությամբ: Նոսրացված հոմոգենատը ֆիլտրել երկշերտ քանգիֆով:

Ֆերմենտի լուծամզումը լյարդի ացետոնային փոշուց – 200 մգ լյարդի ացետոնային փոշին լցնել 15 մլ գլիցինային բուֆերի մեջ և ֆերմենտի լուծամզման նպատակով 20 րոպե թողնել թերմոստատում 37°C ջերմաստիճանում: Այդ ընթացքում փորձանոթը պետք է անընդհատ թափահարել: Այնուհետև խառնուրդը ֆիլտրել և լուծամզվածքում որոշել արգինազային ակտիվությունը:

Ֆերմենտի ինկուբացումը սուբստրատով – երկու փորձանոթներում (ստուգիչ և փորձնական) պատրաստել ինկուբացիոն խառնուրդներ համաձայն աղյուսակ 9-ի՝ պահպանելով ռեակտիվների ավելացման հաջորդականությունը:

Աղյուսակ 9

Արգինազային ակտիվության որոշումը

Նմուշ	Գլիցինային բուֆեր, մլ	Արգինինի լուծույթ, մլ	ԵԲԲ, մլ	Արգինազի պատրաստուկ
Ստուգիչ	1,4	0,2	-	0,4
փորձնական	1,4	0,2	2	0,4

Երկու փորձանոթներն էլ թափահարել և ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանում 15 րոպե, այնուհետև փորձնական նմուշի մեջ ավելացնել 2 մլ 5 % ԵԲԲ և խառնել: Երկու նմուշներն էլ ֆիլտրել թղթե ֆիլտրով և ֆիլտրատում որոշել միզանյութի քանակությունը:

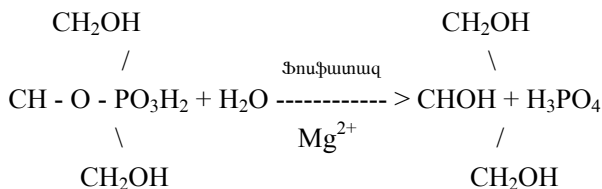
Միզանյութի քանակության որոշումը – վերցնել երկու փորձանոթ, մեկի մեջ լցնել փորձնական նմուշից 2 մլ, մյուսի մեջ՝ ստուգիչ նմուշից 2 մլ: Երկու փորձանոթներին ավելացնել 2 մլ գունավոր ռեակտիվ, որը պարունակում է ԴԱՄՕ, թիուսեմիկարբազիդի և երկաթի աղեր: Խառնուրդները թափահարել և 15 րոպե թողնել եռացող ջրային բաղնիքի

մեջ: Այնուհետև մմուշները սառեցնել հոսող սառը ջրով և կոլորիմետրել 540-560 մմ ալիքի երկարության տակ ֆոտոկոլորիմետրով 1 սմ հաստությամբ կյուվետում թորած ջրի դիմաց: Գունավոր կոմպլեքսը անկայուն է և այդ իսկ պատճառով մմուշների չափումը պետք է կատարել 15-20 րոպեների ընթացքում: Փորձնական մմուշի էքստինկցիայի արժեքից հանել ստուգիչ մմուշի էքստինկցիայի արժեքը և ստացված մեծությունը օգտագործել ստանդարտ մմուշի նկատմամբ միզանութի քանակության որոշման համար: Ստանդարտ մմուշը պատրաստել անմիջապես ֆոտոկոլորիմետրելուց առաջ՝ խառնելով 2 մլ միզանյութի ստանդարտ լուծույթը 2 մլ գունավոր ռեակտիվի հետ: Խառնուրդը 15 րոպե դնել եռացող ջրային բաղնիքի մեջ և սառեցնելուց հետո թորած ջրի դիմաց նույն պայմաններում չափել էքստինկցիայի արժեքը:

5.3.9. ՖՈՍՖԱՏԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

5.3.9.1. ԹԹՎԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՖԵՆՈԼՖՏԱԼԵԻՆՖՈՍՖԱՏԻ ՄԵՉՈՅՈՎ

Ֆոսֆատազները համարվում են ֆոսֆոմոնոէսթերազներ, որոնք կատալիզում են ֆոսֆոէսթերային կապերի հիդրոլիզը՝ անջատելով անօրգանական ֆոսֆատ ըստ հետևյալ ռեակցիայի



Թթվային ֆոսֆատազը կատալիզում է մոնոֆոսֆատների հիդրոլիզը թթվային միջավայրում (օպտիմում pH=5): Որպես սուբստրատ ֆերմենտի համար կարող են ծառայել β -գլիցերոֆոսֆատը, նիտրոֆենիլֆոսֆատը և այլ ֆոսֆորային էսթերներ:

Մեթոդի հիմքում ընկած է ֆոսֆատազի պատրաստուկի ազդեցությամբ ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի հիդրոլիզի արդյունքում առաջացած ֆենոլֆտալեինի քանակության որոշումը: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտում են ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի ֆերմենտային հիդրոլիզի արդյունքում անջատված ֆենոլֆտալեինի մկմոլերի քանակով կամ այլ կերպ ասած սուբստրատի այն մկմոլերի քանակով, որը ճեղքվում է 1 րոպեում 30°C ջերմաստիճանում:

Հետազոտման օբյեկտ – կարտոֆիլի ֆոսֆատազի լուծանգվածք (էջ 81):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – պլաստմասե քերիչ, սառնարան, սառցե բաղնիք, ջրային բաղնիք (թերմոստատ), ֆոտոկոլորիմետր, մագնիսական խառնիչ, պիպետներ, փորձանոթներ:

Ռեակտիվներ

1. Ացետատային բուֆեր 0,1 Մ, pH 3.8 - 4,0:
2. NaOH, 1Մ:
3. Նատրիումի ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի 10% ելային լուծույթ պատրաստված ամոնիումային բուֆերում:
4. Սուբստրատի աշխատանքային լուծույթ – պատրաստել նատրիումի ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի ելային 10 % լուծույթը ացետատային բուֆերով (0,1 Մ, pH 4,0) 50 անգամ նոսրացնելով, ստացվում է սուբստրատի 0,2 % (0,0036 Մ) լուծույթ պատրաստված ամոնիումա-ացետատային բուֆերում:

Հիդրոլիզի պայմանները

Նատրիումի ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի հիդրոլիզը սկսվում է անմիջապես դրա մեջ ֆերմենտային պատրաստուկ ավելացնելուց հետո և ավարտվում 1Մ NaOH ավելացնելիս: Ֆերմենտային հիդրոլիզը իրականացնում են ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի 0,0012 Մ կոնցենտրացիայի պայմաններում, 15 րոպեի ընթացքում և 30°C ջերմաստիճանում:

Աշխատանքի ընթացքը

1. Տրամաչափական կորի կառուցումը-

Ֆենոլֆտալեինֆոսֆատով ֆոսֆատազի ակտիվությունը որոշելու համար պետք է նախապես կառուցել տրամաչափական կոր ըստ ֆե-

նուֆտալեինի և որոշել ֆենոլֆտալեինի էքստինկցիայի մոլային կլանման գործակիցը, այսինքն այն օպտիկական խտությունը, որը համապատասխանում է 1 մոլ ֆենոլֆտալեինին 1 լ ստանդարտ լուծույթում (կամ 1 մկմոլ/մլ): Այս գործակիցը անհրաժեշտ է հաստատել յուրաքանչյուր կոլորիմետրման դեպքում: Այդ նպատակով 50 մգ ֆենոլֆտալեինը լուծել 50 մլ սպիրտում և ծավալը թորած ջրով հասնել 100 մլ-ի: Ելային լուծույթը նոսրացնելով պատրաստել ֆենոլֆտալեինի 0,2 մգ/մլ (0,628 մկմոլ/մլ) կոնցենտրացիայով աշխատանքային լուծույթ: Տրամաչափական կոր կառուցելու նպատակով վերցնել 7 փորձանոթ, նմուշները պատրաստել համաձայն աղյուսակ 10–ում ներկայացված տվյալների:

Աղյուսակ 10

Ֆենոլֆտալեինի տրամաչափական կորի կառուցման համար անհրաժեշտ նմուշների պատրաստումը

Փորձանոթ N	Աշխատանքային լուծույթ, մլ	Ջուր, մլ	NaOH, մլ	Ֆենոլֆտալեինի կոնցենտրացիան մկմոլ/մլ	D₅₄₀
1	2,0	1,0	1,0	0,310	
2	1,5	1,5	1,0	0,240	
3	1,0	2,0	1,0	0,157	
4	0,5	2,5	1,0	0,079	
5	0,4	2,6	1,0	0,062	
6	0,3	2,7	1,0	0,031	
7	0,2	2,8	1,0	0,016	

Անհրաժեշտ է պատրաստել ֆենոլֆտալեինի 2 առանձին լուծույթներ և փորձերը կատարել 2 զուգահեռ տարբերակներով: 2 փորձերի արդյունքում ստացված տվյալների միջին արժեքներով կառուցել տրամաչափական կոր՝ արսցիսների առանցքին տեղադրելով ֆենոլֆտալեինի քանակը մկմոլ/մլ-ով, իսկ օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտությունների արժեքները: Տրամաչափական կորով որոշել ֆենոլֆտալեինի էքստինկցիայի մոլային կլանման գործակիցը ֆոսֆատազի ակտիվությունը հաշվարկելու համար:

2. Ֆոսֆատազի լուծամզվածքի ստացումը կարտոֆիլից

Վերցնել կարտոֆիլի միջին չափի 2 պալարներ (100 գ), սառեցնել սառնարանում, քերել քերիչով, լցնել սառույցի վրա դրված բաժակի մեջ և ավելացնել 100 մլ նախապես սառեցված ացետատային բուֆեր (рН 5.4): Ստացված սուսպենզիան սառը պայմաններում ֆիլտրել երկշերտ քանգիֆով, վերցնել 10 մլ ֆիլտրատ և տեղադրել սառնարանում: Հետագայում այդ ֆիլտրատում որոշել թթվային ֆոսֆատազի ելային ակտիվությունը և լուծամզվածքում սպիտակուցի քանակությունը

3. Ֆոսֆատազի ակտիվության որոշումը – 2 փորձանոթների մեջ լցնել 2 մլ սուբստրատի աշխատանքային լուծույթ, ավելացնել 1 մլ ֆոսֆատազի լուծամզվածք և ինկուբացնել 15 րոպե 30⁰С ջերմաստիճանում: Այնուհետև նմուշների մեջ լցնել 1 մլ 1Մ NaOH-ի լուծույթ և կոլորիմետրել 540 նմ ալիքի երկարության տակ 5 մմ հաստության կյուվետներով ստուգիչի դիմաց:

Ստուգիչ տարբերակում լցնել 2 մլ սուբստրատի աշխատանքային լուծույթ, թողնել 15 րոպե 30⁰С թերմոստատում, ապա ավելացնել 1 մլ 1Մ NaOH լուծույթ և 1 մլ ֆերմենտային լուծույթ:

Ֆերմենտի ակտիվության հաշվարկը – ֆոսֆատազի ակտիվությունը (E/մգ) հաշվարկել հետևյալ բանաձևով

$$Ակտ_{\text{մես}} = \frac{D \cdot V_{\text{ink}}}{\varepsilon \cdot V_e \cdot t \cdot c} D \cdot V_1$$

որտեղ,

D- փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունն է 540 նմ ալիքի երկարության պայմաններում,

ε-ֆերմենտալիզի էքստինկցիայի մոլային կլանման գործակիցը՝ հաշվարկված ըստ տրամաչափական կորի, մկմոլ/մլ,

V_e - ֆերմենտի լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

V_{ink} - 1Մ NaOH պարունակող ինկուբացիոն խառնուրդի ծավալը, մլ

t - ինկուբացման տևողությունը, րոպե,

c - սպիտակուցի կոնցենտրացիան 1 մլ ֆերմենտի լուծույթում, մգ/մլ:

5.3.9.2. ՖՈՍՖԱՏԱԶԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄԸ ԿԱՐՏՈՖԻԼԻՑ

Թթվային ֆոսֆատազ ֆերմենտը տեղակայված է բուսական բջիջների ցիտոպլազմայում: Ֆերմենտի անջատումը պետք է սկսել մանրացված կարտոֆիլի պալարների ջրային լուծամզվածքի ստացումից: Աշխատանքի նպատակն է ֆոսֆատազի նստեցումը աղայնացման մեթոդով: Թթվային ֆոսֆատազի նստեցումը պետք է իրականացնել ամոնիումի սուլֆատի 30, 50, 60, 80, 90, և 100% հազեցած լուծույթներով: Ստացված տվյալներով որոշել ամոնիումի սուլֆատի այն կոնցենտրացիան, որը հանգեցնում է թթվային ֆոսֆատազի նստեցմանը:

Հետազոտման օբյեկտ – Կարտոֆիլի լուծամզվածք

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – պլաստմասե քերիչ, սառնարան, սառցե բաղնիք, ջրային բաղնիք (թերմոստատ), կոլո-րիմետր, մագնիսական խառնիչ,

Ռեակտիվներ՝

1. Ամոնիումի սուլֆատ
2. Քացախաթթու
3. Նատրիումի ացետատ
4. Ացետատային բուֆեր 0,2M, pH 5,4,
5. Լուրիի մեթոդով սպիտակուցի որոշման ռեակտիվներ (հավելված 3)
6. Թթվային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշման ռեակտիվներ (էջ 86)

Աշխատանքի ընթացքը

1. **Ֆոսֆատազի լուծամզվածքի ստացումը կարտոֆիլից** (էջ 81)
2. **Ֆոսֆատազի նստեցումը աղայնացման մեթոդով** – չափել ֆիլտրատի ծավալը և 250 մլ տարողությամբ ապակյա բաժակով կամ կոնաճև կոլբայով տեղադրել սառցե բաղնիքում: Ֆիլտրատին քիչ քանակներով ավելացնել ամոնիումի սուլֆատ և զգուշությամբ անընդհատ խառնել՝ կանխելով փրփուրի առաջացումը: Առաջին նստեցումը կատարել 30% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով (ամոնիումի սուլֆատի 100% հազեցած վիճակը ընդունել

մրա հազեցած կոնցենտրացիան 23°C): Անհրաժեշտ աղի զանգվածը (q) հաշվել հետևյալ բանաձևով

$$X = \frac{0.515 \cdot V \cdot (C_2 - C_1)}{1 - 0.272 \cdot C_2},$$

որտեղ

C_1 - ամոնիումի սուլֆատի ելային կոնցենտրացիան է արտահայտված 100% -ի մասերով (100% - 1, 50% - 0,5),

C_2 - ամոնիումի սուլֆատի վերջնական կոնցենտրացիան,

V - մշակման ենթարկված լուծույթի ծավալը, մլ,

Լուծույթը 15 րոպե խառնել մագնիսական խառնիչով և 30 րոպե առանց խառնելու թողնել սառցե բաղնիքում: Այնուհետև ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ -4°C ջերմաստիճանում: Առաջացած նստվածքը լուծել 10 մլ ացետատային բուֆերում (pH 5.4) և տեղադրել սառնարանում, իսկ վերնստվածքում պարունակվող ֆերմենտը ենթարկել հետագա նստեցման՝ մախապես չափելով վերնստվածքային հեղուկի ծավալը:

Ֆերմենտի երկրորդ նստեցումը կատարել 50% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով: Լուծույթը մշակել և ցենտրիֆուգել այնպես, ինչպես առաջին նստեցման ժամանակ: Նստվածքը լուծել 10 մլ բուֆերում և չափել վերնստվածքի ծավալը:

Երրորդ նստեցումը կատարել 60% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով: Նստվածքը լուծել 10 մլ բուֆերում և չափել վերնստվածքի ծավալը:

Չորրորդ նստեցումը իրականացնել 80% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով: Նստվածքը լուծել 5 մլ բուֆերում:

Հինգերորդ նստեցումը իրականացնել 90% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով: Նստվածքը լուծել 5 մլ բուֆերում:

Վերջին նստեցումը իրականացնել 100% հազեցած ամոնիումի սուլֆատով:

Աղյուսակ 11

**Կարգովի չհաշվարկված աղայնացման եղանակով թրվային ֆոսֆատազի
անջարման արդյունավետությունը**

Մաքրման փուլեր	Ծա- վա- լը, մլ	Ակտի- վությու- նը (Ակտ/մլ)	Ընդհանուր ակտիվու- թյունը V x Ակտ/մլ	Սպիտա- կուց մգ/մլ	Տեսակա- րար ակ- տիվու- թյունը (E/մգ)	Մաքրման աստիճանը	Ֆերմեն- տի ելքը %
Լուծա- մզվածք							
Նստեցում 30% հազեց- ման դեպքում							
Նստեցում 50% հազեց- ման դեպքում							
Նստեցում 60% հազեց- ման դեպքում							
Նստեցում 80% հազեց- ման դեպքում							
Նստեցում 90% հազեց- ման դեպքում							
Նստեցում 100% հազեց- ման դեպքում							

Տարբեր կոնցենտրացիաների ամոնիումի սուլֆատով իրականաց-
ված յուրաքանչյուր նստեցումից հետո ստացված սպիտակուցային
ֆրակցիաներում որոշել սպիտակուցի քանակությունը և թրվային ֆոս-
ֆատազի ակտիվությունը: Ակտիվությունը որոշել՝ գնահատելով ֆենոլֆ-
տալեինֆոսֆատի հիդրոլիզի արագությունը:

1 մլ հետազոտվող ֆրակցիայում ֆոսֆատազի ակտիվությունն արտահայտել ստանդարտ միավորներով (Ակտ/մլ):

Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշելուց հետո ելային լուծամզվածքում և բոլոր ֆրակցիաներում որոշել սպիտակուցի քանակը Լոուրիի մեթոդով: Հաշվել ֆերմենտի տեսակարար ակտիվությունը (E/մգ) բոլոր ֆրակցիաներում:

Աշխատանքի ձևակերպումը

Հետազոտվող սպիտակուցային ֆրակցիաներում որոշել ֆերմենտի ծավալային ակտիվության (Ակտ/մլ), տեսակարար ակտիվության (E/մգ), 1 մլ պարունակվող սպիտակուցի քանակության արժեքները և գրանցել աղյուսակ 11-ում: Հաշվել թթվային ֆոսֆատազի մաքրման աստիճանը և ֆերմենտի ելքը ամոնիումի սուլֆատով նստեցման յուրաքանչյուր փուլում:

Վերլուծելով ստացված արդյունքները՝ գտնել ամոնիումի սուլֆատի այն կոնցենտրացիան, որը հանգեցնում է թթվային ֆոսֆատազի նստեցմանը:

5.3.10. ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՀԱՆԳՈՒՑԱՅԻՆ ՏԱՐԲԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԱԵՖ-ԱԶԱՅԻՆ ՌԵԱԿՑԻԱՅԻ ՕՐԻՆԱԿՈՎ

Աշխատանքի նպատակն է կենսաքանական օբյեկտից անջատել նյութափոխանակության հանգուցային ֆերմենտ հանդիսացող ադենոզինեռֆոսֆատազ (ԱԵՖ-ազ) և որոշել վերջինիս կողմից կատալիզվող ռեակցիայի արգասիք հանդիսացող ֆոսֆորական թթուն:

Կենդանի օրգանիզմում ընթացող կենսաքիմիական գործընթացների ամբողջությունը իրենից ներկայացնում է միմյանց հետ փոխկապակցված և արդյունավետ ձևով կարգավորվող բարդ համակարգ: Այդ գործընթացներում առանձնահատուկ դեր ունեն այսպես կոչված հանգուցային ռեակցիաները, որոնց ընթացքում առաջանում կամ վերափոխվում են նյութափոխանակության ժամանակ վճռական դեր խաղացող միացություններ: Այդպիսի միացությունների շարքին է դասվում

աղենոզինեռֆոսֆորական թթուն (ԱԵՖ)՝ կարևոր էներգետիկ մոլեկուլ, որը կարող է կենսաքիմիական ռեակցիաների ժամանակ պահեստավորել և իրացնել քիմիական էներգիան: ԱԵՖ-ի փոխանակության հետ կապված գործընթացներն ունեն կենսական կարևոր նշանակություն, իսկ այդ գործընթացներին մասնակցող ֆերմենտները կոչվում են հանգուցային: Այդպիսի ֆերմենտ է համարվում ԱԵՖ-ազը, որը հիդրոլիզի է ենթարկում ԱԵՖ-ը և էներգիա մատակարարում տարբեր գործընթացների իրականացման համար:

ԱԵՖ-ը պարունակում է ֆոսֆորական թթվի 3 մնացորդներ և pH 7 պայմաններում հանդես է գալիս քառալիցք անիոնի ձևով: Մոլեկուլի ազատ էներգիայի զգալի մասը պայմանավորված է ֆոսֆորական մնացորդների փոխադարձ էլեկտրաստատիկ վանողությամբ: Ֆոսֆորական մնացորդների միջև կապերի ճեղքումն ուղեկցվում է էներգիայի անջատմամբ, որը կատարելիզմի ռեակցիաների ընթացքում նախապես պահեստավորվում է մոլեկուլում ԱԵՖ-ի առաջացման ժամանակ, ապա ԱԵՖ-ի մակրոէրգիկ կապերի քիմիական էներգիան օգտագործվում է անաբոլիզմի ռեակցիաների ընթացքում ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի ճանապարհով: ԱԵՖ-ի հիդրոլիզը դա այն գործընթացների շարքիչ ուժն է, որոնք համարվում են թերմոդինամիկորեն ոչ շահավետ: ԱԵՖ-ը և այլ մուլիեռզիդեռֆոսֆատները շատ զուգակցած ռեակցիաների համար հանդիսանում են էներգիայի մշտական աղբյուր:

ԱԵՖ-ը կենտրոնական տեղ է զբաղեցնում բջջի նյութափոխանակության մեջ, քանի որ կապող օղակ է հանդիսանում շնչառական և էներգիայի ծախս պահանջող գործընթացների միջև, և անընդհատ տեղի է ունենում ԱԵՖ-ից բարձրաէներգետիկ ֆոսֆատային խմբերի ճեղքում և տեղակալում նորերով:

Աղենոզինեռֆոսֆատազի (ԱԵՖ-ազ) ակտիվության որոշումը

Հյուսվածքների, հյուսվածքներից ստացված հոմոգենատների կամ ենթաբջջային ֆրակցիաների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը իրենից ներկայացնում է մի շարք ռեակցիաների գումարային արդյունք, որոնք ընթանում են ԱԵՖ-ի ծախսով և կատալիզվում են Ca^{2+} և Mg^{2+} կոֆակտորներ ունեցող ֆերմենտներով: Այդ ռեակցիաների ընթացքում ԱԵՖ-ը

ճեղքվում է մինչև ԱԿՖ և ֆոսֆորական թթու: ԱԵՖ-ազային ակտիվությամբ որոշվում է ռեակցիայի հետևանքով անջատված անօրգանական ֆոսֆատի քանակությամբ:

Հետազոտման օբյեկտ – հյուսվածքային հոմոգենատ կամ ենթաբջջային ֆրակցիա:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – հոմոգենիզատոր, քերմոստատ, սառեցնող ցենտրիֆուգա, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, ձագար, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. KCl-ի 2 Մ լուծույթ, pH 7,4 (ԱԵՖ-ազի անջատման դեպքում)
KCl-ի 100 մՄ լուծույթ (ԱԵՖ-ազի ակտիվության որոշման դեպքում),
2. $MgCl_2$ -ի 0,1 Մ լուծույթ,
3. ԱԵՖ, 50 մՄ լուծույթ,
4. Տրիս-HCl բուֆեր, 20 մՄ, pH 7,4,
5. ԵԶԶ, 10% լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

Ա. ԱԵՖ-ազի պատրաստուկի ստացումը – Սկանային կամ այլ հյուսվածքի բջիջները հոմոգենիզացնել 9-պատիկ ծավալով KCl-ի 2 Մ սառեցված լուծույթում (pH 7,4): Հոմոգենատը մոսրացնել մույն լուծույթով ևս 5 անգամ՝ դարձնելով ելային հյուսվածքի նկատմամբ 50 անգամ մոսրացված: Նոսրացված հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 600-1000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10 րոպե և հետագա աշխատանքի համար օգտագործել վերնստվածքը:

Բ. ԱԵՖ-ազի ակտիվության որոշումը

ԱԵՖ-ազի ակտիվությունը որոշել վերնստվածքում: Այդ նպատակով պատրաստել 3 փորձանոթ այնպես, ինչպես ներկայացված է աղյուսակ 12-ում:

ԱԵՖ-ազայի ակտիվության որոշումը

№	Ելային լուծույթներ, մլ	KCl 100 մՄ, մլ	MgCl ₂ 100 մՄ, մլ	Տրիս-HCl բուֆեր, 20 մՄ, pH 7.4	Ջուր, մլ	ԱԵՖ, 50 մՄ	Հոմոգենատ, մլ
1	Ստուգիչ-սուբստրատ	0,1	0,1	1	0,6	0,2	-
2	Ստուգիչ-ֆերմենտ	0,1	0,1	1	0,6	-	0,2
3	Փորձնական	0,1	0,1	1	0,6	0,2	0,2

2 մլ ծավալով նմուշներն ինկուբացնել 7 րոպե 25°C ջերմաստիճանում (ինկուբացիայի սկիզբը համարել ֆերմենտային պատրաստուկի ավելացման պահը): Ռեակցիան կանգնեցնել 0,5 մլ սառը ԵԶԶ-ի 10% լուծույթով, 10 րոպե պահել սառույցի վրա, այնուհետև ֆիլտրել և ֆիլտրատներում որոշել անօրգանական ֆոսֆատը: ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը հաշվարկել նմուշում կամ 1 գ հյուսվածքում (հոմոգենատում) 1 րոպեում առաջացած ֆոսֆորի մկմոլերի քանակով:

9. Անօրգանական ֆոսֆատի որոշումը

Մեթոդի հիմքում ընկած է վերականգնիչ հանդիսացող ասկորբի-նաթթվի առկայությամբ ֆոսֆորա-մոլիբդենային կապույտի առաջացումը: Թթվային միջավայրում ԱԵՖ-ի ինքնաբուխ հիդրոլիզից խուսափելու համար որոշումն իրականացնել մոլիբդենի ցածր կոնցենտրացիայի և լուծույթի ֆիքսված թթվայնության (pH=4,0) պայմաններում:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ջրային թերմոստատ, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր կամ սպեկտրաֆոտոմետր, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. Ացետատային բուֆեր, 0.2 Մ, pH 4,0,
2. Ամոնիումի մոլիբդատի 0,1% -անոց լուծույթ պատրաստված 0,5 Ն ծծմբական թթվի լուծույթում,
3. Թարմ պատրաստված ասկորբինաթթվի 1% - անոց լուծույթ՝ պատրաստված 0,001 Մ CuSO₄-ով,

4. KH_2PO_4 -ի ստանդարտ լուծույթ - 1 մկմոլ անօրգանական ֆոսֆոր 1 մլ-ում պատրաստված 2,5% ԵՔՔ-ի լուծույթում,
5. 2,5% ԵՔՔ լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

1. **Տրամաչափական կորի կառուցումը** – ֆոսֆատի քանակը որոշելու համար կառուցել տրամաչափական կոր: Այդ նպատակով պատրաստել հայտնի քանակներով ֆոսֆոր պարունակող մի շարք նմուշներ ինչպես ներկայացված է աղյուսակ 13–ում

Աղյուսակ 13

Ֆոսֆատի որոշման տրամաչափական կորի կառուցման համար անհրաժեշտ նմուշներ

№	Անօրգանական ֆոսֆատի քանակը նմուշում, մկմոլ	KH_2PO_4 ստանդարտ լուծույթ, մլ	ԵՔՔ, մլ	Ացետա տային բուֆեր, մլ	Ամոնիումի մոլիբդատի լուծույթ, մլ	Ասկորբիկ և ասկորբիկ լուծույթ, մլ
1	0,2	0,2	0,8	4	0,5	0,5
2	0,4	0,4	0,6	4	0,5	0,5
3	0,6	0,6	0,4	4	0,5	0,5
4	0,8	0,6	0,2	4	0,5	0,5
5	1,0	1,0	-	4	0,5	0,5
Ստուգիչ	-	-	1	4	0,5	0,5

Նմուշները 10 թույն պահել 25°C ջերմաստիճանում, ապա գունավորված լուծույթների օպտիկական խտությունները չափել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով կարմիր լուսաֆիլտրով (700 նմ): Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր, արսցիսների առանցքին՝ տեղադրելով անօրգանական ֆոսֆատի քանակը (մկմոլ/լ), իսկ օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտությունների արժեքները:

2. **Ֆոսֆորի քանակի որոշումը փորձնական նմուշում:** Փորձնական նմուշից վերցնել 1 մլ ԵՔՔ-ֆիլտրատ, ավելացնել 4 մլ ացետա-

տային բուֆեր, 0,5 մլ ամոնիումի մոլիբդատի լուծույթ և 0,5 մլ ասկորբինաթթվի լուծույթ: Նմուշը խառնել և 10 թոպե պահել 25°C ջերմաստիճանում, ապա գունավորման ինտենսիվությունը չափել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով կարմիր լուսաֆիլտրով ստուգիչ նմուշի դիմաց, իսկ ֆոսֆատի քանակը որոշել տրամաչափական կորի միջոցով:

Գ. Անօրգանական ֆոսֆատի որոշման ձևափոխված մեթոդը:

Անօրգանական ֆոսֆատի որոշման տարածված մեթոդների հիմքում ընկած է այն, որ թթվային միջավայրում ամոնիումի մոլիբդատի և ֆոսֆորական թթվի փոխազդեցության արդյունքում առաջանում է ամոնիումի ֆոսֆոմոլիբդատ, որի վերականգնումից առաջանում են կապույտ գույն ունեցող մոլիբդենի օքսիդներ: Լուծույթի օպտիկական խտությունը որոշում են 750 նմ ալիքի երկարության տակ: Սենյակային ջերմաստիճանում լուծույթի գունավորումը կայուն է և պահպանվում է 1-2 ժամ: Գունավորման կայունացման նպատակով լուծույթին ավելացվում է պղնձի սուլֆատ: Ֆոսֆատի որոշման մեթոդները տարբերվում են վերականգնիչի և միջավայրի թթվայնության բնույթով, ինչն ազդում է ռեակցիայի արագության և մեթոդի զգայնության վրա: Որպես վերականգնիչ կարելի է օգտագործել կամ 1-ամինո-2-նաֆտոլ-4-սուլֆոնային թթու կամ ասկորբինաթթու: Ասկորբինաթթվով մեթոդի զգայնությունը մի քանի անգամ ավելի բարձր է, քան էուկոնոգենով, այդ իսկ պատճառով ասկորբինաթթուն օգտագործվում է ավելի հաճախ:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ջրային թերմոստատ, սառցե բաղնիք, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, փորձանոթներ, պիպետներ, ձագար:

Ռեակտիվներ

1. Ասկորբինաթթվի 10% լուծույթ, պահել սառը պայմաններում,
2. Ամոնիումի մոլիբդատի 0,42 % լուծույթ պատրաստված 1 Ն H_2SO_4 -ով, պահել սենյակային ջերմաստիճանում,
3. Պատրաստել 1:6 ծավալային հարաբերությամբ 1 և 2 լուծույթներից կազմված խառնուրդ: Պատրաստել փորձից առաջ և 1 օր պահել սառցե բաղնիքում,

4. KH_2PO_4 –ի ստանդարտ լուծույթ 0,23 մկմոլ անօրգանական ֆոսֆոր 1 մլ-ում:

Աշխատանքի ընթացքը – 0,9 մլ ծավալով հետազոտվող մնուշին ավելացնել 2,1 մլ 3-րդ լուծույթից և պահել 20 րոպե 45°C կամ 60 րոպե 37°C ջերմաստիճանում: Սառեցնել և չափել օպտիկական խտությունը 750 մմ ալիքի երկարության տակ ստուգիչի դիմաց: Ստուգիչ տարբերակը պատրաստել այնպես, ինչպես փորձնական տարբերակը, բայց հետազոտվող մնուշի փոխարեն լցնել թորած ջուր: Նմուշների գունավորումը կայուն է և կարող է պահպանվել մի քանի ժամ:

Տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով փորձանոթների մեջ լցնել 0.15; 0.3; 0.5; 0.7 և 0.9 մլ ֆոսֆատի ստանդարտ լուծույթներ, և մշակել այնպես, ինչպես փորձնական մնուշները: Ստացված արդյունքներով կառուցել տրամաչափական կոր՝ օրդինատների առանցքն ըստ օպտիկական խտությունների և արսցիսների առանցքն ըստ հետազոտվող մնուշում պարունակվող ֆոսֆորի քանակների:

5.3.11. ԻՉՈՑԻՏՐԱՏԼԻԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Աշխատանքի նպատակն է լիազների դասին պատկանող ֆերմենտ իզոցիտրատլիազի (KΦ 4.1.3.1) ակտիվության որոշումը, որը կատալիզում է իզոլիմոնաթթվի դարձելի վերափոխումը գլիօքսալաթթվի և սաթաթթվի:

Մեթոդի հիմքում ընկած է ռեակցիայի արգասիք հանդիսացող գլիօքսալաթթվի և ֆենիլիլիդրազիմի միջև առաջացող գունավոր կոմպլեքսի կլանման չափումը 324 մմ ալիքի երկարության պայմաններում:

Հետազոտման օբյեկտ – Չիքատու բույսի ծիլեր (սոյայի ծիլեր):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – սպեկտրաֆոտոկոլորիմետր, ցենտրիֆուգա, կշեռք, հախճապակյա հավանգ, սառույցով կյուվետ, ձագար, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. Ֆերմենտի անջատման միջավայր - 50 մլ ջրում լուծել 0,605 գ տրիս, 2,03 գ մագնեզիումի քլորիդ, 77 մգ դիթիոտրիետոլ: 0.1 Ն HCl-ով լուծույթի pH-ը հասցնել 7.5, իսկ ծավալը թորած ջրով՝ 100 մլ:
2. Կոլորիմետրման միջավայր- 50 մլ ջրի մեջ լուծել 0,605 գ տրիս, 0.1015 գ մագնեզիումի քլորիդ, 77 մգ դիթիոտրիետոլ, 58 մգ ֆենիլիդրազիմի հիդրոքլորիդ, 92 մգ կալիումի իզոցիտրատ: 0.1 Ն HCl-ով լուծույթի pH-ը հասցնել 7.5-ի, իսկ ծավալը թորած ջրով՝ 100 մլ:

Երկու լուծույթներն էլ պատրաստել օգտագործելուց անմիջապես առաջ:

Աշխատանքի ընթացքը – 1 գ ծիլերը տրորել 1 մլ անջատման միջավայրում, ավելացնել 9 մլ թորած ջուր, խառնել և ֆիլտրել կամ ցնմտրիֆուգել 6000-8000 պտույտ/րոպե արագությամբ 5 րոպե: Կյուվետի մեջ լցնել 3 մլ կոլորիմետրման միջավայր, ավելացնել 0.2-0.3 մլ վերնըստվածք, խառնել և կոլորիմետրել 324 նմ ալիքի երկարության տակ կոլորիմետրման միջավայրի դիմաց: 15 րոպե հետո կատարել երկրորդ չափումը և որոշել օպտիկական խտության աճը: Ֆերմենտի ակտիվությունը 1 գ թաց հյուսվածքում հաշվարկել հետևյալ բանաձևով

$$A = 0.18DV1/V2mt,$$

որտեղ

D- օպտիկական խտության աճն է 324 նմ ալիքի երկարության պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում,

V1- ամբողջ լուծամզվածքի ծավալը, մլ

V2- նմուշի ծավալը կյուվետում, մլ,

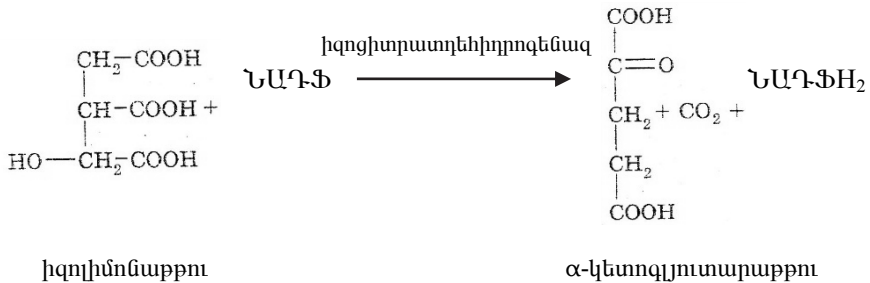
m- ծիլերի զանգվածը, գ,

t- ժամանակ, րոպե:

Ֆերմենտի տեսակարար ակտիվությունը հաշվելու նպատակով նմուշում որոշել սպիտակուցի պարունակությունը Լոուրիի մեթոդով և ակտիվությունն արտահայտել 1 մգ սպիտակուցի քանակով:

5.3.12. ՆԱԴՖ-ԿԱԽՅԱԼ ԻՉՈՑԻՏԲԱՏԳԵՎԻԴՐՈՂԵՂԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

ՆԱԴՖ-կախյալ իզոցիտրատդեհիդրոգենազը (KΦ 1.1.1.42) ման-
գանի իոնների և ՆԱԴՖ-ի առկայությամբ կատալիզում է իզոլիմոնա-
թթվի դարձելի օքսիդացիոն դեկարբօքսիլացումը:



Ֆերմենտը լայնորեն տարածված է մարդու և կենդանիների հյուս-
վածքներում, այդ թվում լյարդում, սրտում և մկաններում, ունի 64 000
Դա մոլեկուլային զանգված: Մո իոնները կարող են փոխարինվել Mg և
Co իոններով: Ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում առկա են SH-խմբեր:
ՆԱԴՖ-կախյալ իզոցիտրատդեհիդրոգենազի արգելակիչներ կարող են
հանդիսանալ միջավայրում ավելցուկային քանակներով առկա
ՆԱԴՖH₂-ի, ՆԱԴH₂-ի ե ԱԵՖ-ի մոլեկուլները:

Հետազոտման օբյեկտ – ցորենի սերմերի կամ լյարդի լուծամզվածք
(էջ 24):

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – ֆոտոէլեկտրակո-
լորիմետր, անալիտիկ կշեռք, կյուվետ (1 սմ), փորձանոթներ, պիպետ-
ներ:

Ռեակտիվներ

1. Տրիս-HCl բուֆեր, 0,1 Մ, pH 7,5 - 0,1 Մ տրիսի և 0,1 Մ HCl լու-
ծույթները խառնելով pH-ը հասցնել 7,5, իսկ ծավալը թորած
ջրով՝ 100 մլ,

- 2 ՆԱԴՖ-ի 4 մՄ լուծույթ -61 մգ ՆԱԴՖ-ը լուծել 20 մլ թորած ջրում,
- 3 $MnCl_2$ -ի 0,1 Մ լուծույթ- 630 մգ $MnCl_2$ -ը լուծել 50 մլ թորած ջրում,
- 4 Նատրիումի իզոցիտրատի 0,1Մ լուծույթ – 516 մգ աղը լուծել 20 մլ թորած ջրում:

Աշխատանքի ընթացքը – կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 2,6 մլ 0,1 Մ Տրիս-HCl բուֆերային լուծույթ (pH 7,5), 0,1 մլ ՆԱԴՖ-ի 4 մՄ լուծույթ և 0,1 մլ 0,1 Մ $MnCl_2$ -ի լուծույթ և 0,1 մլ 0,1 Մ նատրիումի իզոցիտրատ, խառնել և ռեակցիան սկսելու նպատակով ավելացնել 0,2 մլ լուծամզվածք: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշել իզոցիտրատի օքսիդացման արդյունքում գոյացած ՆԱԴՖՀ-ի կլանումը 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում չափելով ($\varepsilon=6,22 \text{ մՄ}^{-1}, \text{ սմ}^{-1}$): Որպես ֆերմենտի ակտիվության ցուցանիշ ընդունել 1 թուպեում վերականգնված ՆԱԴՖ-ի մկմոլերի քանակը:

Ռեակցիայի ընթացքին հետևել 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում 15-20 վայրկյան ընդմիջումներով գրանցելով կլանումը 1 թուպեի ընթացքում ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով: Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 14-ում:

Աղյուսակ 14

**ՆԱԴՖ-կախյալ իզոցիտրատդեհիդրոգենազի ստեպայրթյամբ
իզոլիմոնաքսի օքսիդացիոն դեկարբօքսիլացման ընթացքում գոյացած
ՆԱԴՖՀ-ի կլանման մեծության կախումը ռեակցիայի տևողությունից**

Չափումներ	Ռեակցիայի տևողությունը (t), վ.	Կլանումը (D) պայմ. միավ.
1		
2		
3		
4		

Հաշվարկի մեթոդը

Կառուցել ՆԱԴՖՀ-ի կլանման մեծության (D) կախումը ռեակցիայի տևողությունից (t) ցույց տվող գծապատկեր D և t առանցքներով:

Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշել ստացված կորի թեքության անկյան տանգենսով կամ հետևյալ բանաձևերով՝

1. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկմոլ/րոպե գրամ) վերնաստվածքում որոշել

$$\nu = \frac{dC}{dT} = \frac{dD}{6.22ldt}$$

2. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկՄ/րոպե) մաքրված մնուշներում որոշել

$$\nu = \frac{dC}{dt} = \frac{dDV_1V_3}{6.22lPV_2dt}$$

որտեղ

dD-կլանման մեծությունն է, (պայմ. միավոր),

6.22- միկրոմոլային կլանման գործակիցը,

l- կյուվետի լայնությունը, սմ,

P- հյուսվածքի զանգվածը, գ,

V1- լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

V2- վերնաստվածքի ծավալը փորձանոթում, մլ,

V3 – մնուշի վերջնական ծավալը փորձանոթում, մլ,

dt-ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

5.3.13. ԳԼՅՈՒԿՈԶ-6-ՖՈՍՖԱՏԻԶՈՄԵՐԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Գլյուկոզ-6-ֆոսֆատիզոմերազը (KΦ 5.3.1.9) կատալիզում է գլյուկոզ-6-ֆոսֆատի դարձելի վերափոխումը ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի: Ֆերմենտի ակտիվությունը կարելի է որոշել առաջացած ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի և ռեզորցինի փոխազդեցության գոնավոր արգասիքի հիման վրա:

Հետազոտման օբյեկտ – չոր խմորասնկեր:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – սպեկտրաֆոտոմետր, ցենտրիֆուգա, կշեռք, ջրային բաղնիք, հալման պահանջարկ, ջերմաչափ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. 0,1% ռեզորցինի լուծույթ պատրաստված 96% էթիլ սպիրտով,
2. 30% HCl- ի լուծույթ (խտությունը 1,15),
3. Տրիս-HCl բուֆեր, 0,05 Մ, pH 8,5,
4. Գլյուկոզ-6-ֆոսֆատի 0,01 Մ լուծույթ պատրաստված 0,05 Մ տրիս-HCl բուֆերում, pH 5,5,
5. 0,5 մՄ ֆրուկտոզի կամ 0,5 մկՄ ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի ստանդարտ լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

1. **Ֆերմենտային պատրաստուկի ստացումը** – 0,5 գ չոր խմորասնկերը տրորել 5 մլ 0,05 Մ տրիս-HCl բուֆերում (pH 8,5) և ցենտրիֆուգել 5 րոպե 4000 պտույտ/րոպե արագությամբ: Որպես ֆերմենտի աղբյուր օգտագործել վերնստվածքը:
2. **Ֆերմենտի ակտիվության որոշումը** – համարակալված 4 փորձանոթների մեջ լցնել 0,4–ական մլ ֆերմենտային լուծույթ: Առաջին 2 փորձանոթների (ստուգիչ) մեջ լցնել 3-ական մլ 30% HCl-ի լուծույթ: Բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 0,1 մլ գլյուկոզ-6-ֆոսֆատի լուծույթ, խառնել և տեղադրել 30°C ջրային բաղնիք: 5 րոպե անց № 3 և 4 փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ 30% HCl- ի լուծույթ, ապա բոլոր փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ ռեզորցինի լուծույթ, խառնել և տեղադրել 80°C ջրային բաղնիք 8 րոպե: Փորձանոթները սառեցնել և ցենտրիֆուգել 5 րոպե 5000 պտույտ/րոպե արագությամբ: Վերնստվածքի վարդագույն գունավորումը ֆոտոկոլորիմետրել 413 նմ ալիքի երկարության տակ, ապա ֆերմենտի տեսակարար ակտիվությունը հաշվել ըստ ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի (կամ ֆրուկտոզի) տրամաչափական կորի:

3. **Տրամաչափական կորի կառուցումը** – տրամաչափական կորի կառուցման նպատակով օգտագործել 0,5 մՄ ֆրուկտոզի կամ 0,5 մկՄ ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի ստանդարտ լուծույթ (ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի հետ ռեզորցիների գոնավորման ինտենսիվությունը կազմում է ֆրուկտոզի հետ ռեզորցիների գոնավորման ինտենսիվության 65%-ը): Փորձանոթների մեջ լցնել 0,1-1,0 մլ ֆրուկտոզի կամ ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի լուծույթներ, բոլոր փորձանոթների ծավալը հասցնել 1 մլ-ի, ավելացնել 1-ական մլ ռեզորցիների և 3-ական մլ 30% HCl լուծույթներ, խառնել և տեղադրել 80°C-ի ջրային բաղնիք 8 թոպե, սառեցնել և ֆոտոկոլորիմետրել: Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր:

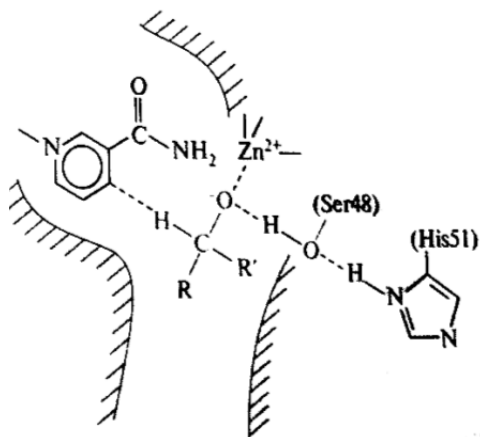
5.3.14. ԱԼԿՈՀՈԼԴԵՀԻԳԻՐՈԳԵՆԱԶԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ՅՈՐԵՆԻ ՄԵՐՄԵՐԻՑ ԵՎ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ալկոհոլդեհիդրոգենազը (ալկոհոլ: ՆԱԴ-օքսիդոռեդուկտազ 1.1.1.1) ցինկ պարունակող ֆերմենտ է, որը կատալիզում է սպիրտների դարձելի օքսիդացումը մինչև ալդեհիդներ կամ կետոններ: Ալկոհոլդեհիդրոգենազը առավել սպեցիֆիկ է ալդեհալդեհիդի և էթիլսպիրտի նկատմամբ:

Ալկոհոլդեհիդրոգենազը կազմված է 4 ենթամիավորներից, ունի 4 ակտիվ կենտրոններ և 4 ամուր կապված Zn-ի իոններ: Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը 140 Կդա է:

Կատալիզի մեխանիզմը: Սպիրտի օքսիդացումը իրականացվում է եռակի կոմպլեքսի ձևավորմամբ, ընդ որում ակտիվ կենտրոնին սկզբում կապվում է կոֆերմենտը: Ցինկի ատոմի հետ կապված ջրի մոլեկուլը ֆերմենտ-սուբստրատային կոմպլեքսի առաջացման ժամանակ տեղափոխվում է իոնիզացված սպիրտով:

Ռեակցիայի արդյունքում սուբստրատից պրոտոնը տեղափոխվում է կոֆերմենտի վրա և առաջանում է ալդեհալդեհիդ: Ռեակցիայի համար սահմանափակող փուլ է համարվում ֆերմենտ-ՆԱԴ-H կոմպլեքսի դիսոցումը:



Նկար 4.

Սուբստրատի կապումը ալկոհոլ-դեհիդրոգենազի ակտիվ կենտրոնում:

ԱԼԿՈՀՈԼԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ՄԱՔՐՈԻՄԸ ՑՈՐԵՆԻ ՍԵՐՄԵՐԻՑ

Ժել-քրոմատոգրաֆիան նյութերի բաժանման եղանակ է, որի հիմքում ընկած է դրանց մոլեկուլային զանգվածների (մասնիկների չափսերի) տարբերությունը: Ժել-քրոմատոգրաֆիայում որպես կրողներ օգտագործում են սեֆադեքսներ (G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, G-100, G-150, G-200), որոնց հիմքը կազմում է լայնակի կապերով կարված պոլիսախարիդ դեքստրանը: Այդ կապերը ձևավորում են եռաչափ ցանցաձև կառուցվածք, որն օժտված է բարձր աստիճանի հիդրոֆիլությամբ, ինչը պայմանավորված է դրա մակերեսին մեծ քանակությամբ բևեռային հիդրօքսիլ խմբերի առկայությամբ: Սեֆադեքսը չի լուծվում ջրում և կայուն է թթվային, հիմնային և աղային լուծույթներում: Ջրի մեջ ընկղմվելուց հետո սեֆադեքսը ուռչում է՝ ձեռք բերելով տարբեր չափսեր ունեցող մոլեկուլները ֆրակցիոնացնելու ունակություն: Խոշոր մասնիկները, որոնք ունեն առավել մեծ մոլեկուլային զանգված, շարժվում են զգալիորեն ավելի արագ, քան փոքր չափսերի մասնիկները, որոնք պահվում են սեֆադեքսի գրանուլների ներսում:

Այսպիսով, կատարվում է մոլեկուլների բաժանում (ֆրակցիոնացում), որը կիրառվում է ա) ցածրամոլեկուլային նյութերը բարձրամոլեկուլային նյութերից անջատելու, բ) չափսերով և մոլեկուլային զանգվածով փոքր մասնիկները խոշոր մասնիկներից բաժանելու համար: Ժել-ֆիլտրացիան օգտագործում են նաև ֆերմենտներին կոֆակտորներից և սուբստրատներից կամ սպիտակուցներին ամինաթթուներից և պեպտիդներից մաքրելու համար:

Հետազոտվող օբյեկտ – ցորենի սերմեր:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգա, քրոմատոգրաֆիկ աշտարակ, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, փորձանոթներ, պիպետներ, ձագար:

Ռեակտիվներ՝

1. 500 մլ 0.05 Մ գլիցինի լուծույթ,
2. 100 մլ 96% էթանոլ,
3. Սեֆադեքս G-25 fine:

Աշխատանքի ընթացքը

Քրոմատոգրաֆիկ աշտարակը լցնել G-25 fine սեֆադեքսով, որը նախապես 24 ժամ ուռչեցվել էր թորած ջրում սենյակային ջերմաստիճանում: Մինչև օգտագործելը սեֆադեքսը լվանալ 0.05 Մ գլիցինի լուծույթով:

Ցորենի սերմերը հոմոգենիզացնել մեխանիկական հոմոգենիզատորում մինչև համասեռ զանգվածի ստացումը: Ավելացնել 0.05 Մ գլիցինի լուծույթ 1:3 հարաբերությամբ (1 գ սերմերին 3 մլ լուծույթ): Չքայքայված բջիջների և կորիզների հեռացման նպատակով հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 7000 g արագությամբ 10 րոպե: Վերստովածքի վրա ավելացնել էթանոլ մինչև 70 % վերջնական կոնցենտրացիա, ուժգին թափահարել 5 րոպե, խառնուրդը ցենտրիֆուգել: Նստվածքը լուծել քիչ քանակի 0.05 Մ գլիցինի լուծույթում և անցկացնել G-25 fine սեֆադեքսով լցված և 0.05 Մ գլիցինի լուծույթով հավասարակշռված աշտարակով (1 x 30 սմ), էլյուցիան կատարել նույն լուծույթով: Էլյուցիայի ենթարկված լուծույթների օպտիկական խտությունները չափել ՖԵԿ-ով 280 նմ ալիքի երկարության տակ: Առավել մեծ ակտիվությամբ ցածր ֆոն ունե-

ցող ֆրակցիաները լիոֆիլիզացնել: Ընդհանուր սպիտակուցի քանակի հաշվարկով նմուշը պարունակում է 90-95% ալկոհոլլեհիդրոգենազ: Սպիտակուցի կոնցենտրացիան որոշել Բիուրետի եղանակով կամ Լոուրիի մեթոդով (հավելված 3): Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշել ստորև ներկայացված ձևով:

Հաշվարկի մեթոդ. Ստացված արդյունքները գրանցել աղյուսակ 15-ում:

Աղյուսակ 15

Յորենի սերմերից ստացված ալկոհոլլեհիդրոգենազի պապրասպունների մաքրման արդյունքները

Մաքրման փուլեր	Ընդհանուր սպիտակուց	Ալկոհոլլեհիդրոգենազի ակտիվությունը		Ելքը %		Մաքրման աստիճան
		Ընդհանուր E, մկմոլ/րոպե	Տեսակարար E/մգ	Ըստ սպիտակուցի	Ըստ ակտիվության	
Ելային պատրաստուկ						
Էթանոլով մատեցնելուց հետո						
Քրոմատոգրաֆիա G-25 fine սեֆադեքսով լրցված աշտարակի վրա						

Աղյուսակը լրացնել հետևյալ բանաձևերով՝
 Ընդհանուր սպիտակուց (մգ)= $C_{\text{սպիտակուց}}(\text{մգ/մլ}) \cdot V(\text{մլ})$

$$\text{Ընդհանուր ակտիվություն } E \text{ (մկմոլ/րոպե)} = \frac{dDV_1V_2}{6.22lV_3dt}$$

տեսակարար ակտիվություն $E/\text{մգ} = E/\text{ընդհանուր սպիտակուց որտեղ,}$

$C_{\text{սպիտակուց}}$ – սպիտակուցի կոնցենտրացիան էլյուատում (մգ/մլ),

V – մմուշի ծավալը (մլ),

dD – կլանումը (պայմ. միավոր),

6.22 – միկրոմոլային կլանման գործակիցը,

l – կյուվետի լայնությունը, սմ,

V_1 – էլյուատում ծավալը, մլ,

V_2 – լուծամզվածքի ծավալը փորձանոթում, մլ,

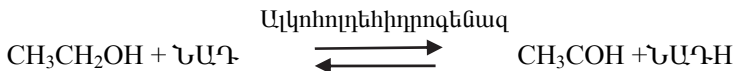
V_3 – մմուշի վերջնական ծավալը փորձանոթում, մլ,

dt – ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

Ելքը ըստ սպիտակուցի և ըստ ակտիվության հաշվարկելու համար հիմք ընդունել ընդհանուր սպիտակուցի և ընդհանուր ակտիվության ցուցանիշները՝ դրանք ելային մմուշներում համարելով 100%: Իսկ մաքրման աստիճանը հաշվել ըստ տեսակարար ակտիվության՝ որպես միավոր ընդունելով ելային մմուշների ցուցանիշները:

5.3.14.1. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը (ըստ էթանոլի օքսիդացման ռեակցիայի)

Ալկոհոլդեհիդրոգենազը (KΦ 1.1.1.1) բուսական և կենդանական բջիջներում ՆԱԴ-ի օքսիդացած և վերականգնված ձևերի առկայությամբ իրականացնում է էնդոգեն սպիրտների և ալդեհիդների նյութափոխանակության կարևոր ռեակցիաներից մեկը: Էթանոլի օքսիդացման ռեակցիայում ֆերմենտի առավելագույն արագությունը դրսևորվում է հիմնային pH-ի պայմաններում:



Ֆերմենտը հատկապես շատ է պարունակվում խմորասնկերում, մարդու և ձիու լյարդում: Խմորասնկերի ալկոհոլդեհիդրոգենազը կազմված է 4 ենթամիավորներից, իսկ կենդանիների և մարդու լյարդում պարունակվող ֆերմենտը՝ 2 ենթամիավորներից: Մարդու լյարդի ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվ կենտրոնում գտնվում են 6 SH խմբեր, որոնցից 2-ը կապ են առաջացնում կատալիտիկ պրոցեսին մասնակցող Zn^{2+} իոնների հետ:

Ռենտգենակառուցվածքային անալիզի մեթոդով հետազոտվել է ձիու լյարդի ալկոհոլդեհիդրոգենազի կառուցվածքը: Յույց է տրվել, որ կատալիտիկ պրոցեսին մասնակցող Zn^{2+} իոնների կապմանը մասնակցում են Ցիս-46 և Ցիս-174 մնացորդների ծծմբի ատոմները:

Խմորասնկերի և ձիու լյարդի ալկոհոլդեհիդրոգենազները ՆԱԴ-ի անալոգներով մոդիֆիկացիայի ենթարկելուց և միշադրված ատոմներով հետազոտվող իդենտիֆիկացումից պարզվել է, որ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում ՆԱԴ-ի անալոգների կապմանը խմորասնկերի ալկոհոլդեհիդրոգենազի մոտ մասնակցում է Ցիս-43, իսկ մարդու լյարդի ֆերմենտի մոտ՝ Ցիս-174:

Խմորասնկերի և բույսերի ալկոհոլդեհիդրոգենազների մշակումը պ-քլորմեթիլբենզոատով առաջացնում է ֆունկցիոնալ կարևոր նշանակություն ունեցող SH խմբերի անդարձելի մոդիֆիկացիա, որն ուղեկցվում է ֆերմենտի ակտիվության նվազմամբ:

Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվությունն ըստ էքսանոլի օքսիդացման ռեակցիայի կարելի է որոշել չափելով առաջացած ՆԱԴ-H-ի կլանումը 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում (մոլային կլանման գործակիցը $6,22 \text{ մՄ}^{-1}$, սմ^{-1}):

Հետազոտման օբյեկտ – ալկոհոլդեհիդրոգենազի 2,5 մկՄ լուծույթ կամ ցորենի սերմերից (կամ լյարդից) ստացված վերնստվածք:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – անալիտիկ կշեռք, ֆոտոէլեկտրակոլորիմետր, կոլբաներ, կյուվետներ, պիպետներ

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր, pH 10 (100 մլ),
2. ՆԱԴ-ի 36 մՄ լուծույթ (24 մգ/մլ) (10 մլ),
3. էթանոլի 0,41 Մ լուծույթ (40 մլ):

Աշխատանքի ընթացքը

Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 2,7 մլ 0,1 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH 10), 0,1 մլ ՆԱԴ-ի 36 մՄ լուծույթ և 0,1 մլ էթանոլի 0,41 Մ լուծույթ, խառնել և ռեակցիան սկսելու նպատակով ավելացնել 0,1 մլ ալկոհոլդե-հիդրոգենազի 2,5 մկՄ լուծույթ կամ 0,1 մլ վերնաստվածք: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտել 1 թուպեում վերականգնված ՆԱԴ-ի մկմոլե-րի քանակով:

Ռեակցիայի ընթացքին հետևել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում ($\varepsilon=6,22 \text{ մՄ}^{-1}$, սմ^{-1}) 15-20 վայրկյան ընդմիջումներով գրանցելով ՆԱԴ-ի կլանումը 1 թուպեի ընթացքում: Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 16-ում

Աղյուսակ 16

Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ազդեցությանը էթանոլի օքսիդացման ընթացքում ստաջացած ՆԱԴ-ի կլանման մեծության կախումը ռեակցիայի չեռոդությունից

Չափումներ	Ռեակցիայի տևողությունը (t), վ.	Կլանումը (D) պայմ. միավ.
1		
2		
3		
4		

Հաշվարկի մեթոդ

Կառուցել ՆԱԴ-ի կլանման մեծության (D) կախումը ռեակցիայի տևողությունից (t) արտահայտող կոր: Ֆերմենտի ակտիվությունը որո-

շել ստացված կորի թեքության անկյան տանգենսով կամ հետևյալ բանաձևերով՝

1. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկմոլ/րոպե գրամ) վերնաստվածքում

$$v = \frac{dC}{dT} = \frac{dD}{6.22ldt}$$

2. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկՄ/րոպե) մաքրված նմուշներում

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dDV_1V_3}{6.22lPV_2dt}$$

որտեղ

dD-կլանման մեծությունը (պայմ. միավոր),

6.22- միկրոմոլային կլանման գործակիցը,

l- կյուվետի լայնությունը, սմ,

P- հյուսվածքի զանգվածը, գ,

V1- լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

V2- վերնաստվածքի ծավալը փորձանոթում, մլ,

V3 – նմուշի վերջնական ծավալը փորձանոթում, մլ,

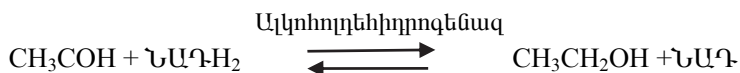
dt-ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

5.3.14.2. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը

(ըստ ացետալդեհիդի վերականգնման ռեակցիայի)

Ալկոհոլդեհիդրոգենազը կատալիզում է ալդեհիդների վերականգնման ռեակցիան՝ առավելագույն արագություն ցուցաբերելով ֆիզիոլոգիական pH-ի սահմաններում:

Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվությունը ըստ ացետալդեհիդի վերականգնման ռեակցիայի կարելի է որոշել 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում չափելով ՆԱԴ-H-ի քանակության անկումը:



Հետազոտման օբյեկտ – ալկոհոլդեհիդրոգենազի 2,5 մկՄ լուծույթ կամ ցորենի սերմերից (կամ լյարդից) ստացված վերնատվածք:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – անալիտիկ կշեռք, սպեկտրաֆոտոմետր, կոլբաներ, կյուվետներ, պիպետներ

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր pH 6,5 (100 մլ),
2. ՆԱԴԻ-ի 11,3 մՄ լուծույթ (8 մգ/մլ) (10 մլ),
3. Ացետալդեհիդի 0,1 Մ լուծույթ (177 մլ):

ՆԱԴԻ-ի լուծույթը և վերնատվածքը պատրաստել փորձից անմիջապես առաջ:

Աշխատանքի ընթացքը

Սպեկտրաֆոտոմետրի կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 2,7 մլ 0,1 Մ Na-ֆոսֆատային բուֆեր, 0,1 մլ ՆԱԴԻ-ի 11,3 մՄ լուծույթ, 0,1 մլ ալկոհոլդեհիդրոգենազի 2,5 մկՄ լուծույթ կամ 0,1 մլ վերնատվածք և ռեակցիան սկսելու նպատակով ավելացնել 0,1 մլ 0,1 Մ ացետալդեհիդի լուծույթ: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտել 1 րոպեում օքսիդացած ՆԱԴԻ-ի մկմոլերի քանակով:

Ռեակցիայի ընթացքին հետևել ՖԷԿ-ով 340 նմ ալիքի երկայնության պայմաններում ($\varepsilon=6,22 \text{ մՄ}^{-1}$, սմ^{-1}) 15-20 վայրկյան ընդմիջումներով գրանցելով ՆԱԴԻ-ի կլանումը 1 րոպեի ընթացքում: Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 17-ում

Աղյուսակ 17

Ալկոհոլդեհիդրոգենազով ացետալդեհիդի վերականգնման ընթացքում օքսիդացած ՆԱԴԻ-ի կլանման մեծության կախումը ռեակցիայի չեղողությունից

Չափումներ	Ռեակցիայի ընթացքի ժամանակը (t), վ.	Կլանումը (D) պայմ. միավ.
1		
2		
3		
4		

Հաշվարկի մեթոդ

Կառուցել ՆԱԴ-ի կլանման մեծության (D) կախումը ռեակցիայի տևողությունից (t) արտահայտող գծապատկեր: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշել ստացված կորի թեքության անկյան տանգենսով կամ հետևյալ բանաձևերով՝

1. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկմոլ/րոպե գրամ) վերնաստվածքում

$$\nu = \frac{dC}{dT} = \frac{dD}{6.22ldt},$$

2. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկՄ/րոպե) մաքրված նմուշներում

$$\nu = \frac{dC}{dt} = \frac{dDV_1V_3}{6.22lPV_2dt},$$

որտեղ

dD-կլանման մեծությունը (պայմ. միավոր),

6.22- միկրոմոլային կլանման գործակիցը,

l- կյուվետի լայնությունը, սմ,

P- հյուսվածքի զանգվածը, գ,

V1- լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

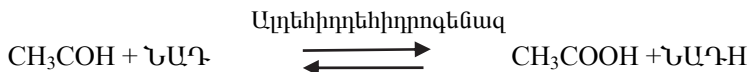
V2- վերնաստվածքի ծավալը փորձանոթում, մլ,

V3 – նմուշի վերջնական ծավալը փորձանոթում, մլ,

dt-ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

5.3.15. ԱԼԳԵՀԻԳԵՀԻԳՐՈԳԵՆԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ալդեհիդրեհիդրոգենազը (KΦ 1.2.1.3) ՆԱԴ-ի առկայության պայմաններում կատալիզում է ացետալդեհիդի օքսիդացման ռեակցիան: Ռեակցիային կարելի է հետևել չափելով վերականգնված ՆԱԴ-ի կլանումը 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում



Հետազոտման օբյեկտ – ցորենի սերմերից (կամ լյարդից) ստացված վերնաստվածք:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – անալիտիկ կշեռք, սպեկտրաֆոտոմետր, կոլբաներ, կյուվետներ, պիպետներ

Ռեակտիվներ

1. 0,1 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր, pH 10 (100 մլ),
2. ՆԱԴ-ի 36 մՄ լուծույթ (24 մգ/մլ) (10 մլ),
3. Ացետալդեհիդի 0,25 Մ լուծույթ (100 մլ):

Ալխատանքի ընթացքը – սպեկտրաֆոտոմետրի կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 2,6 մլ 0,1 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր, 0,1 մլ ՆԱԴ-ի 36 մՄ լուծույթ և 0,1 մլ ացետալդեհիդի 0,25 Մ լուծույթ, խառնել և ռեակցիան սկսելու նպատակով ավելացնել 0,2 մլ վերնաստվածք: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտել 1 թուպեում վերականգնված ՆԱԴ-ի մկմոլերի քանակով:

Ռեակցիայի ընթացքին հետևել 340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում ($\epsilon=6,22 \text{ մՄ}^{-1}$, սմ^{-1}) 15-20 թուպե ընդմիջումներով գրանցելով ՆԱԴ-ի կլանումը 1 թուպեի ընթացքում: Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 18-ում:

Աղյուսակ 18

Ալդեհիդէհիդրոգենազով էքսոդի օքսիդացման ընթացքում առաջացած ՆԱԴH-ի կլանման մեծության կախումը ռեակցիայի տևողությունից

Հափումներ	Ռեակցիայի տևողություն (t), վ.	Կլանում (D) պայմ. միավ.
1		
2		
3		
4		

Հաշվարկի մեթոդը

Կառուցել ՆԱԴH-ի կլանման մեծության (D) կախումը ռեակցիայի տևողությունից (t) ցույց տվող գծապատկեր: Ֆերմենտի ակտիվությունը

որոշել ստացված կորի թեքության անկյան տանգենտով կամ հետևյալ բանաձևերով.

1. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկմոլ/րոպե գրամ) վերնաստվածքում

$$\nu = \frac{dC}{dT} = \frac{dD}{6.22ldt}$$

2. ֆերմենտի ակտիվությունը (մկՄ/րոպե) մաքրված նմուշներում

$$\nu = \frac{dC}{dt} = \frac{dDV_1V_3}{6.22lPV_2dt}$$

որտեղ

dD-կլանման մեծությունը (պայմ. միավոր),

6.22- միկրոմոլային կլանման գործակիցը,

l- կյուվետի լայնությունը, սմ,

P- հյուսվածքի զանգվածը, գ,

V1- լուծամզվածքի ծավալը, մլ,

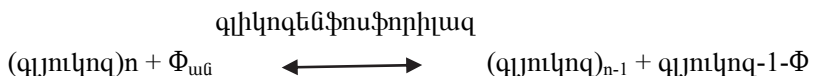
V2- վերնաստվածքի ծավալը փորձանոթում, մլ,

V3 – նմուշի վերջնական ծավալը փորձանոթում, մլ,

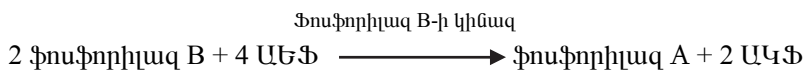
dt-ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

5.3.16. ԳԼԻԿՈԳԵՆՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԿՄԱԽՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐԻՑ, ՆՐԱ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԵՎ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գլիկոգենֆոսֆորիլազը կատալիզում է գլիկոգենի մոլեկուլում α (1→4) գլիկոզիդային կապերի ֆոսֆորիլիտիկ ճեղքումը՝ առաջացնելով գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ: Ֆերմենտը կատալիզում է նաև դարձելի ռեակցիան՝ գլիկոգենի սինթեզը



Ֆերմենտն ունի բարդ ենթամիավորային կառուցվածք, որի կոֆերմենտը պիրիդօքսալֆոսֆատն է: Գլիկոգենֆոսֆորիլազը համարվում է գլիկոգենոլիզի կարգավորիչ ֆերմենտ և գոյություն ունի երկու՝ ակտիվ (A) և ոչ ակտիվ (B) ձևերով, որոնք բաղկացած են մնամատիպ ենթամիավորներից: Ֆոսֆորիլազ A կազմված է 4 ենթամիավորներից, իսկ ֆոսֆորիլազ B՝ երկու: Ոչ ակտիվ ֆոսֆորիլազ B-ն վերածվում է ակտիվ ֆոսֆորիլազ A-ի ֆոսֆորիլացման պրոցեսի արդյունքում և ռեակցիան կատալիզվում է ֆոսֆորիլազ B-ի կինազով:



Գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության խթանումը բերում է մկաններում, լյարդում և արյան մեջ գլյուկոզի պարունակության բարձրացմանը:

Գլիկոգենֆոսֆորիլազ B-ի անջատումը կմախքային մկաններից

Հետազոտման օբյեկտ – կմախքային մկանների 10% հոմոգենատ

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – անալիտիկ կշեռք, հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգա, թերմոստատ, կոլբաներ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Ռեակտիվներ

1. ԷԴ-SU, 1,5 մՄ, pH 7,0,
2. CH_3COOH , 1 Ն,
3. KHCO_3 , բյուրեղային,
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, սենյակային ջերմաստիճանում հալեցած լուծույթ, pH 7,0 (pH-ը կարգավորել NH_4OH -ով),
5. Տրիս-HCl, 1 մՄ, pH 7,5,
6. Տրիս-NaOH, 2 Մ,
7. Ֆիստեին, 0,3 Մ, pH 6,8 (թարմ պատրաստված),
8. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1 Մ,
9. ԱՄՖ, 0,1 Մ, pH 7,0:

Աշխատանքի ընթացքը

Լուծամզում – պատրաստել կմախքային մկանների 10%-ոց հոմոգենատ, ավելացնել հավասար ծավալով ԷԴ-SU-ի լուծույթ, և լուծամզված նպատակով թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 15 րոպե: Լուծամզվածքը առանձնացնել (քամել թանգիֆով) և գործողությունը կրկնել: Հետագա գործողությունները կատարել սառը պայմաններում: Ստացված լուծամզվածքը թթվեցնել նախապես սառեցված CH_3COOH -ով մինչև pH 5,2-5,3 և ցենտրիֆուգել 4°C ջերմաստիճանում 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ 15 րոպե: Վերնստվածքը ֆիլտրել ծալքավոր ֆիլտրով և չեզոքացնել KHCO_3 -ով:

Ֆրակցիոնացում – ստացված լուծամզվածքին անընդհատ խառնելով ավելացնել $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի հազեցած լուծույթ մինչև լրիվ հազեցում (700 մլ/լ): Սպիտակուցների նստեցման նպատակով լուծույթը 10 ժամ թողնել 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում, այնուհետև ցենտրիֆուգել 12000 պտույտ/րոպե արագությամբ 15 րոպե: Նստվածքը լուծել ԷԴ-SU-ի լուծույթում և ենթարկել դիալիզի տրիս-HCl բուֆերի (pH 7,5) դիմաց:

Ջերմային մշակում – սպիտակուցային լուծույթին ավելացնել ցիստեինի լուծույթ մինչև 0,03 Մ վերջնական կոնցենտրացիա, ԷԴ-SU – մինչև 0,001 Մ վերջնական կոնցենտրացիա և լուծույթի pH-ը տրիս-NaOH-ով հասցնել մինչև 7,5: Խառնուրդը 30 րոպե ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանում: Ինկուբացումից հետո ստացված նստվածքը հեռացնել և pH-ը տրիս-NaOH-ով հասցնել մինչև 8,5: Խառնուրդը ինկուբացնել 30 րոպե 37°C : Ինկուբացումից հետո խառնուրդը սառեցնել մինչև սենյակային ջերմաստիճան, չեզոքացնել CH_3COOH -ով և ցենտրիֆուգել սենյակային ջերմաստիճանում 3000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10 րոպե: Նստվածքը հեռացնել:

Քյուրեղացում – ֆերմենտի լուծույթը (վերնստվածք) սառեցնել և ավելացնել 1/100 ծավալով $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ լուծույթ և 1/100 ծավալով ԱՄՖ-ի լուծույթ: 20-30 րոպե հետո կոլիտվի բյուրեղացում:

Վերաբյուրեղացում – ստացված բյուրեղների սուսպենզիան ցենտրիֆուգել 15 000 g արագությամբ 20 րոպե 4° C-ում: Նստվածքը լուծել ցիստեինի լուծույթում (0,03 Մ) 30° C-ում (չլուծված մասը հեռացնել՝ ցենտրիֆուգելով սենյակային ջերմաստիճանում): Լուծույթին ավելացնել $Mg(CH_3COO)_2$ մինչև 0,01 Մ վերջնական կոնցենտրացիա և ԱՄՖ մինչև 0,001 Մ վերջնական կոնցենտրացիա: Խառնուրդը սառեցնել (սառեցնելիս սկսվում է ֆերմենտի բյուրեղացում): Գլիկոգենֆոսֆորիլազի բյուրեղների սուսպենզիան պահել 4° C ջերմաստիճանում:

Գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության որոշումը

Գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության որոշման մեթոդը պայմանավորված է ռեակցիոն խառնուրդում անօրգանական ֆոսֆատի քանակության փոփոխությամբ, որն առաջանում է գլյուկոզ-1-ֆոսֆատից գլիկոգենի առաջացման ժամանակ:

Հետազոտման օբյեկտ – ֆոսֆորիլազ, 1 մգ/մլ գլիցիլ-գլիցինային բուֆերում:

Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգա, թերմոստատ, կուլբաներ, փորձանոթներ, պլապետներ

Ռեակտիվներ

1. Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր 0,2 Մ, pH 6,8,
2. Գլիկոգենի 4 % լուծույթ, պատրաստված գլիցիլ-գլիցինային բուֆերում,
3. Գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ, 0,064 Մ գլիցիլ-գլիցինային բուֆերում,
4. ԱՄՖ, 0,05 Մ, pH 7,0,
5. H_2SO_4 , 0,1 Ն,
6. Անօրգանական ֆոսֆատի որոշման համար անհրաժեշտ ռեակտիվներ (հավելված 2),
7. Բիուրետի եղանակով սպիտակուցի քանակական որոշման համար անհրաժեշտ ռեակտիվներ (հավելված 3):

Աշխատանքի ընթացքը

1. Պատրաստել փորձնական և ստուգիչ մմուշներ հետևյալ բաղադրությամբ.
 - 0,2 մլ գլիկոգենի լուծույթ,
 - 0,02 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ,
 - 0,38 մլ գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր:
2. Նմուշներն ինկուբացնել 30°C ջերմաստիճանում 10 րոպե:
3. Փորձնական մմուշին ավելացնել 0,016 մլ ԱՄՖ-ի լուծույթ և 0,2 մլ գլյուկոզ-1-ֆոսֆատի լուծույթ, արագ խառնել և սկսել ընթացող ռեակցիայի տևողության հաշվարկը:
Ստուգիչ մմուշի մեջ նշված միացությունների փոխարեն ավելացնել թորած ջուր:
4. 5, 10 և 15 րոպեներ անց փորձնական տարբերակից վերցնել 0,2-ական մլ մմուշ և լցնել 3 մլ 0,1 Ն. H_2SO_4 պարունակող փորձանոթների մեջ (ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով): Ստուգիչ մմուշներն (չեն պարունակում ԱՄՖ և գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ) ինկուբացնել փորձնական մմուշների հետ:
5. Վերցված մմուշներում որոշել անօրգանական ֆոսֆատի քանակությունը (հավելված 2):
6. Հաշվել ֆոսֆորիլազի տեսակարար ակտիվությունը ֆերմենտային պատրաստուկում սպիտակուցի քանակը նախապես Բիուրետի եղանակով որոշելուց հետո (հավելված 3):

Գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության կարգավորման ուսումնասիրությունը

Գլիկոգենֆոսֆորիլազի ոչ ակտիվ ձևի անցումը ակտիվ ձևի կատարվում է ֆոսֆորիլազի կինազ ֆերմենտի ազդեցությամբ Mg^{2+} իոնների և ԱԵՖ-ի առկայության պայմաններում, իսկ արգելակումը՝ ֆոսֆատազ ֆերմենտով: Ֆոսֆորիլազի խթանիչ է համարվում ԱՄՖ-ը, իսկ արգելակիչ՝ NaF : Ֆոսֆորիլազի կինազի և ֆոսֆատազի ակտիվությունները կարգավորվում են հորմոնալ եղանակով (գլյուկագոն, ադրենալին և նո-

րադրենալին) Ց-ԱՄՖ-ի, Ca^{2+} -ի, ԱԵՖ-ի, գլյուկոզ-6-ֆոսֆատի և գլյուկոզի մասնակցությամբ:

Ա և B ֆոսֆորիլազների ակտիվությունների որոշումը իրականացվում է հյուսվածքային լուծամզվածքում

Հյուսվածքային լուծամզվածքի ստացումը

Անջատման միջավայր

1. Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր, 0,2 Մ, pH 6,8
2. NaF, 0,2 Մ

Մկանային հյուսվածքի լուծամզվածքի ստացումը

Նատրիումի ֆտորիդի ազդեցությունը ֆոսֆորիլազի ակտիվության վրա ուսումնասիրելու նպատակով պատրաստել երկու տեսակի հյուսվածքային լուծամզվածքներ. մեկը՝ 0,2 Մ NaF պարունակող անջատման միջավայրում, մյուսը՝ առանց NaF:

1. 3-4 գ ճարպից և շարակցական հյուսվածքից մաքրված մկանային հյուսվածքը լվանալ սառեցված անջատման միջավայրով, մկրատով մանրացնել և հոմոգենիզացնել եռապատիկ ծավալով անջատման միջավայրում (pH 6,8) 1 րոպե տևողությամբ:
2. Հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 600 g արագությամբ 10 րոպե: Վերնատվածքը լցնել բաժակի մեջ և դնել սառույցի վրա: Նըստվածքը լուծել քառապատիկ ծավալով անջատման միջավայրում և նորից հոմոգենիզացնել 30 վրկ:
3. Վերնատվածքը և ստացված հոմոգենատը միացնել և ցենտրիֆուգել 15 000 g արագությամբ 15 րոպե:
4. Վերնատվածքը (12 %-ոց հյուսվածքային լուծամզվածք) առանձնացնել (անհրաժեշտության դեպքում ֆիլտրել քառաշերտ թանգիֆով):

Նախքան ֆոսֆորիլազի ակտիվության որոշումը ստացված լուծամզվածքը մոսրացնել 6 անգամ:

Ռեակտիվներ

1. Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր, 0,2 Մ, pH 6,8,
2. Գլիկոզեն, 2 % գլիցիլ-գլիցինային բուֆերում,

3. Գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ, 0,04 Մ գլիցիլ-գլիցինային բուֆերում,
4. NaF, 0,2 Մ,
5. ԱՄՖ, 3մՄ, pH 7,0,
6. ԵԶԶ 5%,
7. Անօրգանական ֆոսֆատի որոշման համար անհրաժեշտ ռեակտիվներ (նայել հավելված 2),
8. Բխորետի եղանակով սպիտակուցի քանակական որոշման համար անհրաժեշտ ռեակտիվներ (նայել հավելված 3):

Աշխատանքի ընթացքը

Որպես ֆերմենտի աղբյուր օգտագործել ինչպես NaF պարունակող, այնպես էլ NaF-ից զուրկ հյուսվածքային լուծամզվածքները:

Պատրաստել փորձնական և ստուգիչ տարբերակներ համաձայն աղյուսակ 19-ում ներկայացված տվյալների:

Աղյուսակ 19

Ֆոսֆորիլազի ակտիվության որոշումը

Նմուշի բաղադրությունը	Ծավալը մմուշում (մլ)	Վերջնական կոնցենտրացիան
Ֆոսֆորիլազ A-ի ակտիվության որոշում		
Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր pH 6,8	0,1	100 մմոլ/լ
NaF	0,2	100 մմոլ/լ
Գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ	0,2	20 մմոլ/լ
Գլիկոլեն	0,2	1 %
Հյուսվածքային լուծամզվածք	0,1	
Ընդհանուր Ֆոսֆորիլազային ակտիվության որոշում		
Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր pH 6,8	0,1	100 մմոլ/լ
NaF	0,2	100 մմոլ/լ
Գլյուկոզ-1-ֆոսֆատ	0,2	20 մմոլ/լ
Գլիկոլեն	0,2	1 %
ԱՄՖ	0,2	1,5 մմոլ/լ
Հյուսվածքային լուծամզվածք	0,1	

Նմուշներն ինկուբացնել 30°C ջերմաստիճանում 10 թույլ: Ռեակցիան կանգնեցնել 0,4 մլ ԵԶԶ-ով, ընդ որում ստուգիչ նմուշների մեջ ԵԶԶ լցնել նախքան ինկուբացիան: Ռեակցիան կանգնեցնելուց հետո նմուշները ցենտրիֆուգել 3 000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10 թույլ: Սպիտակուցից զուրկ վերնստվածքում որոշել անօրգանական ֆոսֆատի քանակությունը:

Ֆոսֆորիլազի ակտիվությունն արտահայտել 1 թույլում 1 մգ սպիտակուցում առաջացած ֆոսֆորական թթվի մկմոլերի քանակով (հյուսվածքային լուծամզվածքում սպիտակուցի քանակությունը նախապես որոշել Բիուրետի մեթոդով (հավելված 3)):

Ընդհանուր ֆոսֆորիլազի տեսակարար ակտիվության և ֆոսֆորիլազ A-ի տեսակարար ակտիվության տարբերությունը ցույց է տալիս ֆոսֆորիլազ B-ի ակտիվությունը:

Ստացված արդյունքներից հետևություններ անել տարբեր ձևերի ֆոսֆորիլազների հարաբերության, ինչպես նաև գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության վրա NaF -ի արգելակող ազդեցության վերաբերյալ:

ԲԱԺԻՆ 6 ԽՆԴԻՐՆԵՐ

Խնդիր 1 Ֆերմենտների տեղաբաշխումը

50 գ առնետի լյարդից 0,25 Մ սախարոզի լուծույթով պատրաստվել է հոմոգենատ: Օգտագործելով դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգման մեթոդը՝ ստացվել են ենթաբջջային ֆրակցիաներ, որոնց մեջ որոշվել է սպիտակուցի քանակությունը և գլյուկոզ-6-ֆոսֆատազի ակտիվությունը (գլյուկոզ-6-ֆոսֆատազի ակտիվությունը որոշվել է գլյուկոզ-6-ֆոսֆատ և հետազոտվող ֆերմենտային պատրաստուկ պարունակող ինկուբացիոն միջավայրում կուտակված անօրգանական ֆոսֆատի քանակությամբ): Ստացված արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Առնետի լյարդի ֆրակցիոնացումը

	Ֆրակցիա				
	հոմոգենատ	կորիզ	միտոքոնդրիումներ	միկրոսոմներ	ցիտոզոլ
Ընդհանուր ծավալը, մլ	50	10	10	5	75
Սպիտակուցի պարունակությունը, մգ/մլ	24	35	49	31	2,2
Ֆոսֆատազի ակտիվության որոշման նպատակով վերցված ծավալը, մլ	0,5	0,5	0,5	0,05	1,0
Անօրգանական ֆոսֆատի պարունակության փոփոխությունը 5 րոպեի ընթացքում, մկգ	23	7,5	19	18	2

1. Որոշել գլյուկոզ-6-ֆոսֆատազի տեսակարար ակտիվությունը (1 լուպեում 1 մգ սպիտակուցի հաշվարկով առաջացած անօրգանական ֆոսֆատի քանակը, մկգ-ով) հոմոգենատում և ենթաբջջային ֆրակցիաներում:
2. Որոշել սպիտակուցի քանակը յուրաքանչյուր ֆրակցիայում:
3. Որոշել սպիտակուցի ընդհանուր պարունակությունը:
4. Ըստ ներկայացված տվյալների ի՞նչ եզրակացություններ կարելի է անել ֆերմենտի տեղաբաշխվածության վերաբերյալ:
5. Ի՞նչ աստիճանի արգելակման է ենթարկվում գլյուկոզ-6-ֆոսֆատազը Ֆրակցիոնացման ժամանակ:

Խնդիր 2

Թրի ամիլազի ակտիվության կախումը pH-ից

Անիոններով բքի ամիլազի ակտիվացման մեխանիզմն ուսումնասիրելու նպատակով ֆերմենտն ինկուբացման են ենթարկել տարբեր pH-երի պայմաններում 0,04 Մ NaCl և NaBr-ի առկայությամբ և առանց այդ աղերի: Ամիլազի ակտիվության վերաբերյալ ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում

Աղյուսակ 2

Անիոնների ազդեցությունը բքի ամիլազի ակտիվության վրա

pH	Ամիլազի ակտիվությունը, պայմ. միավոր		
	Առանց իոնների	0,04 Մ NaCl	0,04 Մ NaBr
5,0	25	30	29
5,3	32	40	38
5,5	40	50	42
6,0	42	75	60
6,5	38	100	80
7,0	22	110	81
7,5	0,8	85	65
8,0	-	60	49
8,5	-	34	29
9,0	-	16	8

1. Կառուցել ֆերմենտի ակտիվության կախումը pH-ից խթանիչների առկայությամբ և առանց այդ անիոնների: Ինչպես են խթանիչներն ազդում ֆերմենտի գործունեության pH օպտիմումի արժեքի վրա
2. Ինչպես կարելի է բացատրել ամիլազի ակտիվության վրա Cl^- և Br^- իոնների ազդեցության տարբեր աստիճանները:
3. Ամիլազի գործունեությունն ապահովող ինչպիսի կարևոր ֆունկցիոնալ խմբեր կան (դրական և բացասական լիցքավորվող):

Խնդիր 3

Ֆոսֆատազի ակտիվության խթանումը

Ուսումնասիրվել է մագնեզիումի սուլֆատի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ֆոսֆատազի ակտիվության վրա: Ֆերմենտի ակտիվությունը գնահատելու համար հետազոտվող ֆերմենտը և մագնեզիումի սուլֆատի տարբեր կոնցենտրացիաներ պարունակող 2 մլ ծավալով ռեակցիոն խառնուրդները 10 րոպե 37°C ջերմաստիճանում ենթարկվել են ինկուբացման և ապա մուշներում որոշվել է անջատված անօրգանական ֆոսֆատի քանակությունը: Հետազոտության արդյունքում ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

MgSO_4 -ի ազդեցությունը ֆոսֆատազի ակտիվության վրա

MgSO_4 , մՄ	Սուբստրատ 2,5 մՄ	Սուբստրատ 5,0 մՄ	Սուբստրատ 10 մՄ	Սուբստրատ 25 մՄ
	Անօրգանական ֆոսֆատ, մկմոլ			
0,5	0,25	0,62	1,06	1,38
1,0	0,56	0,98	1,24	1,65
2,0	0,72	1,27	1,49	2,12
5,0	0,91	1,38	1,73	2,53

1. Ինչպես է կախված ռեակցիայի արագությունը $MgSO_4$ -ի կոնցենտրացիայից:
2. Ինչպիսի ենթադրություններ կարելի է անել ստացված տվյալների հիման վրա:
3. Հիմք ընդունելով ստացված տվյալները կարելի՞ է արդյոք եզրակացություն անել ֆոսֆատազի և $MgSO_4$ -ի փոխազդեցության բնույթի վերաբերյալ:

Խնդիր 4

Գլիկոգենսինթազի ազդեցության մեխանիզմը

Գլիկոգենսինթազը կատալիզում է ուրիդիլներկֆոսֆատ-գլյուկոզից գլյուկոզի մնացորդի տեղափոխումը գլիկոգենի մերանի շղթայի վրա՝ առաջացնելով $\alpha(1-4\rightarrow)$ գլիկոզիդային կապ:

1. Ինչպիսի հնարավոր մեխանիզմով է ընթանում ռեակցիան:
2. Ինչպիսի հետազոտություն է անհրաժեշտ իրականացնել կատալիզի մեխանիզմը պարզաբանելու համար:

Խնդիր 5

Ֆերմենտների ներբջջային կոնցենտրացիան

Ֆերմենտների կոնցենտրացիան բակտերիայի բջջում գնահատելու համար ենթադրենք, որ բջջի ցիտոպլազմայում պարունակվում են 1000 տարբեր ֆերմենտներ, ընդ որում դրանցից յուրաքանչյուրի մոլեկուլային զանգվածը կազմում է 100 000: Հաշվել այդպիսի հիպոթետիկ բջջի ֆերմենտների միջին մոլային կոնցենտրացիաները՝ հաշվի առնելով հետևյալ պայմանները՝

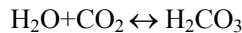
1. բակտերիայի բջիջը 1 մկմ տրամագծով և 2 մկմ բարձրությամբ գլանի տեսք ունի,
2. ցիտոպլազմայի տեսակարար կշիռը կազմում է 1,20 մկգ/մկլ,

3. ցիտոպլազմայի զանգվածի 20%-ը կազմում են լուծելի սպիտակուցները և դրանք ամբողջությամբ կազմված են ֆերմենտներից:

Խնդիր 6

Կարբոանհիդրատի պտույտների թվի որոշումը

Էրիթրոցիտների կարբոանհիդրատ ֆերմենտն ունի 30 000 մոլեկուլային զանգված և կատալիզում է CO_2 -ի դարձելի հիդրատացման գործընթացը,



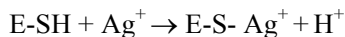
որը կարևոր դեր ունի ամխաթքու գազը հյուսվածքներից դեպի թոքեր տեղափոխելու համար:

Հաշվարկել կարբոանհիդրատի պտույտների թիվը, եթե օպտիմալ պայմաններում 1 բուկետում, 37°C ջերմաստիճանում 10 մկգ մաքուր կարբոանհիդրատը կատալիզում է 0,30 գ CO_2 -ի հիդրատացիան:

Խնդիր 7

Ֆերմենտի ոչ դարձելի արգելակումը

Շատ ֆերմենտներ ոչ դարձելի արգելակվում են այնպիսի ծանր մետաղների իոններով, ինչպիսիք են Mg^{2+} , Cu^{2+} կամ Ag^+ իոնները, որոնք կարող են փոխազդել ֆերմենտի ակտիվության դրսևորման համար կարևոր հանդիսացող սուլֆիդիլ խմբերի հետ՝ առաջացնելով մերկապտիդներ՝



Ag^+ իոնների խնամակցությունը սուլֆիդիլի խմբերի նկատմամբ այնքան մեծ է, որ այդ իոնները կարելի է օգտագործել SH խմբերի քանակական որոշման համար: 1 մգ/մլ կոնցենտրացիայով մաքուր ֆերմենտ պարունակող 10 մլ ֆերմենտի լուծույթին ավելացրել են այնպիսի

քանակով արծաթի նիտրատ, որը բավարար է ֆերմենտի լրիվ ինակտիվացման համար: Այդ նպատակով պահանջվել է 0.342 մկմոլ AgNO_3 :

1. Հաշվել ֆերմենտի նվազագույն մոլեկուլային զանգվածը:
2. Ինչո՞ւ այդ ճանապարհով ստացված ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածի արժեքը կլինի նվազագույնը:

Խնդիր 8

Ֆերմենտի պաշտպանությունը ջերմային բնափոխումից

Ֆերմենտի լուծույթը տաքացնելիս ֆերմենտն աստիճանաբար կորցնում է իր կատալիտիկ ակտիվությունը, ինչը պայմանավորված է նատիվ ֆերմենտի մոլեկուլի կոնֆորմացիայի փոփոխությամբ: Հեքսոկինազ ֆերմենտի լուծույթը 12 րոպե 45° C ջերմաստիճանում ինկուբացնելիս, ֆերմենտը կորցնում է իր ակտիվության 50 %-ը, իսկ եթե 45° C-ում հեքսոկինազն ինկուբացնում են դրա սուբստրատներից մեկի՝ գլյուկոզի շատ մեծ կոնցենտրացիաների առկայության պայմաններում, ապա ֆերմենտը կորցնում է իր ակտիվության միայն 3 %-ը:

Բացատրել, թե ինչու է ֆերմենտի ջերմային բնափոխումը դանդաղում դրա սուբստրատներից մեկի առկայության դեպքում:

Խնդիր 9

Ֆերմենտի տարբերակված արգելակման կիրառությունը

Մարդու արյան շիճուկում պարունակվում են թթվային ֆոսֆատազներ, որոնք թույլ թթվային միջավայրում հիդրոլիզում են ֆոսֆորային էսթերները: Թթվային ֆոսֆատազները սինթեզվում են էրիթրոցիտներում, լյարդում, երիկամներում և շագանակագեղձում: Բժշկական տեսակետից ֆերմենտը կարևոր նշանակություն ունի, քանի որ արյան մեջ դրա կոնցենտրացիայի բարձրացումը կարող է շագանակագեղձի ուռուցքի մասին վկայող ցուցանիշ հանդիսանալ: Շագանակագեղձի ֆոսֆա-

տազն ուժեղ արգելակվում է տարտրատ իռններով այն դեպքում, երբ մյուս հյուսվածքների ֆոսֆատազները այդ իռններով չեն արգելակվում:

Ինչպես կարելի է այս տվյալներն օգտագործելով մշակել մարդու արյան պլազմայում շագանակագեղձի թթվային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշման եղանակ:

ՖՈԼԻՆԻ ՌԵԱԿՏԻՎԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ

100 գ նատրիումի վոլֆրամատը՝ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ և 25 գ նատրիումի մոլիբդատը՝ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ լուծել 700 մլ թորած ջրում: Խառնուրդին ավելացնել 50 մլ 85% H_3PO_4 և 100 մլ խիտ աղաթթու: Խառնուրդը 10 ժամ եռացնել հետադարձ սառնարանով փորձանոթում, ապա ավելացնել 150 գ Li_2SO_4 , 50 մլ թորած ջուր և 5 կաթիլ բրոմաջուր: Բրոմի ավելցուկից ազատվելու համար խառնուրդը եռացնել առանց հետադարձ սառնարանի 15 րոպե քարշիչ պահարանում: Սառեցնելուց հետո խառնուրդի ծավալը թորած ջրով հասցնել 1 լ, ֆիլտրել և պահել հղկված խցանով ապակյա մուգ տարայում: Ռեակտիվի գույնը պետք է լինի դեղին: Օգտագործելուց առաջ ռեակտիվը նոսրացնել ջրով 1:2 հարաբերությամբ՝ պատրաստելով աշխատանքային լուծույթ:

ԱՆՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՖՈՍՖԱՏԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԱՍԿՈՐԲԻՆԱԹԹՎՈՎ**Ռեակտիվներ**

1. ռեակտիվ 1 - 0,42% $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ լուծույթ, պատրաստված 1 Ն H_2SO_4 -ով,
2. ռեակտիվ 2- ասկորբինաթթվի թարմ պատրաստված 10 % լուծույթ,
3. Խառնուրդ 1 - պատրաստել օգտագործելուց անմիջապես առաջ՝ խառնելով 1 և 2 ռեակտիվները 1 : 6 ծավալային հարաբերությամբ,
4. 0,23 մկմոլ/մլ KH_2PO_4 պարունակող ստանդարտ լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

0,9 մլ ծավալով հետազոտվող լուծույթին (սպիտակուց չպարունակող ֆիլտրատ) ավելացնել 3 մլ խառնուրդ 1, խառնել և ինկուբացնել 20 րոպե 45°C կամ 60 րոպե 37°C ջերմաստիճանում: Նմուշները սառեցնելուց հետո ֆոտոկոլորիմետրել 750 նմ ալիքի երկարության տակ ստուգիչի դիմաց:

Ստուգիչ նմուշը պատրաստել այնպես, ինչպես և փորձնական տարբերակը, միայն հետազոտվող լուծույթի փոխարեն ավելացնել թորած ջուր:

Տրամաչափական կոր կառուցելու նպատակով վերցնել ֆոսֆատի ստանդարտ լուծույթի տարբեր քանակներ (0,15; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 մլ ծավալներով) պարունակող փորձանոթներ, ծավալը թորած ջրով հասցնել 0,9 մլ, ավելացնել 3-ական մլ խառնուրդ 1, ապա ինկուբացնել և կոլորիմետրել:

1. ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԲԻՈԻԲԵՏԻ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ռեակտիվներ

1. Սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթ (ցուլի շիճուկային ալբումին), 10 մգ/ 1մլ:
2. Բիուրետի ռեակտիվ - 0,15 գ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ և 0,6 գ K/Na -ի տարաբաշխ (գինեթթվի K/Na -ական աղ) լուծել 50 մլ ջրում, խառնելով ավելացնել 30 մլ 10% NaOH , ավելացնել 0,1 գ KI և լուծույթի ծավալը թորած ջրով հասցնել 100 մլ: Բիուրետի ռեակտիվը պահել պոլիէթիլենային անոթում:

Աշխատանքի ընթացքը

1մլ սպիտակուցի լուծույթին ավելացնել 4 մլ Բիուրետի ռեակտիվ, խառնել և 30 րոպե ինկուբացնել սենյակային ջերմաստիճանում: Այնուհետև կոլորիմետրել 540 նմ ալիքի երկարության տակ ստուգիչի դիմաց:

Ստուգիչ նմուշում սպիտակուցի լուծույթի փոխարեն ավելացնել 1 մլ թորած ջուր:

Տրամաչափական կորի կառուցումը

1 մլ-ում 2-10 մգ սպիտակուց պարունակող 1 մլ ստանդարտ լուծույթին ավելացնել 4 մլ Բիուրետի ռեակտիվ, խառնել և 30 րոպե ինկուբացնել սենյակային ջերմաստիճանում: Նմուշները կոլորիմետրել 540 նմ ալիքի երկարության տակ ստուգիչի դիմաց: Ստուգիչ տարբերակում սպիտակուցի լուծույթի փոխարեն ավելացնել 1 մլ թորած ջուր: Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել համապատասխան կոր:

2. ՍՊԵՏԱԿՈՒՑԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԼՈՌԻՐԻՆ ՄԵԹՈԴՈՎ

Մեթոդի հիմքում ընկած է արոմատիկ ամինաթթուների արգասիքների գոնավորումը, որն առաջանում է պեպտիդային կապերի վրա Ֆոլինի և Բիուրեաի ռեակտիվների համատեղ ազդեցությամբ: Բարձր զգայնությամբ օժտված այս մեթոդով նմուշներում հնարավոր է որոշել 10-100 մկգ սպիտակուցի քանակությունը:

Ռեակտիվներ

1. Ռեակտիվ Ա – 2% Na_2CO_3 լուծված 0,1 Ն NaOH 1 լիտրում:
2. Ռեակտիվ Բ - 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ լուծված լիմոնաթթվային մատրիումի 1% լուծույթում:
3. Ֆոլինի ռեակտիվ (հավելված 1):
4. Ռեակտիվ Գ – 49 մլ ծավալով Ա ռեակտիվը խառնել 1 մլ ծավալով Բ ռեակտիվի հետ: Պատրաստել անմիջապես օգտագործելուց առաջ:
5. Ռեակտիվ Դ – Ֆոլինի մայր ռեակտիվից պատրաստել 1 Ն թթվային լուծույթ: Օրինակ՝ եթե ֆոլինի տիտրման ժամանակ պարզվել է, որ դրանում պարունակվում է 2-3 գրամհամարժեք թթու, ապա Դ ռեակտիվ պատրաստելու համար վերցնել 10 մլ Ֆոլինի ռեակտիվ և 13 մլ թորած ջուր (կարելի է պահել երկար ժամանակ):

Աշխատանքի ընթացքը – կառուցել ալբումինի ստանդարտ կոր: 6 փորձանոթների մեջ լցնել ալբումինի մայրական լուծույթ (1 մլ-ում 0,25 մգ սպիտակուց պարունակող) համապատասխանաբար 0,04 մլ (10 մկգ), 0,08 մլ (20 մկգ), 0,16մլ (40 մկգ), 0,24 մլ (60 մկգ), 0,32 մլ (80 մկգ) 0,4 մլ (100 մկգ) և թորած ջրով բոլոր փորձանոթների ծավալները հասցնել 1մլ-ի: Այնուհետև ավելացնել 5 մլ Գ ռեակտիվ, թափահարել և թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 10 րոպե, ապա ավելացնել 0,5 մլ Դ ռեակտիվ և պահել ևս 30 րոպե: Ստացվում է կապույտ գոնավորում: Գույնի ինտենսիվությունը կոլորիմետրել 750 մմ (կարմիր լուսաֆիլտր) երկարության ալիքով (կրկնել 4-5 անգամ):

Հետագոտվող նմուշում սպիտակուցի քանակությունը որոշելիս ընտրել այնպիսի ծավալ, որն իր մեջ կպարունակի 10-100 մկգրամ սպիտակուց և գործողությունները կատարել վերը նշված կարգով:

Աշխատանքն ավարտել համապատասխան աղյուսակի ձևակերպումով և գծապատկերի կառուցումով:

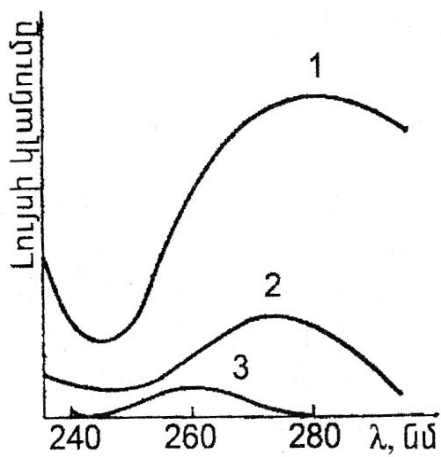
3. ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Սպիտակուցների կազմի մեջ մտնող ամինաթթուներից սպեկտրի ուլտրամանուշակագույն տիրույթում օժտված են զգալի կլանմամբ միայն տրիպտոֆանը, թիրոզինը և ավելի ցածր աստիճանով ֆենիլալանինը: Այդ ամինաթթուներ պարունակող սպիտակուցների լուծույթների օպտիկական խտությունը 280 նմ երկարության ալիքի տիրույթում ուղիղ համեմատական է լուծույթում ամինաթթվի կոնցենտրացիային: Քանի որ սպիտակուցների մեծ մասը պարունակում է թիրոզինի մնացորդներ լուծույթում դրա կլանման չափումը սպեկտրաֆոտոմետրով սպիտակուցի հայտնաբերման արագ և հարմար եղանակ է: Այն կիրառելի է ինչպես սպիտակուցների հետերոգեն խառնուրդների, այնպես էլ անհատական սպիտակուցների լուծույթների համար:

Վերջին դեպքում մոլային կլանումը (օպտիկական խտության գործակիցը) կարելի է ճշգրտորեն չափել կամ հաշվել՝ ելնելով ամինաթթվային կազմից: Տվյալ սպիտակուցի օպտիկական խտության գործակիցը կախված է տրիպտոֆանի, թիրոզինի, ֆենիլալանինի պարունակությունից (նկ. 6):

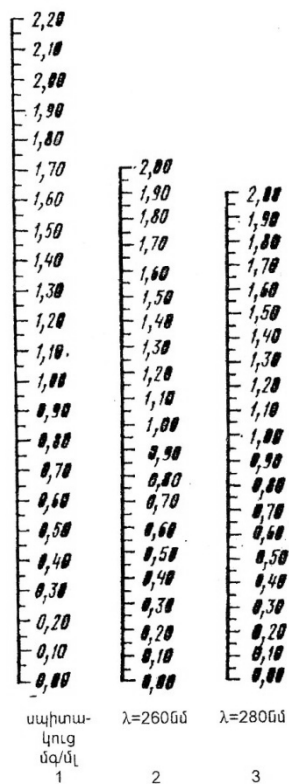
Սարքավորումներ և անհրաժեշտ պարագաներ – հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգա, սպեկտրաֆոտոմետր (1 սմ կյուվետներ), ապակյա աշտարակ, փորձանոթներ, պիպետներ:

Անհրաժեշտ ռեակտիվներ – Սեֆադեքս G-75, սպիտակուցի լուծույթ:



Նկար 6

Տրիպտոֆանի (1), քիրոզինի (2),
Ֆենիլալանինի (3) կլանման
սպեկտրները



Նկար 7

Սպիտակուցի որոշման նոմոգրամա

Աշխատանքի ընթացքը

1. Սպիտակուցի անգույն, թափանցիկ լուծույթը լցնել 1 սմ կյուվետի մեջ և որոշել դրա օպտիկական խտությունը 280 նմ երկարության ալիքի տակ: Սպիտակուցի կոնցենտրացիան հաշվել՝ ելնելով դրա օպտիկական խտության հայտնի գործակցից, կամ որոշել նախապես կառուցված քանակաչափական կորից (նկ. 6):
2. Եթե գործակիցն անհայտ է, կարելի է օգտվել Ադամսի նոմոգրամայից (նկ.7): 2 և 3 սանդղակների թվերը համապատասխանում են սպիտակուցի լուծույթի օպտիկական խտությանը 280 նմ և 260 նմ երկարության ալիքի դեպքում, իսկ 1 սանդղակը՝ նրա կոնցենտրացիային (մգ/մլ): Որոշել հետազոտվող սպիտակուցի օպտիկական խտությունը 280 նմ և 260 նմ երկարության ալիքի տակ: 2 և 3 սանդղակների համապատասխան կետերով անցկացնել երևակայական ուղիղ գիծ, որի հատման կետը 1 սանդղակի հետ համապատասխանում է սպիտակուցի կոնցենտրացիային հետազոտվող լուծույթում: Ադամսի նոմոգրամայում հաշվի են առնվում նաև որոշ դեպքերում սպիտակուցների լուծույթների աղտոտումը մուկլեինաթթուներով, որոնց կլանման մաքսիմումը համապատասխանում է 260 նմ:
3. Պատրաստել կենդանական կամ բուսական հյուսվածքի 10% հոմոգենատ թորած ջրով: Ցենտրիֆուգել 3000 պտ/րոպե արագությամբ 10 րոպե: Ստացված վերնստվածքը պարունակում է լուծելի սպիտակուցների խառնուրդ: Վերնստվածքի որոշակի ծավալը՝ 2-3 մլ լցնել սեֆաղեքսով աշտարակի վրա և ենթարկել էլյուացիայի թորած ջրով: Էլյուատը հավաքել փորձանոթների մեջ 5-ական մլ ծավալով և չափել ստացված ֆրակցիաների օպտիկական խտությունը սպեկտրաֆոտոմետրով, ալիքի երկարությունը 280 նմ: Կառուցել համապատասխան կոր:

ՔՈՒՖԵՐԱՅԻՆ ԽԱՌՆՈՒՐԳՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄ**Գլիցին-HCl բուֆեր (0,05 Մ), pH 2,2-3,6**

գլիցին, մոլ.զանգվ. 75,07

pH	Գլիցին 0,2 Մ,մլ	HCl , 0,2 Մ,մլ	pH	Գլիցին 0,2 Մ, մլ	HCl 0,2 Մ,մլ
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ:

Ֆոսֆատ- լիմոնաթթվային բուֆեր, pH 2,2 – 8,0

(այս բուֆերը չի կարող օգտագործվել, եթե լուծույթում առկա են կալցիումի կամ մագնեզիումի իոններ)

(Na₂HPO₄ 2H₂O, մոլ. զանգ =178,05; լիմոնաթթու·H₂O, մոլ. զանգ=210,14)

pH	Na ₂ HPO ₄ , 0,2 Մ,մլ	լիմոնաթթու 0,1 Մ,մլ	pH	Na ₂ HPO ₄ , 0,2 Մ,մլ	լիմոնաթթու 0,1 Մ,մլ
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Լիմոնաքքվային բուֆեր (0,1 Մ), pH 3,0 – 6,2

(լիմոնաքքու·H₂O, մոլ. զանգ. = 210,14;

Na₃-ցիտրատ ·2H₂O, մոլ. զանգ. = 294,12)

pH	լիմոնաքքու 0,1 Մ, մլ	Na ₃ -ցիտրատ, 0,1 Մ, մլ	pH	լիմոնաքքու 0,1 Մ, մլ	Na ₃ -ցիտրատ, 0,1 Մ, մլ
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	5,4	5,1	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,7
4,4	9,9	10,1	6,2	1,6	18,4
4,6		8,9		11,1	

Na-ացետատ –լիմոնաքքվային բուֆեր (0,2 Մ), pH 3,6 – 5,8

(Na-ացետատ x H₂O, մոլ. զանգ. = 136,09)

pH	Na-ացե- տատ 0,2 Մ, մլ	լիմոնաքքու 0,2 Ն, մլ	pH	Na-ացե- տատ 0,2 Մ, մլ	լիմոնաքքու 0,2 Ն, մլ
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Ացետատային բուֆեր (0,2 Մ), pH 3,6 – 5,8

(Na-ացետատ x 3H₂O, մոլ. զանգ. = 136,09)

pH	Na-ացետատ 0,2 Մ, մլ	CH ₃ COOH 0,2 Մ, մլ	pH	Na-ացետատ 0,2 Մ, մլ	CH ₃ COOH 0,2 Մ, մլ
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (Na-ֆոսֆատային բուֆեր) (0,1 Մ), pH 5,8 – 8,0

(Na₂HPO₄ .2H₂O, մոլ. զանգ. = 178,05; Na₂HPO₄ .12H₂O, մոլ. զանգ. = 358,22;

NaH₂PO₄ .H₂O, մոլ. զանգ. = 138,0;

NaH₂PO₄ .2H₂O, մոլ. զանգ. = 156,03)

pH	Na ₂ HPO ₄ 0,2 Մ, մլ	NaH ₂ PO ₄ 0,2 Մ, մլ	pH	Na ₂ HPO ₄ 0,2 Մ, մլ	NaH ₂ PO ₄ 0,2 Մ, մլ
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ

K- ֆոսֆատային բուֆեր (0,05 Մ), pH 5,8 – 8,0

(KH₂PO₄, մոլ. զանգ. = 136,09)

pH	KH ₂ PO ₄ 0,2 Մ, մլ	KOH 0,2 Մ, մլ	pH	KH ₂ PO ₄ 0,2 Մ, մլ	KOH 0,2 Մ, մլ
5,8	5	0,36	7,0	5	2,91
6,0	5	0,56	7,2	5	3,47
6,2	5	0,81	7,4	5	3,91
6,4	5	1,16	7,6	5	4,24
6,6	5	1,64	7,8	5	4,45
6,8	5	2,24	8,0	5	4,61

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 20 մլ

«Տրիս»-HCl բուֆեր (0,05 Մ), pH 7,2 – 9,1
(Տրիս-(օրթոմեթիլ)-ամինոմեթան, մոլ. զանգ. = 121,14)

pH		Տրիս 0,2 Մ, մլ	HCl 0,2 Մ, մլ
23°C	37°C		
9,1	8,95	25	5,0
8,92	8,78	25	7,5
8,74	8,60	25	10,0
8,62	8,48	25	12,5
8,5	8,37	25	15,0
8,4	8,27	25	17,5
8,32	8,18	25	20,0
8,23	8,10	25	22,5
8,14	8,00	25	25,0
8,05	7,90	25	27,5
7,96	7,82	25	30,0
7,87	7,73	25	32,5
7,77	7,63	25	35,0
7,66	7,52	25	37,5
7,54	7,40	25	40,0
7,36	7,22	25	42,5
7,20	7,05	25	45,0

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 100 մլ

Քորատային բուֆեր (0,2 Մ), pH 7,4 – 9,0

($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (բուրա), մոլ. զանգ. = 381,43; բորաթթու, մոլ. զանգ. = 61,84)

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 Մ, մլ	բորաթթու 0,2 Մ, մլ
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

Քորատային բուֆեր (0,05 Մ), pH 9,3– 10,1

(Na₂B₄O₇ · 10H₂O (քուրա), մոլ. զանգ. = 381,43)

pH	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O 0,05 Մ, մլ	NaOH 0,2 Մ, մլ
9,3	50	0,0
9,4	50	11,0
9,6	50	23,0
9,8	50	34,0
10,0	50	43,0
10,1	50	46,0

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ

Գլիցինային բուֆեր (0,05 Մ), pH 8,6 – 10,6

(Գլիցին, մոլ. զանգ. = 75,07)

pH	Գլիցին 0,2 Մ, մլ	NaOH 0,2 Մ, մլ
8,6	50	4,0
8,8	50	6,0
9,0	50	8,8
9,2	50	12,0
9,4	50	16,8
9,6	50	22,4
9,8	50	27,2
10,0	50	32,0
10,4	50	38,6
10,6	50	45,5

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ

Քիկարբոնատային բուֆեր (0,1 Մ); pH 9,2 – 10,8

(այս բուֆերը չի կարող օգտագործվել, եթե լուծույթում առկա են կալցիումի կամ մագնեզիումի իոններ)

($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, մոլ. զանգ. = 286,2; NaHCO_3 , մոլ. զանգ. = 84)

pH		Na_2CO_3 0,1 Մ, մլ	NaHCO_3 0,1 Մ, մլ
20°C	37°C		
9,16	8,77	1	9
9,40	9,12	2	8
9,51	9,40	3	7
9,78	9,50	4	6
9,90	9,72	5	5
10,14	9,90	6	4
10,28	10,08	7	3
10,53	10,28	8	2
10,83	10,57	9	1

Գլիցիլ-գլիցինային բուֆեր

Համապատասխան զանգվածով գլիցիլ-գլիցինը լուծել բուֆերի անհրաժեշտ ծավալից կրկնակի պակաս ծավալով թորած ջրում (օրինակ, եթե բուֆերի վերջնական ծավալը պետք է կազմի 50 մլ, ապա կշռված գլիցիլ-գլիցինը լուծել 25 մլ ջրում): pH-մետրով չափել լուծույթի pH-ը և փոքր քանակներով ավելացնել հիմքի լուծույթ՝ կարգավորելով ջրածնական ցուցիչի արժեքը: Անհրաժեշտ pH-ի արժեքը ստանալու համար սկզբում օգտագործել 2-4 Մ հիմքի լուծույթ, իսկ երբ ջրածնական ցուցիչի արժեքը մոտենա անհրաժեշտ սահմանին, օգտագործել 0,1-0,2 Մ հիմքի լուծույթ: pH-ի պահանջվող արժեքը ստանալուց հետո բուֆերային լուծույթի ծավալը հասցնել պահանջվող մակարդակի և նորից չափել ջրածնական ցուցիչի արժեքը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В., Павлова Н. А., Руководство к практическим занятиям по биохимии. М., “Медицина”, 2000.
2. Бескровная Е. В., Мосур Е. Ю., Ямковский В. И., Медицинская биохимия: Лабораторный практикум. Омск ОмГУ, 2005.
3. Бокуть С. Б., Ячик Н. Н., Сяхович В. Э., Милютин А. А., Практикум по общей и экологической биохимии Часть II “Ферменты. Ферментативная кинетика”. Минск 2001.
4. Биохимия. Под ред., Северина М., “ГЭОТАР-Медиа”, 2014.
5. Варфоломеев С. Д., Химическая энзимология. Москва 2005.
6. Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е., Ферменты: Лабораторный практикум. Казань, КГТУ, 2010.
7. Гиурман В. Е., Теория вероятностей и математическая статистика. М., 1997.
8. Заводник Л. Б., Будько Т. Н., Почебут О. Н., Практикум для лабораторных работ по «Общей биохимии» (часть 2 – динамическая биохимия)/ Гродно, ГГАУ 2012.
9. Захаров Л. Н., Техника безопасности в химических лабораториях. Л., Химия, 1991.
10. Комов В. П., Шведова В. Н., Биохимия. М., 2004.
11. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д., Биологическая химия М., “Высшая школа”, 2000.
12. Лакин Г. Ф., Биометрия. М.: Высшая школа., 1990.
13. Луценко Н. Г., Лабораторные работы по энзимологии. Москва, 2006.
14. Плакунов В. К., Основы энзимологии. М., “Логос”, 2002.
15. Семак И. В., Зырянова Т. Н., Губич О. Н., Биохимия белков. Минск., БГУ, 2007.

16. Сиянова Н. С., Невзорова Т. А., Неуструева С. Н., Методическое руководство для практикума по биохимии. Казань, 2008.
17. Таганкович А. Д., Колб А. В. и др., Учебно-методическое пособие к практикуму по биологической химии для студентов стоматологического факультета. Минск, БГМУ, 2012.
18. Титова Н. М., Замай Т. Н., Боровкова Г. И., Биохимия и молекулярная биохимия: Лабораторный практикум. Красноярск: ИПК СФУ, 2008.
19. Чиркин А. А., Практикум по биохимии. Минск: Новое знание, 2002.
20. Шапкарин В. В., Королев А. П., Гридина С. Б., Зинкевич Е. П., Биохимия. Сборник лабораторных работ. Кемерово, 2005.
21. Шмелова В. Г., Методы определения активности ферментов. Методическое указание. Санкт-Петербург, 1997.
22. Шмелова В. Г., Выделение ферментов. Методическое указание к лабораторным работам. Санкт-Петербург, 2004.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ	3
---------------------------	---

ԲԱԺԻՆ 1 Անվտանգության տեխնիկայի կանոնները

Կենսաքիմիայի լաբորատորիայում	5
1.1. Անվտանգության կանոնների պահպանումը հրավտանգ և հեշտ բոցավառվող հեղուկների հետ աշխատելիս	5
1.2. Անվտանգության կանոնները թթուներ և հիմքերի հետ աշխատելիս	7
1.3. Անվտանգության կանոնները էլեկտրասարքավորումների հետ աշխատելիս	8
1.4. Առաջին բուժօգնություն	9

ԲԱԺԻՆ 2

Լաբորատոր աշխատանքների ձևակերպման կարգը	10
2.1. Փորձարարական տվյալների հաշվարկի մեթոդներ	10

ԲԱԺԻՆ 3

Հետազոտվող նմուշների պատրաստման և հետազոտման մեթոդները	14
3.1. Կենսաբանական ակտիվ միացությունների լուծամզումը բուսական հյուսվածքներից	16
3.2. Հոմոգենատների պատրաստումը բուսական հյուսվածքներից	16
3.3. Արյան պլազմայի և շիճուկի ստացումը	17
3.4. Հոմոգենատների պատրաստումը կենդանական հյուսվածքներից	18
3.5. Պլազմային թաղանթների անջատումը առնետի լյարդից	18
3.6. Միտոքոնդրիումների անջատումը կմախքային մկաններից	19
3.7. Միտոքոնդրիումների անջատումը սրտամկանից	20
3.8. Միտոքոնդրիումների անջատումը առնետի լյարդից	20

ԲԱԺԻՆ 4

ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

Ֆունկցիոնալ սպիտակուցների ֆիզիկաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրության մեթոդները	22
4.1. Սպիտակուցների թթվային բնափոխման ուսումնասիրությունը	23
4.2. Ֆերմենտների թթվային ինակտիվացումը	24
4.3. Սպիտակուցների ջերմային բնափոխման ուսումնասիրությունը	27

4.4. Ֆերմենտների ջերմային բնավորման ուսումնասիրությունը	29
4.5. Սպիտակ առնետի և գորտի լյարդի արգինազի ինակտիվացումը ԷԴՏԱ-ի ազդեցությամբ.....	31

ԲԱԺԻՆ 5

Ֆերմենտների հետազոտությունների մեթոդները	34
5.1. Ֆերմենտների հետ աշխատանքի հիմնական սկզբունքները	35
5.2. Ֆերմենտի ակտիվության արտահայտման ձևերը.....	38
5.3. Տարբեր դասերին պատկանող մի շարք ֆերմենտների ակտիվությունների որոշումը.....	39
5.3.1. Սկանների ցիտոքրոմօքսիդազի ակտիվության որոշումը	39
5.3.2. Պերօքսիդազի ակտիվության որոշումը կալիումի ֆերոցիանիդով	41
5.3.3. Սուպերօքսիդի սնուցման պատրաստուկի ստացումը և ակտիվության որոշումը.....	46
5.3.4. Լյարդի ուրոկանինազի ակտիվության որոշումը	49
5.3.5. Ասպարտատամինոտրանսֆերազի և ալանին ամինոտրանսֆերազի ակտիվության որոշումը	52
5.3.6. Պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ակտիվության որոշումը	55
5.3.6.1. Գունավոր լուծույթների պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը.....	60
5.3.6.2. Թթվային պրոտեազների ակտիվության որոշումը անտոնի մեթոդով.....	61
5.3.6.3. Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը.....	63
5.3.7. Ամիլազի ակտիվության որոշումը	65
5.3.7.1. α -ամիլազի ակտիվության որոշումը	65
5.3.7.2. Ածխի α - և β -ամիլազների անջատումը և դրանց ակտիվությունների որոշումը	67
5.3.7.3. Ամիլազի ակտիվության որոշումը ըստ Վոլգենմուտի.....	73
5.3.8. Արգինազի ակտիվության որոշումը	75
5.3.9. Ֆոսֆատազների ակտիվության որոշումը	78
5.3.9.1. Թթվային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշումը ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի միջոցով	78
5.3.9.2. Ֆոսֆատազի անջատումը կարտոֆիլից	82
5.3.10. Նյութափոխանակության հանգուցային տարրերի որոշումը	
ԱԵՖ-ազային ռեակցիայի օրինակով.....	85
5.3.11. Իզոցիտրատիլազի ակտիվության որոշումը	91

5.3.12. ՆԱԴՖ –կախյալ իզոցիտրատդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը	93
5.3.13. Գլյուկոզ-6-ֆոսֆատիզոմերազի ակտիվության որոշումը.....	95
5.3.14. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի մաքրումը ցորենի սերմերից և ակտիվության որոշումը	97
5.3.14.1. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը (ըստ էթանոլի օքսիդացման ռեակցիայի)	101
5.3.14.2. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը (ըստ ացետալդեհիդի վերականգնման ռեակցիայի).....	104
5.3.15. Ալդեհիդդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշումը	106
5.3.16. Գլիկոգենֆոսֆորիլազի անջատումը կմախքային մկաններից, նրա ակտիվության որոշումը և ակտիվության կարգավորման ուսումնասիրությունը	108

ԲԱԺԻՆ 6

Խնդիրներ

Խնդիրներ	116
----------------	-----

ՀԱՎԵԼՎԱԾ	123
----------------	-----

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ	136
---------------------	-----

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Հ. Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Է. Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ

**ԷՆԶԻՄՈԼՈԳԻԱՅԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ
ՉԵՌՆԱՐԿ**

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Վ. Դերձյանի

Տպագրված է Time to Print օպերատիվ տպագրությունների սրահում:
ք. Երևան, Խանջյան 15/55

Չափսը՝ 60x84 $\frac{1}{16}$: Տպ. մամուլը՝ 8.875:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1