Սիրելի մասնակիցներ,

Կենսաքիմիայի գործնական աշխատանքի իրականացման համար ձեզ տրվում է **60 րոպե**:

Աշխատանքի գումարային գնահատականը **50 միավոր** է:

ՏՐԻՊՍԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՆՊԱՏԱԿԸ՝

1. **որոշել տրիպսին ֆերմենտի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը**
2. **կառուցել թիրոզինի չափաբերական կորը և հաշվել թիրոզինի կլանման մոլյար գործակիցը,**

<u>ՈՒՇԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆ՝</u> սպեկտրաֆոտոմետրով չափումները կատարելու է ասիստենտը: Այն պահին, երբ նմուշը պատրաստ է չափման, տեղադրեք դրոշակը շտատիվի վրա՝ ուղղահայաց դիրքում:

<u>ԶԳՈՒՇԱՑՈՒՄ՝</u>

հանձնարարության թերթերի վրա որևէ նշում անել **չի կարելի**: Ձեր բոլոր նշումներն իրականացրեք **միայն** ձևաթղթի համապատասխան աղյուսակներում:

ՏՐԻՊՍԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Օրգանիզմում սպիտակուցների հիդրոլիզն (պրոտեոլիզն) ընթանում է պրոտեազ ֆերմենտների մասնակցությամբ և որպես հիդրոլիզի վերջնական արգասիք՝ առաջանում են ամինաթթուներ:

Պրոտեազների կամ պեպտիդհիդրոլազների (պեպսին, տրիպսին, խիմոտրիպսին և այլն) ակտիվության որոշման հիմքում ընկած է թիրոզինի քանակի որոշումը, որն անջատվում է պրոտեազներով սպիտակուցների ստանդարտ լուծույթների (հեմոգլոբին, կազեին, ալբումին և այլն) հիդրոլիզի արդյունքում: Օրինակ, տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվում է կազեին սպիտակուցի ճեղքման արգասիք հանդիսացող թիրոզինի քանակով, քանի որ տրիպսինը ճեղքում է արոմատիկ ամինաթթուների միջև առկա պեպտիդային կապերը: Որպես թիրոզինի հայտնաբերման ազդանյութ օգտագործվում է ֆենոլային ռեակտիվը (Ֆոլինի ռեակտիվ), որը թիրոզինի հետ առաջացնում է կապույտ գունավորում, իսկ վերջինիս ինտենսիվությունը որոշվում է գունաչափական եղանակով:

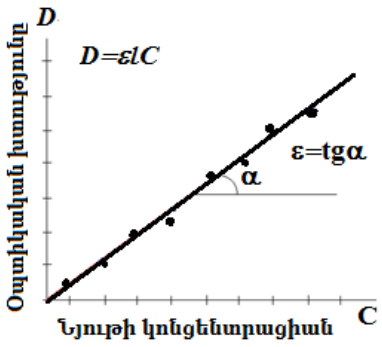
ԿԼԱՆՄԱՆ ՄՈԼՅԱՐ ԳՈՐԾԱԿԻՑԸ

Սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդի հիմքը կայանում է այն երևույթը, որ լույսի ճանապարհին տեղադրված նյութի մոլեկուլները կլանում են որոշակի երկարության էլեկտրամագնիսական ալիքներ, որոշակի ինտենսիվությամբ: Լույսի կլանումը լուծույթի կողմից (աբսորբցիան) հանդիսանում է լուծված նյութի կարևոր ֆիզիկաքիմիական բնութագրիչներից մեկը: Կլանված լույսի ալիքի երկարությունը տարբեր նյութերի համար տարբեր է և խիստ որոշակի արժեքներ ունի: Ըստ Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքի, կլանված լույսի ուժգնությունը, որը կոչվում է **օպտիկական խտություն** (D), կախված է նյութի կոնցենտրացիայից (c) և լույսի անցած ճանապարհի երկարությունից, որը կոչվում է օպտիկական ուղի (*l*).

$$D=\varepsilon c l$$

Այս հավասարման հաստատունը՝ ε-ը, բնութագրում է հետազոտվող նյութը և ցույց է տալիս թե այս կամ այն նյութի 1 մոլ քանակությունը որքան ուժեղ է կլանում իր վրա ընկած խիստ որոշակի ալիքի երկարության լույսը: Այն կոչվում է **կլանման մոլյար գործակից** և կախված չէ նյութի կոնցենտրացիայից և ծավալից: ε-ը սովորաբար չափվում է լ.մոլ$^{-1}$.սմ$^{-1}$ կամ մոլ$^{-1}$.մլ$^{-1}$ միավորով, իսկ D-ն չափողականություն չունեցող մեծություն է:

Օպտիկական խտության կախումը կոնցենտրացիայից ունի ուղիղ գծի տեսք: Ուստի ε-ը կարելի է որոշել գրաֆիկական եղանակով: Քանի որ ε-ը ներկայացված հավասարման հաստատունն է, ապա նրա արժեքը որոշվում է ε=tgα հավասարումով, որտեղ α-ն գրաֆիկի թեքման անկյունն է:



ՖԵՐՄԵՆՏԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ֆերմենտային լուծույթի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (մկմոլ.մլ/ր) որոշվում է հետևյալ հավասարումով՝

$$E=\frac{DV_2}{\varepsilon V_1 t}$$

որտեղ D - փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունն է,

ε – ազդանյութի կլանման մոլյար գործակիցն է, որը հաշվարկվում է ըստ չափաբերական կորի, մկմոլ$^{-1}$մլ$^{-1}$, (ε=tgα)

V_1 - նմուշի ծավալն է, որը վերցվել է ռեակցիա իրականացնելու համար, մլ

V_2 - ռեակցիոն խառնուրդի վերջնական ծավալն է, մլ

t - ինկուբացիայի տևողությունն է, րոպե

Անհրաժեշտ նյութեր

1. տրիպսինի լուծույթ
2. թիրոզինի (M = 181գ/մոլ) 500մկՄ լուծույթ
3. 1% կազեինի լուծույթ
4. 7% եռքլորքացախաթթու (ԵՔՔ)
5. 2% NaOH լուծույթ
6. Ֆենոլային ռեակտիվ (Ֆոլինի ռեակտիվ)
7. թորած ջուր

Անհրաժեշտ սարքեր

1. ավտոմատ պիպետ՝ 1000մկլ տարողությամբ (տես նկար 1):

Ավտոմատ պիպետով ցանկալի ծավալի արժեքը սահմանելու համար պտտում են պիպետի **մխոցի** պտուտակը: Սահմանված արժեքը երևում է **էկրանի** վրա:

Հիշեք, որ յուրաքանչյուր պիպետ ունի իր ամրագրված սահմանները, որոնք նշված են նրա վրա: Չի կարելի դուրս գալ այդ սահմաններից:

Նկար 1. Ավտոմատ պիպետ

Օգտագործման ձևը.

Հագցրեք ծայրակալը իր **բռնիչի** վրա: Թեթև սեղմեք մխոցը մինչև առաջին կանգառը, բարձրացրեք և պիպետի ծայրակալն ուղղահայաց ընկղմեք հեղուկի մեջ՝ 2-4մմ խորությամբ: Դանդաղ բաց թողեք մխոցը՝ մինչև այն վերադառնա իր ելման դիրքին: Հանեք պիպետը հեղուկից և տեղափոխեք պարունակությունը ցանկալի փորձանոթի մեջ: Դրա համար ծայրակալը հպեք փորձանոթի ներքին պատին և սեղմեք մխոցը՝ մինչև առաջին կանգառը, ապա՝ մինչև վերջ, որպեսզի հեղուկը լրիվ դուրս հոսի ծայրակալից: Հանեք պիպետը փորձանոթից: Պիպետը մոտեցրեք օգտագործված ծայրակալների համար նախատեսված անոթին և սեղմելով ծայրակալը հեռացնող սեղմիչը՝ հեռացրեք օգտագործված ծայրակալը:

2. Թերմոստատ (օգտագործելու եք ասիստենտի հետ միասին)

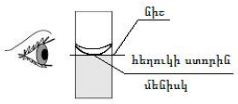
Օգտագործելու ձևը. Համոզվել, որ թերմոստատի ջերմաստիճանային ցուցիչը ցույց է տալիս 37°C: Բացել դուռը, շտատիվով փորձանոթները տեղադրել ներսում, փակել դուռը:

3.Սպեկտրաֆոտոմետր (օգտագործելու եք ասիստենտի հետ միասին)

4.Սպեկտրաֆոտոմետրի կյուվետներ (գտնվում են ասիստենտի մոտ)

<u>Անհրաժեշտ պարագաներ</u>

1. լաբորատոր ձեռնոց (1 զույգ)
2. չափիչ փորձանոթ 10մլ-ոց – 1 հատ (նկ.2)



Նկ.2 Չափիչ փորձանոթներ

Չափիչ անոթների մեջ հեղուկը լցնում են այնպես, որ երևացող մենիսկի հատակը լինի համապատասխան նիշի վրա:

3. փորձանոթներ 15մլ - 2 հատ
4. փորձանոթներ 20մլ – 7 հատ
5. շտատիվ – 2հատ (համարակալված են Ձեր սեղանի համարով)
6. քիմիական բաժակ թորած ջրով– 1հատ

7. սրվակներ՝ անհրաժեշտ նյութերով
8. Ծայրակալ կապույտ - 10 հատ
9. ձագար 5սմ տրամագծով – 1 հատ
10. ֆիլտրի թուղթ - 2 հատ
11. Աղբաման – 1հատ

Գրենական պիտույքներ

1. մարկեր - 1 հատ
2. Գրիչ - 1հատ
3. Մատիտ – 1հատ
4. Ռետին – 1 հատ
5. Միլիմետրական թուղթ (A5 չափս) – 1հատ (կցված պատասխանի ձևաթղթին)
6. Քանոն – 1 հատ
7. Հաշվիչ -1հատ
8. Անկյունաչափ-1հատ

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԹԱՑՔԸ

ՀԱՆՁՆԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ 1

ՏՐԻՊՍԻՆ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԵՎ ԹԻՐՈՋԻՆԻ ՉԱՓԱԲԵՐԱԿԱՆ ԿՈՐԻ ԿԱՌՈՒՑՈՒՄԸ

1. Համարակալեք 2 փորձանոթ (փոքր)՝ 1 և 2:
2. Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշելու համար 1 և 2 փորձանոթներում պատրաստեք ռեակցիոն խառնուրդներ՝ համաձայն ստորև բերված աղյուսակի (նյութերը լցնելու հաջորդականությունը **չխախտել**).

Աղյուսակ

Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը

Փորձանոթի համարը	Տրիպսինի լուծույթի ծավալը, մլ	ԵՔՔ-ի լուծույթի ծավալը, մլ	Կազեինի լուծույթի ծավալը, մլ
1 (ստուգիչ)	1	2	1
2 (փորձնական)	1	-	1

3. Փորձանոթները թափահարեք, որ նմուշները խառնվեն և տեղադրեք համարակալված շտատիվի վրա:
4. Փորձանոթները շտատիվի վրա շարված վիճակում մոտեցեք թերմոստատին և շտատիվը փոխանցեք ասիստենտին՝ թերմոստատում տեղադրելու համար (40°C, 10րոպե):
5. Մինչև ժամանակը լրանալը, ժամանակ խնայելու նպատակով, սկսեք թիրոզինի լուծույթների նոսրացումը՝ չափաբերական կորի կառուցման համար:
6. Ձեզ տրված է թիրոզինի 550մկՄ լուծույթ (թիրոզինի մոլեկուլային զանգվածը՝ 181գ/մոլ է): Անհրաժեշտ է կատարել այդ լուծույթի նոսրացումներ թորած ջրով 10, 5 և 2 անգամ, այնպես, որ լուծույթների վերջնական ծավալները լինեն 1-ական մլ: Այդ նպատակով կատարեք անհրաժեշտ հաշվարկներ և հաշվարկների արդյունքները լրացրեք ձևաթղթի աղյուսակ 1-ում:

Որպես օրինակ բերում ենք լուծույթի 4 անգամ նոսրացման կարգը.

լուծույթը 4 անգամ նոսրացնելու համար անհրաժեշտ է 4 անգամ մեծացնել նրա ծավալը, օրինակ՝ 1մլ լուծույթի ծավալը հասցնել 4մլ-ի: Քանի որ պահանջվում է ունենալ 1մլ վերջնական ծավալ, ապա անհրաժեշտ է վերցնել 0.25մլ սկզբնական լուծույթ և ծավալը թորած ջրով հասցնել 1մլ-ի, այսինքն՝ ավելացնել 0.75մլ թորած ջուր:

7. Համարակալեք 3 փորձանոթ՝ 3, 4 և 5, տեղադրեք դրանք շտատիվի վրա:
8. 10, 5 և 2 անգամ նոսրացումները կատարեք համապատասխանաբար 3, 4 և 5 փորձանոթներում:
9. 10ր ժամանակն անցնելուց հետո ասիստենտի հսկողությամբ վերցրեք Ձեր շտատիվը թերմոստատից և վերադարձեք Ձեր սեղանի մոտ:
10. 2-րդ (փորձնական) փորձանոթի մեջ ավելացրեք 2մլ ԵՔՔ լուծույթ՝ ռեակցիան կանգնեցնելու համար: Փորձանոթները թափահարեք, որ նրանց պարունակությունը խառնվի:
11. Համարակալեք 2 նոր փորձանոթ՝ 6 և 7: Այդ փորձանոթներում համապատասխանաբար ֆիլտրեք 1 և 2 փորձանոթների պարունակությունը՝ օգտագործելով ձագարը և ֆիլտրի թուղթը: Ֆիլտրի թուղթը ծալեք և խոնավացրեք թորած ջրով, այնուհետև տեղադրեք ձագարի վրա: Նախ ֆիլտրեք 1-ին փորձանոթի (ստուգիչի) պարունակությունը 6-րդ փորձանոթում, ապա փոխեք ֆիլտրի թուղթը և նույն եղանակով ֆիլտրեք 2-րդ (փորձնական) փորձանոթի պարունակությունը 7-րդ փորձանոթում: Ձագարը ողողեք ծորակի ջրով և դրեք սեղանի վրա:

12. Համարակալեք ևս 2 նոր փորձանոթ՝ 8 և 9 և դրեք շտատիվի վրա՝ թիրոզինի նոսրացված լուծույթով փորձանոթների (3, 4 և 5) կողքին:
13. Ստացված ֆիլտրատներում տրիպսինի ակտիվությունը որոշելու համար 6 և 7 փորձանոթներից 1-ական մլ նմուշ լցրեք համապատասխանաբար 8 և 9 փորձանոթների մեջ:
14. Այնուհետև իրականացրեք գունավորման ռեակցիան ինչպես տրիպսինի նմուշներում, այնպես էլ՝ թիրոզինի նոսրացված լուծույթներում: Դրա համար 3, 4, 5, 8 և 9 փորձանոթներից յուրաքանչյուրում չափիչ փորձանոթի օգնությամբ ավելացրեք 5-ական մլ 0.5Մ NaOH-ի լուծույթ, այնուհետև յուրաքանչյուր փորձանոթին ավելացրեք 0.5-ական մլ Ֆոլինի ռեակտիվ:
15. Թողեք փորձանոթները 5ր, որից հետո նստած տեղից բարձրացրեք Ձեզ տրված դրոշակը և տեղադրեք շտատիվի վրա՝ ասիստենտին հրավիրելու համար:
16. Երբ ասիստենտը մոտենա Ձեզ, նրան հանձնեք Ձեր համարակալված շտատիվը: Ասիստենտը կիրականացնի Ձեր լուծույթների սպեկտրաչափումը (λ=630նմ ալիքի երկարության տակ) և օպտիկական խտության արդյունքները կտա Ձեզ՝ առանձին թղթի վրա:
17. Այդ ընթացքում, ժամանակը խնայելու նպատակով, կատարեք համապատասխան հաշվարկներ: Հաշվի առնելով հետազոտության համար Ձեր վերցրած նմուշների ծավալները և թիրոզինի լուծույթի նախնական կոնցենտրացիան, ինչպես նաև՝ յուրաքանչյուր նմուշի նոսրացման աստիճանը՝ հաշվեք թիրոզինի յուրաքանչյուր նմուշում (փորձանոթ 3, 4 և 5) թիրոզինի կոնցենտրացիան մկգ/մլ-ով: Ստացված արդյունքները գրանցեք ձևաթղթում բերված աղյուսակ 2-ում:
18. Սպեկտրալ չափումներ կատարելուց հետո ասիստենտը կհանձնի Ձեզ նաև նոր տվյալների թերթիկ, որի հիման վրա պետք է կառուցեք թիրոզինի չափաբերական կորը: Երկու թերթիկներն էլ ասիստենտը կամրացնի պատասխանների Ձեր ձևաթղթին:
19. Արտագրեք Ձեր թիրոզինի նմուշների համար (փորձանոթներ 3, 4 և 5) ստացված օպտիկական խտության արդյունքները ձևաթղթի աղյուսակ 2-ի համապատասխան վանդակներում:

ՀԱՆՁՆԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ 3

Չափաբերական կորի կառուցումը և տրիպսինի ակտիվության հաշվարկը

1. Ձեր պատասխանների ձևաթղթին կցված է միլիմետրական թուղթ: Այդ թղթի վրա կառուցեք թիրոզինի լուծույթների օպտիկական կլանման կախումը թիրոզինի կոնցենտրացիայից արտահայտող կոր այն տվյալների հիման վրա, որը Ձեզ է տվել ասիստենտը: Այդ

նպատակով օրդինատների առանցքի վրա տեղադրեք լուծույթի օպտիկական կլանման տվյալները (փորձանոթներ 3, 4 և 5), իսկ աբսցիսների առանցքի վրա՝ թիրոզինի կոնցենտրացիան մկգ/մլ-ով աղյուսակ 2-ից: Հաշվի առեք, որ օպտիկական կլանումը ուղիղ համեմատական է թիրոզինի քանակությանը և չափաբերական կորը դուրս է գալիս կոորդինատների սկզբնակետից: Մասշտաբն ընտրելիս միլիմետրական թղթի յուրաքանչյուր քառակուսին OX առանցքի վրա համարել 1 միավոր, իսկ OY առանցքի վրա՝ 0.01 միավոր:

2. Ստացված գրաֆիկի վրա անկյունաչափով որոշեք ուղղի թեքման անկյան մեծությունը՝ α:
3. ε=tgα բանաձևում տեղադրելով թեքման α անկյան արժեքը՝ որոշեք ε-ի մեծությունը և գրանցեք այն ձևաթղթի աղյուսակ 3-ում:
4. Ստանալով ε-ի արժեքը՝ որոշեք տրիպսին ֆերմենտի ակտիվությունը (մկմոլ.մլ/ր) հետևյալ բանաձևով՝

$$E = \frac{(D2-D1)V_2}{\varepsilon V_1 t}$$

որտեղ D2 և D1 – փորձնական և ստուգիչ նմուշների օպտիկական խտության արժեքներն են,

ε – թիրոզինի կլանման մոլյար գործակիցն է, որը հաշվարկվում է ըստ չափաբերական կորի, մկմոլ$^{-1}$մլ$^{-1}$

V_1 - նմուշի ծավալն է, որը վերցվել է Ֆոլինի ռեակցիա իրականացնելու համար, մլ

V_2 - ռեակցիոն խառնուրդի ընդհանուր ծավալն է, մլ

t - ինկուբացիայի տևողությունն է, րոպե

5. Ստացված տվյալը գրանցեք ձևաթղթում բերված աղյուսակ 3-ում:

Մաղթում ենք Ձեզ հաջողություն