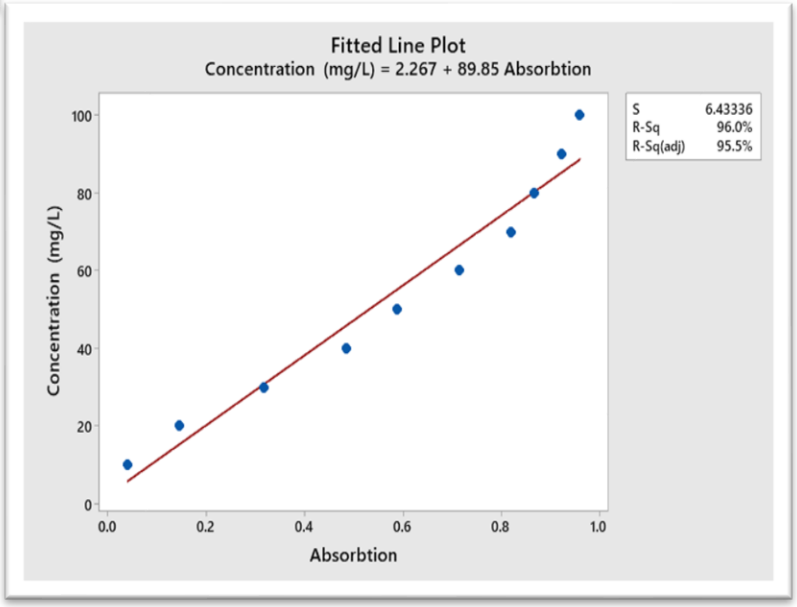
ს. ღოღობერიძე, მ. გორგილაძე, ჯ. შაინიძე, მ. ხოსიტაშვილი,
ა. მიგდალია, დ. კატსანტონის

ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა



ბათუმი
2021

რედაქტორი:

მედეა ორმოცაძე - ტექნიკის მეცნიერებათა დოქტორი, საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის კვების მრეწველობის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტის მთავარი მეცნიერი-თანამშრომელი, თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

რეცენზენტი:

თეა ხოსიტაშვილი - სასურსათო ტექნოლოგიების დოქტორი, თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

ცილები მნიშვნელოვანი მაკრომოლეკულებია ცოცხალ სისტემებში, რომლებიც გადამწყვეტ ფუნქციებს ასრულებენ ყველა ბიოლოგიურ პროცესში. სხვადასხვა უჯრედი შეიცავს ცილებს განსხვავებული კონცენტრაციით. ცხოველურ და ბაქტერიულ უჯრედებში ცილები შეადგენენ საერთო უჯრედული მასის დაახლოებით 50% -ს, ხოლო მცენარეთა უჯრედებში ცილები იკავებენ უჯრედული მასის მცირე ნაწილს უჯრედის კედელში ცელულოზის და სხვა პოლისაქარიდების არსებობის გამო. ცილის კონცენტრაცია მნიშვნელოვანი პარამეტრია ცილის რაოდენობისა და ხარისხის, ასევე ბიოლოგიური რეაქციების მდგომარეობის დასადგენად. ნაშრომში აღწერილია ბიოლოგიურ ნიმუშებში ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მოდიფიცირებული მეთოდის გამოყენებით, სადაც გამოყენებულია საბერძნეთის მემცენარეობისა და გენეტიკური რესურსების ინსტიტუტში საგრანტო პროექტის „Agrocycle" ფარგლებში განხორციელებული ექსპერიმენტების შედეგები. ნაშრომი განკუთვნილია ბიოლოგიის, აგრარული დარგის სტუდენტებისა და ბიოქიმიის შესწავლით დაინტერესებული პირებისთვის.

ნაშრომი გამოცემულია არასამთავრობო ორგანიზაცია საქართველო „კორუფციასთან ბრძოლის" საინფორმაციო ცენტრის ხელმძღვანელის მ. ღოღობერიძის ფინანსური მხარდაჭერით.

ნაშრომი დაკაბადონებულია და დაბეჭდილია შპს „ბეტა პრინტის" მიერ
მის: ბათუმი, მელიქიშვილის ქ. N 13
ელ. ფოსტა: infobetaprint@gmail.com
ISBN 978-9941-8-3016-7

შინაარსი

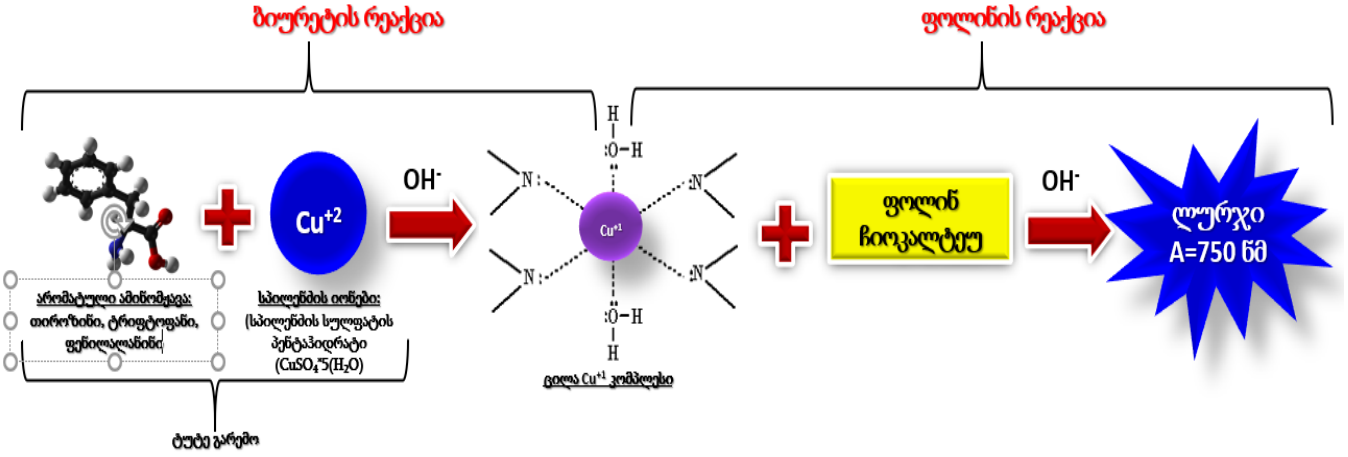
1.	**მოკლე მიმოხილვა**	**2**
2.	**ლაბორატორიაში მუშაობის უსაფრთხოების წესები**	**3**
3.	**ძირითადი ხსნარების მომზადება**	**4**
3.1.	საჭირო ქიმიური ჭურჭელი და დანადგარები	4
3.2.	საჭირო რეაგენტები	5
3.3.	ნატრიუმის ქლორიდის/ნატრიუმის ჰიდროქსიდის ხსნარის მომზადება	6
3.4.	ლოურის ძირითადი ხსნარების მომზადება	6
3.5.	ფოლინ- ჩიკალტეუს ხსნარის მომზადება	8
3.6.	BSA - ხარის შრატის ალბუმინის ძირითადი ხსნარის მომზადება	9
4.	**საკალიბრაციო მრუდი**	**11**
4.1.	საჭირო ქიმიური რეაგენტები, ჭურჭელი და დანადგარები	11
4.2.	BSA - სტანდარტული ხსნარების მომზადების პროცედურა	11
4.3.	სტანდარტული (საკალიბრო) მრუდის აგება	13
5.	**ნიმუშებში ცილის უცნობი კონცენტრაციის განსაზღვრა**	**16**
5.1.	საჭირო ქიმიური ჭურჭელი, დანადგარები და რეაქტივები	16
5.2.	პროცედურა I: ცილის გამოყოფა	16
5.3.	პროცედურა II: ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა	17
6.	**მონაცემთა დამუშავება: ცილის უცნობი კონცენტრაციის გამოთვლა ნიმუშებში**	**19**
7.	**გამოყენებული ლიტერტურა**	**20**
8.	**დანართები**	**21**

1. მიმოხილვა

ლოურის ცილის ანალიზი (ცხრ. 1) ეფუძნება ბიურეტის რეაქციას, რომლის დროსაც სპილენძის იონები ურთიერთქმედებენ პეპტიდების აზოტის ოთხ ატომთან და ქმნიან სპილენძის კომპლექსურ შენაერთს. ტუტე გარემოში ფოლინ-ჩოკალტეუს რეაგენტის (ფოსფოთუნგისტიკური მჟავას და ფოსფომოლიბდის მჟავას ნარევი) დამატებით, რეაგენტი მოქმედებს სპილენძის იონებსა და არომატული ამინომჟავების გვერდით ჯაჭვებზე, რის შედეგად წარმოიქმნება ლურჯი შეფერილობის კომპლექსი ე.წ. "ჰეტეროპოლიმოლიბდენის ლურჯი". მიღებული შეფერილობის ინტენსივობა პირდაპირპროპორციულია ხსნარში არომატული ამინომჟავების რაოდენობისა, რომელიც იზომება სპექტროფოტომეტრულად (λ=750 ნმ) (სურ.1), (Lowry et al., 1951).

ცხრილი. 1. ლოურის მეთოდის დახასიათება

ანალიზი	აბსორბცია	მექანიზმი	გამოვლენის დიაპაზონი	ამინომჟავების გამოვლენა	უპირატესობები	ნაკლოვანებები
ლოური	750 ნმ	აერთიანებს ბიურეტისა და ფოლინის რეაქციებს	0.01–1.0 მგ / მლ	თიროზინი, ტრიფტოფანი, ფენილალანინი	მაღალი მგრძნობელობა და სიზუსტე	შეუთავსებლობა ნივთიერებებთან (K^+, Mg^{2+}, NH^{4+}, EDTA, Tris-HCl, DTT, ნახშირწყლები)



სურათი 1. ლოურის ანალიზის სქემა

2. ლაბორატორიაში მუშაობის უსაფრთხოების წესები

გვახსოვდეს!

ლაბორატორიაში მუშაობისას აუცილებელია სპეცტანსაცმლის ტარება:

დამცავი სათვალე

სამუშაო ხალათი

სამუშაო ხელთათმანი

გვახსოვდეს!

ცდის დროს ლაბორატორიაში აკრძალულია:

ჭამა

პირით ნივთიერებათა ამოწოვა

ნივთიერებებისთვის გემოს გასინჯვა ან დაყნოსვა

სახეზე ხელით შეხება

ხსნარების შენჯღრევისას ჭურჭლის თითით დაცობა

გამოუყენებელი ნარჩენის რეაქტივების საწყის ჭურჭელში დაბრუნება

უწარწეროდ რეაქტივიანი ჭურჭლის შენახვა

რეაქტივიანი ჭურჭლის თავღია დატოვება

- ასევე კონცენტრირებული ტუტეების, მჟავების, მომწამლავი ნივთიერებების ხსნარების, ადვილად აალებადი ნივთიერებების ნარჩენების ნიჟარაში გადაღვრა. ისინი ამისთვის სპეციალურად გამოყოფილ ჭურჭელში უნდა შეგროვდეს.

3. ძირითადი ხსნარების მომზადება

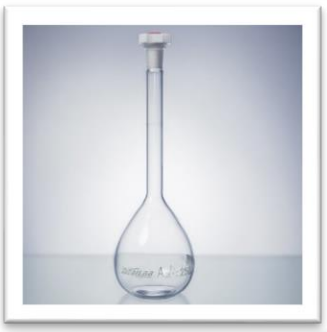
3.1. საჭირო ქიმიური ჭურჭელი და დანადგარები

ანალიზური სასწორი

ასაწონი ჭურჭელი

პიპეტი

მაგნიტური სარეველა



მზომი კოლბა

ავტოკალვირებადი ბოთლი პოლიპროპილენის სახურავით

მენზურა

ერლენმაიერის კოლბა

მაცივარი

შპატელი

ლაბორატორიული მარკერი

ვორტექსი

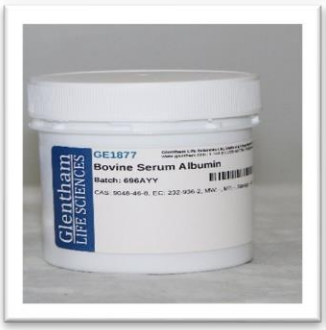
3.2. საჭირო რეაგენტები

ნატრიუმის კარბონატი

სპილენძის სულფატის პენტაჰიდრატი

ნატრიუმის ჰიდროქსიდი

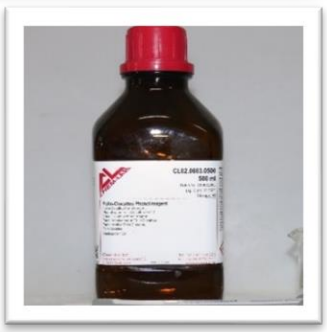
ნატრიუმის ქლორიდი



ხარის შრატის ალბუმინი

დისტილირებული წყალი

ნატრიუმის ტარტრატი



ფოლინ-ჩოკალტეუს რეაგენტი

<u>რეაგენტები და უსაფრთხოების ზომები!</u>

- სპილენძის სულფატის პენტაჰიდრატი ($CuSO_4*5(H_2O)$- იწვევს კანისა და თვალების გაღიზიანებას, მწვავედ ტოქსიკური (პერორალური, დერმატოლოგიური, ინჰალაციური).
- ნატრიუმის ტარტრატი (Na_2 Tartrate.2(H_2O) -არ არის საშიში ჯანმრთელობისთვის.
- ფოლინ ჩიკალტეუს რეაგენტი - იწვევს სასუნთქი გზების და თვალების გაღიზიანებას.
- ხარის შრატის ალბუმინი – გადაყლაპვისას მავნეა.
- ნატრიუმის ქლორიდი (NaCl) - იწვევს სასუნთქი გზების გაღიზიანებას.
- ნატრიუმის ჰიდროქსიდი (NaOH) - კოროზიულია.
- ნატრიუმის კარბონატი (Na_2CO_3) - იწვევს სასუნთქი გზების გაღიზიანებას.

3.3. ნატრიუმის ქლორიდისა და ნატრიუმის ჰიდროქსიდის ძირითადი ხსნარის მომზადება

- ანალიზური სასწორისა და ასაწონი ჭურჭელის საშუალებით ავწონოთ **40 გ** NaOH და **35 გ** NaCl;
- გადავიტანოთ აწონილი რეაქტივები **1000 მლ** მოცულობის მზომ კოლბაში, რომელშიც **100 მლ** გამოხდილი წყალია. მოვურიოთ ხსნარს ნივთიერებების გახსნამდე მაგნიტური სარეველას გამოყენებით;
- წყალში რეაქტივების გახსნის შემდეგ, შევავსოთ მზომი კოლბა გამოხდილი წყლით ნიშნულამდე და კლვავ მოვურიოთ ხსნარს;
- ნივთიერებების გახსნის შემდეგ, გადავიტანოთ ხსნარი მინის ბოთლში, დავახუროთ სახურავი და შევინახოთ ოთახის ტემპერატურაზე (სურ. 2, ცხრ. 2).

სურათი 2. ცდის განხორციელებისათვის საჭირო რეაგენტები და ქიმიური ჭურჭელი

ცხრილი 2. ხნარის მომზადებისთვის საჭირო რეაგენტები (1000მლ 0.1მ NaOH 3.5% NaCl-ში)

რეაგენტები	**რაოდენობა**
ნატრიუმის ჰიდროქსიდი (**NaOH**)	**40 გ**
ნატრიუმის ქლორიდი (**NaCl**)	**35 გ**
დისტილირებული წყალი	**1000 მლ**

3.4. ლოურის ძირითადი ხსნარების მომზადება

- **ძირითადი ხსნარი A**

- ავწონოთ **2.8598 გ** NaOH და **14.3084 გ** Na_2CO_3 ანალიზური სასწორისა და ასაწონი ჭურჭელის საშუალებით (ცხრ. 3, სურ. 3);
- გადავიტანოთ აწონილი რეაქტივები **500 მლ** მოცულობის მზომ კოლბაში, რომელშიც **100 მლ** გამოხდილი წყალია. მოვურიოთ ხსნარს მაგნიტური სარეველას გამოყენებით ნივთიერებების გახსნამდე;
- წყალში რეაქტივების გახსნის შემდეგ, მენზურის საშუალებით დავამატოთ დარჩენილი **400 მლ** გამოხდილი წყალი და კვლავ მოვურიოთ ნივთიერებების საბოლოო გახსნამდე;
- გადავიტანოთ ხსნარი ავტოკლავირებად ბოთლში, დავახუროთ სახურავი და შევინახოთ მაცივარში +4^0 C-ზე.

- **ძირითადი ხსნარი B**

- ავწონოთ **1.4232 გ** $CuSO_4*5(H_2O)$ ანალიზური სასწორისა და ასაწონი ჭურჭელის საშუალებით (ცხრ. 3, სურ. 3);
- გადავიტანოთ აწონილი რეაქტივები **100 მლ** მოცულობის მზომ კოლბაში, რომელშიც **50 მლ** გამოხდილი წყალია. მოვურიოთ ხსნარს მაგნიტური სარეველას გამოყენებით ნივთიერებების გახსნამდე;
- წყალში რეაქტივების გახსნის შემდეგ, მენზურის საშუალებით დავამატოთ დარჩენილი **50 მლ** გამოხდილი წყალი და კვლავ მოვურიოთ ნივთიერებების საბოლოო გახსნამდე;

გადავიტანოთ ხსნარი ავტოკლავირებად ბოთლში, დავახუროთ სახურავი და შევინახოთ მაცივარში +4^0 C-ზე.

- **ძირითადი ხნარი C**

- ავწონოთ **2.85299 გ** Na_2 Tartrate.2(H_2O) ანალიზური სასწორისა და ასაწონი ჭურჭელის საშუალებით (ცხრ. 3, სურ. 3);
- გადავიტანოთ აწონილი რეაქტივები **100 მლ** მოცულობის მზომ კოლბაში, რომელშიც **50 მლ** გამოხდილი წყალია. მოვურიოთ ხსნარს მაგნიტური სარეველას გამოყენებით ნივთიერებების გახსნამდე;
- წყალში რეაქტივების გახსნის შემდეგ, მენზურის საშუალებით დავამატოთ დარჩენილი **50 მლ** გამოხდილი წყალი და კვლავ მოვურიოთ ნივთიერებების საბოლოო გახსნამდე; გადავიტანოთ ხსნარი ავტოკლავირებად ბოთლში, დავახუროთ სახურავი და შევინახოთ მაცივარში +4^0 C-ზე.

ცხრილი 3. ხნარების მომზადებისთვის საჭირო რეაგენტები

რეაგენტები	**ძირითადი ხსნარები**		
	ხსნარი A (500 მლ)	**ხსნარი B (100 მლ)**	**ხსნარი C (100 მლ)**
დისტილირებული წყალი (H_2O)	**500 მლ**	**100 მლ**	**100 მლ**
ნატრიუმ ჰიდროქსიდი ($NaOH$)	**2.8598 გ**	**x**	**x**
ნატრიუმ კარბონატი (Na_2CO_3)	**14.3084 გ**	**x**	**x**
სპილენძის სულფატის პენტაჰიდრატი ($CuSO_4$*5(H_2O)	**x**	**1.4232 გ**	**x**
ნატრიუმის ტარტრატი (Na_2Tartrate*2(H_2O)	**x**	**x**	**2.85299 გ**

სურათი 3. ცდის განხორციელებისათვის საჭირო რეაგენტები და ქიმიური ჭურჭელი

ანალიზის დაწყებამდე, ლოურის ძირითადი ხსნარები უნდა გამოვიღოთ მაცივრიდან და მოვათავსოთ ოთახის ტემპერატურაზე დაახლოებით 20 წთ. განმავლობაში. ლოურის ხსნარის დასამზადებლად შევურიოთ ლოურის ძირითადი A, B და C ხსნარები შემდეგი თანაფარდობით:

ხსნარი A (100 მლ) + ხსნარი B (1 მლ) + ხსნარი C (1 მლ)

მოვურიოთ ხსნარს ნივთიერებების გახსნამდე მაგნიტური სარეველას გამოყენებით, გადავიტანოთ ავტოკლავირებად ბოთლში და გამოვიყენოთ ცილის ანალიზისათვის.

სურათი 4. ლოურის ხსნარის მომზადება

3.5. ფოლინ- ჩიკალტეუს ხსნარის მომზადება

ფოლინის ხსნარი მგრძნობიარეა შუქზე. იგი უნდა მოვამზადოთ ნიმუშების პირველ ინკუბაციამდე 5 წუთით ადრე და შევინახოთ ბნელ ადგილას.

- პიპეტის საშუალებით 5 მლ ფოლინ-ჩიკალტეუს ფენოლური რეაგენტი მოვათავსოთ ცენტრიფუგის ტუბში;
- დავამატოთ 6 მლ გამოხდილი წყალი და დავავორტექსოთ (ცხრ. 4);
- შევინახოთ ხსნარი ბნელ ადგილას (სურ.5).

ცხრილი 4. ფოლინ ჩიკალტეუს ხსნარის მომზადებისთვის საჭირო რეაგენტები

რეაგენტები	რაოდენობა (მლ)
ფოლინ ჩიკალტეუს რეაქტივი	5 მლ
გამოხდილი წყალი (H_2O)	6 მლ

სურათი 5. ა. ცდის განხორციელებისათვის საჭირო რეაგენტები და ქიმიური ჭურჭელი; ბ. ფოლინ-ჩიკალტეუს ხსნარი

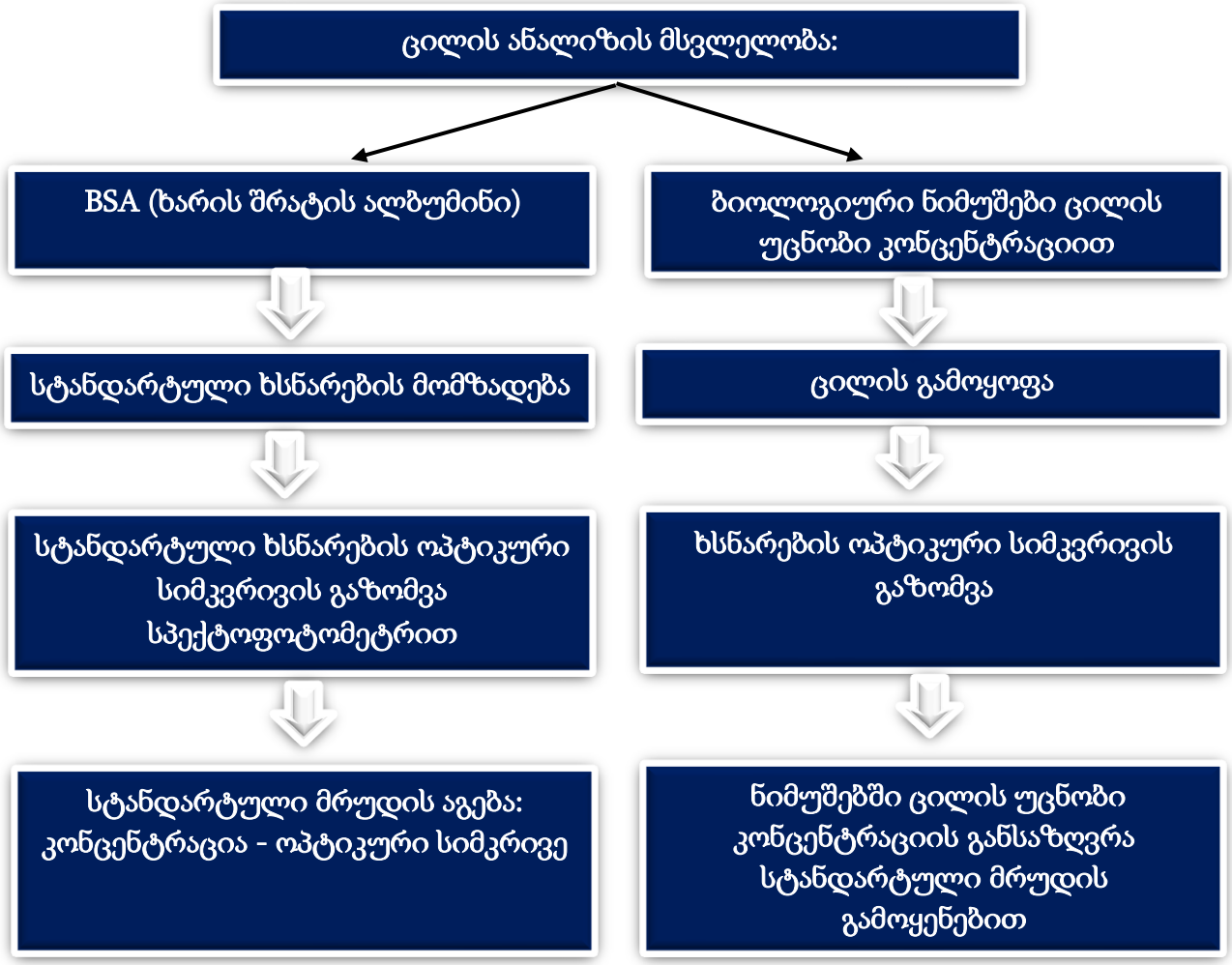
BSA (ხარის შრატის ალბუმინის) ძირითადი ხსნარის მომზადება

- ავწონოთ **50 მგ** (0.05 გ) ხარის შრატის ალბუმინი ანალიზური სასწორისა და ასაწონი ჭურჭელის საშუალებით;
- გადავიტანოთ **500 მლ** მოცულობის მზომ კოლბაში, რომელშიც **50 მლ** გამოხდილი წყალია. მოვურიოთ ხსნარს მაგნიტური სარეველას გამოყენებით ნივთიერებების გახსნამდე;
- შევავსოთ მზომი კოლბა გამოხდილი წყლით **500 მილილიტრამდე;**
- ძირითადი ხსნარის საბოლოო კონცენტრაცია უნდა იყოს **100 მგ BSA /ლ** (სურ. 6, ცხრ. 5).

სურათი 6. ცდის განხორციელებისათვის საჭირო რეაგეტები და ქიმიური ჭურჭელი;

ცხრ. 5. BSA ძირითადი ხსნარის მომზადებისთვის საჭირო რეაგენტები

რეაგენტები	**რაოდენობა**
BSA (ხარის შრატის ალბუმინი)	**50 მგ**
გამოხდილი წყალი (H_2O)	**500 მლ**


ცილის ანალიზის მსვლელობა:
BSA (ხარის შრატის ალბუმინი)
ბიოლოგიური ნიმუშები ცილის უცნობი კონცენტრაციით
სტანდარტული ხსნარების მომზადება
ცილის გამოყოფა
სტანდარტული ხსნარების ოპტიკური სიმკვრივის გაზომვა სპექტოფოტომეტრით
ხსნარების ოპტიკური სიმკვრივის გაზომვა
სტანდარტული მრუდის აგება: კონცენტრაცია - ოპტიკური სიმკრივე
ნიმუშებში ცილის უცნობი კონცენტრაციის განსაზღვრა სტანდარტული მრუდის გამოყენებით

4. საკალიბრო მრუდი

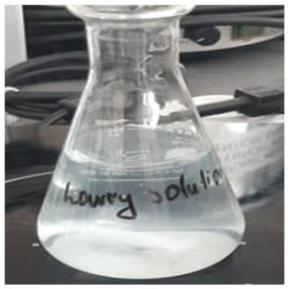
4.1. საჭირო ქიმიური ჭურჭელი, დანადგარი და რეაგენტები

მინის სინჯარები და სადგამი

კიუვეტი

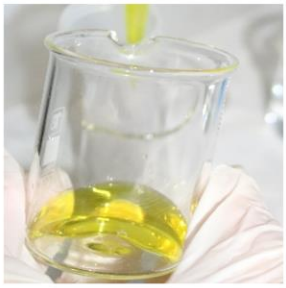
სპექტოფოტომეტრი

პიპეტი



ლოურის ხსნარი

BSA ხსნარი



ფოლინის ხსნარი

გამოხდილი წყალი

4.2. BSA - სტანდარტული ხსნარების მომზადების პროცედურა

ნივთიერების კონცენტრაციის განსაზღვრისთვის აუცილებელია ამ ნივთიერებისთვის საკალიბრო მრუდის აგება. ამისთვის ამზადებენ ცილის ცნობილი კონცენტრაციის მთელ რიგ სტანდარტულ ხსნარებს, რომელთა ფარგლებში იმყოფება საანალიზო ნივთიერების მოსალოდნელი კონცენტრაცია (0-100 მგ/ლ).

სტანდარტული ხსნარების მომზადების მსვლელობა (ცხრ. 6, სურ. 7):

- 11 მინის სინჯარა დავნომროთ საბოლოო კონცენტრაციის მიხედვით (მაგ, 0 მგ/ლ, 10 მგ/ლ და ა. შ) და მოვათავსოთ სადგამში (სურ. 7-ა);
- დავამზადოთ ხსნარები ცხრილი 6 მიხედვით (სურ. 7-ბ) და დავავორტექსოთ (სურ. 7-გ);
- პიპეტის საშუალებით 0.5 მლ (500µl) მოცულობის ჰომოგენატები გადავიტანოთ მინის სინჯარებში სამჯერადი გამეორებით (სურ. 7-დ);

> პიპეტის გამოყენების შემდეგ, გავწმინდოთ იგი გამოხდილი წყლით.

- დავუმატოთ თითოეულ სინჯარას 0.7 მლ (700µl) ლოურის ხსნარი პიპეტის საშუალბით, რომელიც მომზადებულია ლოურის ძირითადი ხსნარებისგან შემდეგი თანაფარდობით: ხსნარი A (100 მლ) + ხსნარი B (1 მლ) + ხსნარი C (1 მლ) და დავავორტექსოთ 10 წამის განმავლობაში (სურ. 4, სურ. 7-ე);

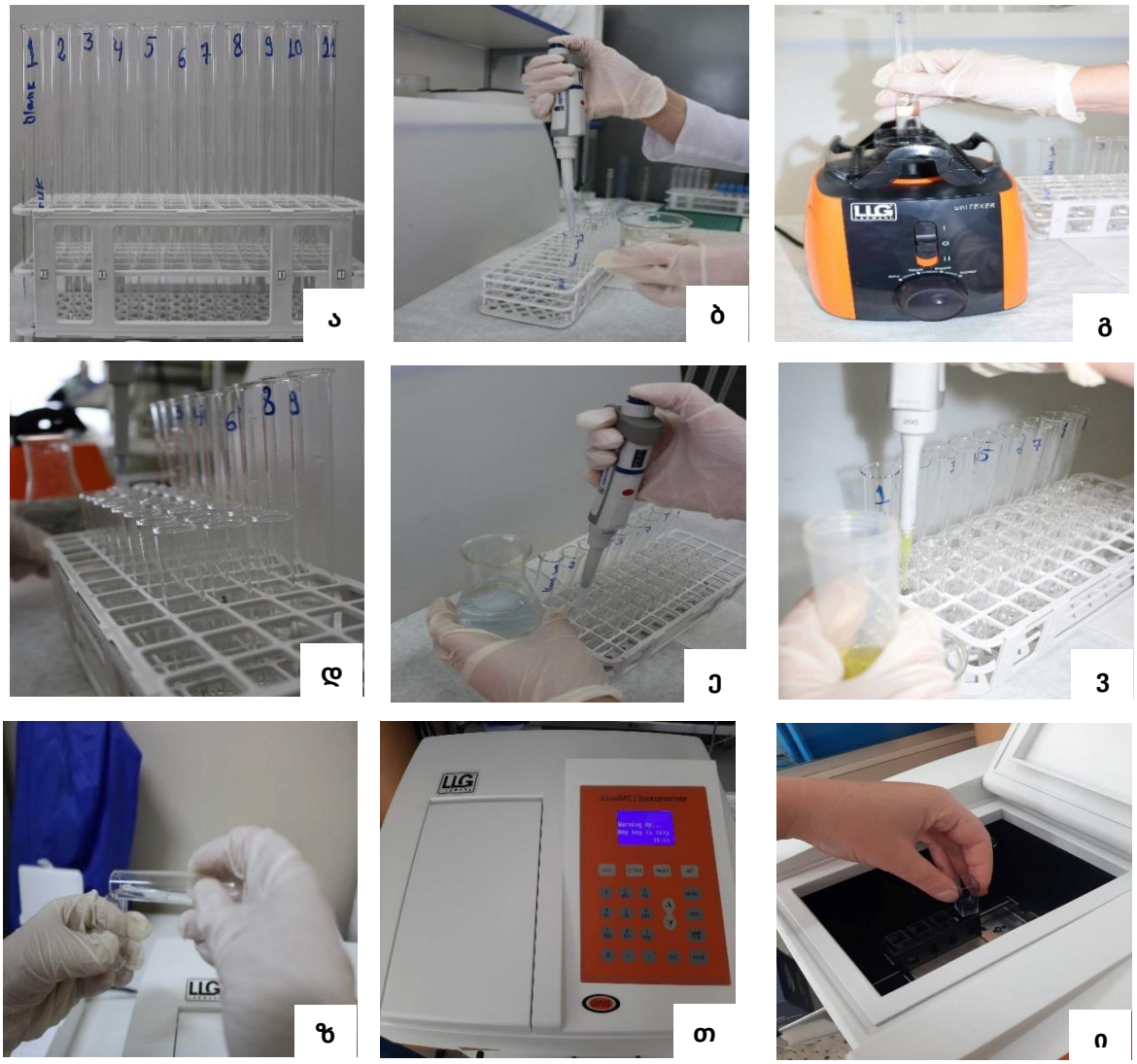
- მოვათავსოთ ჰომოგენატები 20 წუთის განმავლობაში ბნელ ადგილას ინკუბაციისთვის;
- მოვამზადოთ ფოლინის ხსნარი ნიმუშების პირველ ინკუბაციამდე 5 წუთით ადრე და მოვათავსოთ ბნელ ადგილას;
- დავუმატოთ ყოველ სინჯარას **0.1 მლ (100µl)** ფოლინის ხსნარი პიპეტის საშუალბით და დავავორტექსოთ 10 წამის განმავლობაში (სურ. 7-ვ);
- ფოლინის ხსნარის დამატების შემდეგ, მოვათავსოთ ჰომოგენატები 30 წუთის განმავლობაში ბნელ ადგილას ინკუბაციისთვის;
- 30 წუთის შემდეგ, დავავორტექსოთ სინჯარები და გადავიტანოთ ნიმუშები კიუვეტებში (სურ. 7-ზ);
- სპექტოფოტომეტრის დარეგულირებისათვის, ჩავრთოთ აპარატი ხსნარების ოპტიკური სიმკრივის გაზომვამდე 15 წუთით ადრე, შემდეგ კი სპექტროფოტომეტრის ტალღის სიგრძე მოვმართოთ 750 ნმ-ზე (სურ. 7-თ);
- გამოვიყენოთ საკონტროლო ხსნარი სპექტოფოტომეტრის დაკალიბრებისათვის. საკონტროლო ხსნარის აბსორბციის გაზომვის დროს დავაჭიროთ ღილაკს "ნულოვანი" და დაველოდოთ აბსორბციის (ოპტიკური სიმკრივე) წაკითხვას "0.00";
- ამის შემდეგ, გავზომოთ ხსნარების ოპტიკური სიმკრივეები (სურ. 7-ი);
- ცდის მსვლელობისას ჩაწეროთ ყველა მონაცემი დანართი 1-ში;
- **გვახსოვდეს: ყველა ნიმუშის ანალიზი უნდა განხორციელდეს სამჯერადი გამეორებით გარდა საკონტროლო ხსნარისა.**

საკონტროლო ხსნარი

სპექტოფოტომეტრის დაკალიბრება ხდება 100% გამტარობასა ან 0 აბსორბციაზე (სურ.8-ა).

ცხრილი 6. სტანდარტული ხსნარები (100 მგ BSA/ლ) საკალიბრო მრუდისათვის

სინჯარა	გამოხდილი წყალი მოცულობა (მლ)	BSA ძირითადი ხსნარი მოცულობა (მლ)	საბოლოო კონცენტრაცია (მგ/ლ)
1 საკონტროლო ხსნარი	10	0	0
2	9	1	10
3	8	2	20
4	7	3	30
5	6	4	40
6	5	5	50
7	4	6	60
8	3	7	70
9	2	8	80
10	1	9	90
11	0	10	100



სურათი 7 (ა-ი). BSA სტანდარტული ხსნარების მომზადების პროცედურა

4.3. სტანდარტული (საკალიბრო) მრუდის აგება

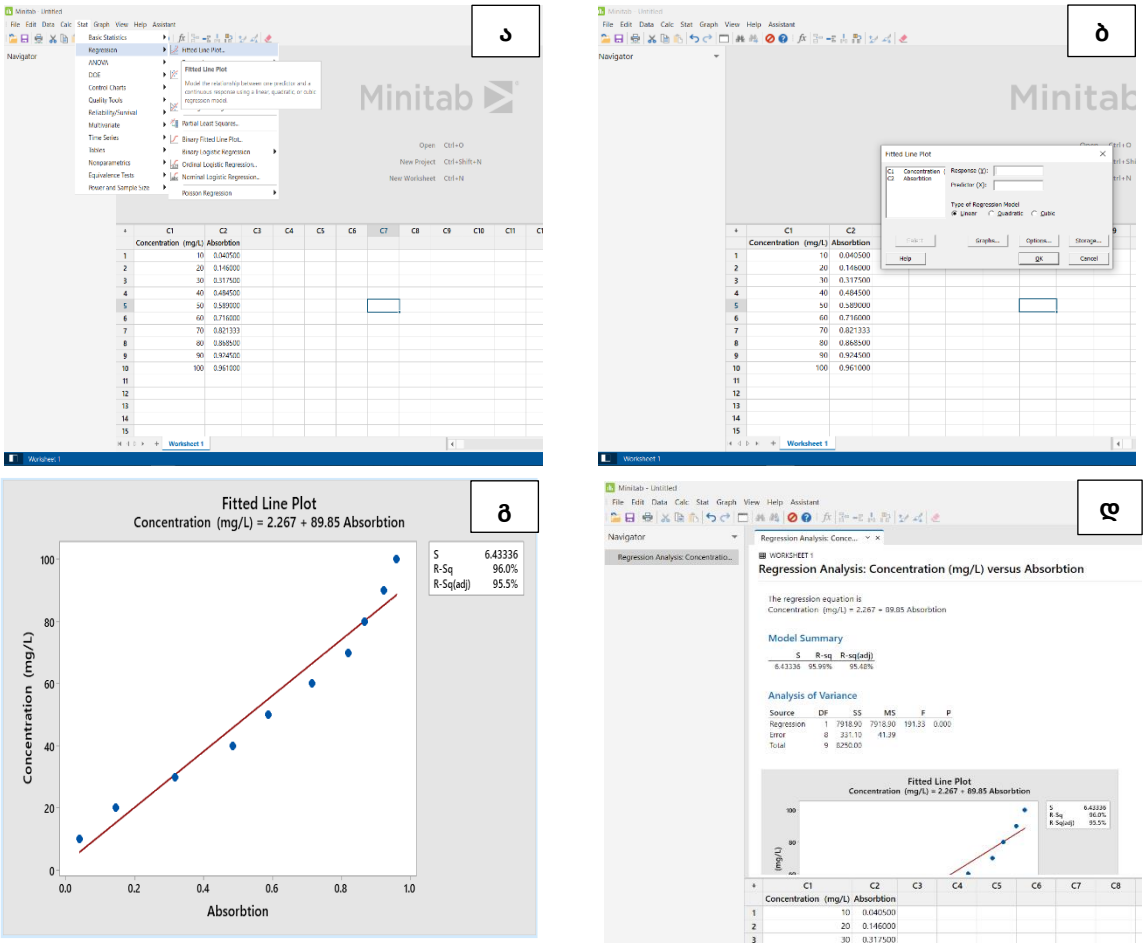
ყოველი ექსპერიმენტის დაწყების წინ აუცილებელია ახალი საკალიბრო (სტანდარტული) მრუდის აგება, რადგან სხვადასხვა ანალიზის დროს სტანდარტულ მრუდს აქვს ოპტიკური სიმკრივეების განსხვავებული მნიშვნელობები ხსნარების საინკუბაციო დროის, ტემპერატურისა და დოზირების გამო.

- BSA სტანდარტული ხსნარების ოპტიკური სიმკვრივის გაზომვის შემდეგ, გამოვითვალოთ თითოეული ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივის (აბსორბციის) საშუალო (ცხრ. 7);
- რიცხვითი მონაცემები შევიტანოთ სტატისტიკური პროგრამული უზრუნველყოფის **MINITAB**-ის C1 და C2 სვეტებში (სურ.8-ა):

ცხრილი 7. სტანდარტული ხსნარების ოპტიკური სიმკვრივის შედეგები

სინჯარის N	გამოცხილი წყალი (მლ)	BSA ძირითადი ხსნარი (მლ)	საბოლოო კონცენტრაცია (მგ/ლ)	რეპლიკაცია	აბსორბცია	საშუალო
საკონტროლო ხსნარი	**10 მლ**	**0 მლ**	**0 მგ/ლ**	-	**0**	**0**
2	**9 მლ**	**1 მლ**	**10 მგ/ლ**	**1**	-	0.0405
				2	0.037	
				3	0.044	
3	**8 მლ**	**2 მლ**	**20 მგ/ლ**	**1**	0.139	0.146
				2	0.153	
				3	-	
4	**7 მლ**	**3 მლ**	**30 მგ/ლ**	**1**	-	0.3175
				2	0.301	
				3	0.334	
5	**6 მლ**	**4 მლ**	**40 მგ/ლ**	**1**	0.442	0.4845
				2	0.527	
				3	-	
6	**5 მლ**	**5 მლ**	**50 მგ/ლ**	**1**	0.47	0.454
				2	0.438	
				3	0.581	
7	**4 მლ**	**6 მლ**	**60 მგ/ლ**	**1**	0.581	0.589
				2	0.597	
				3	-	
8	**3 მლ**	**7 მლ**	**70 მგ/ლ**	**1**	0.739	0.716
				2	0.693	
				3	-	
9	**2 მლ**	**8 მლ**	**80 მგ/ლ**	**1**	0.787	0.821333
				2	0.794	
				3	0.883	
10	**1 მლ**	**9 მლ**	**90 მგ/ლ**	**1**	-	0.8685
				2	0.880	
				3	0.857	
11	**0 მლ**	**10 მლ**	**100 მგ/ლ**	**1**	0.939	0.961
				2	0.910	
				3	-	

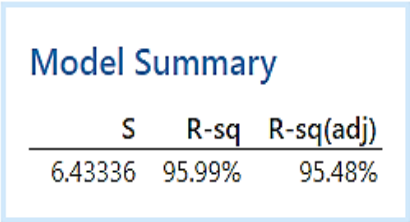
- იმისათვის რომ ავაგოთ რეგრესიის წრფე, ავირჩიოთ მენიუს ზოლში: Stat > Regression > Fitted Line Plot (სურ. 8-ა);
- ამის შემდეგ, ველში: "Response (Y)" ავირჩიოთ **C1** "Concentration", ხოლო ველში: „Predictor (X)" ავირჩიოთ **C1** "Absorbtion" და დავაჭიროთ ღილაკს OK (სურ. 8-ბ).
- შედეგად, აბცისაზე ვზომავთ კონცენტრაციათა შესაბამის ოპტიკურ სიმკვრივეებს, ხოლო ორდინატაზე ხსნართა ცნობილი კონცენტრაციების სათანადო სიდიდეებს (სურ. 8-გ);



სურათი 8 (ა-დ). სტანდარტული მრუდის აგება

- სტანდარტული მრუდის აგების შედეგად მიღებულ რეგრესიის განტოლებას (სურ.8-დ) ვიყენებთ ნიმუშში ცილის უცნობი კონცენტრაციის დასადგენად:

რეგრესიის განტოლება:
Concentration (mg/L)=2.267+89.85 Absorbtion



Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)
6.43336	95.99%	95.48%

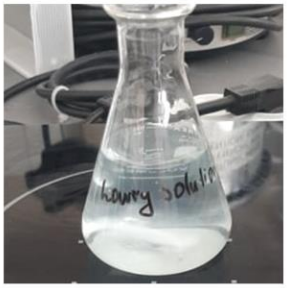
იმისათვის რომ გავიგოთ თუ რამდენად კარგია რეგრესიის წრფე, მოდელის რეზიუმეში ყურადღება უნდა მივაქციოთ 2 მნიშვნელობას:

- **S** – მნიშვნელობა გვიჩვენებს, თუ რამდენად კარგად აღწერს მოდელი პასუხს. რაც უფრო დაბალია S- ის მნიშვნელობა, მით უკეთესია მოდელი.
- **R-sq**-(R^2) -მნიშვნელობა მიუთითებს თუ რამდენად შეესაბამება მოდელი მონაცემებს. რაც უფრო მაღალია R^2 მნიშვნელობა, მით უკეთესად შეესაბამება მოდელი მონაცემებს. R^2 ყოველთვის არის 0% -დან 100% -მდე.

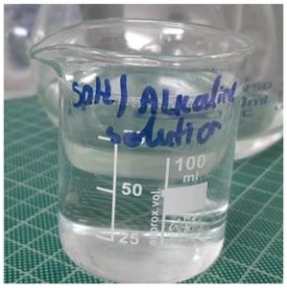
5. ნიმუშებში ცილის უცნობი კონცენტრაციის განსაზღვრა

5.1. საჭირო ქიმიური ჭურჭელი, დანადგარები და რეაქტივები

ფოლინის ხსნარი



ლოურის ხსნარი



ნატრიუმ ქლორიდი/ ჰიდროქსიდის ხსნარი

მინის სინჯარები/ სადგამი

სპექტოფოტომეტრი

სასწორი

ცენტრიფუგის სინჯარა (50 მლ)

წყლის აბაზანა

ვორტექსი

პიპეტი

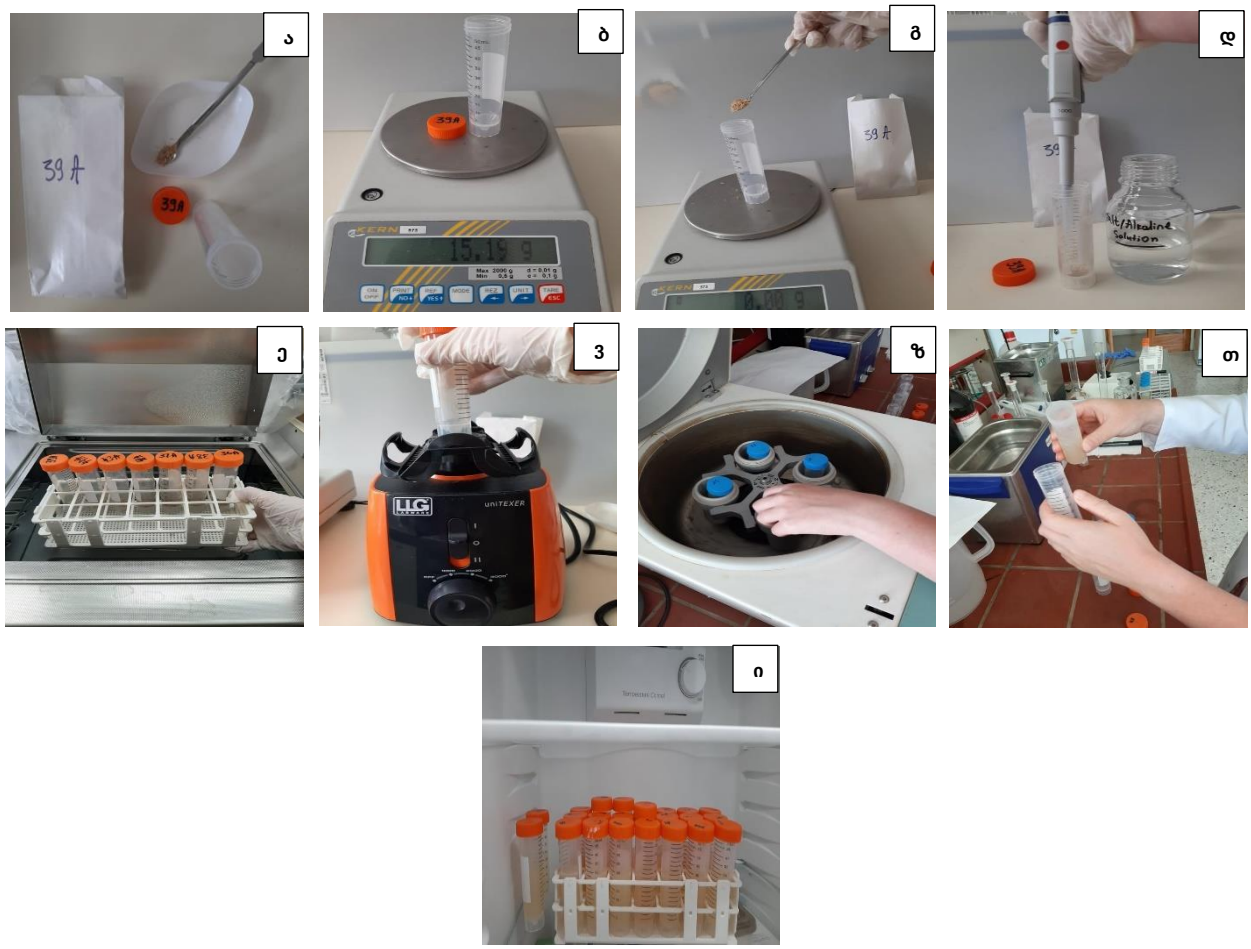
ცენტრიფუგა

კიუვეტი

პროცედურა I: ცილის გამოყოფა

- დავნომროთ ცენტრიფუგის სინჯარები ნიმუშების სარეგისტრაციო ნომრების მიხედვით (სურ. 9-ა) და ავწონოთ სასწორზე (სურ.9-ბ);
- შემდეგ, მოვმართოთ სასწორი ნულზე და ავწონოთ ნიმუშები ცენტრიფუგის სინჯარებში **0,5 გრამამდე** (სურ.9-გ);
- თითოეულ ცენტრიფუგის სინჯარას დავუმატოთ **30 მლ** ნატრიუმის ჰიდროქსიდის/ქლორიდის ხსნარი და დავავორტექსოთ (სურ.9-დ);

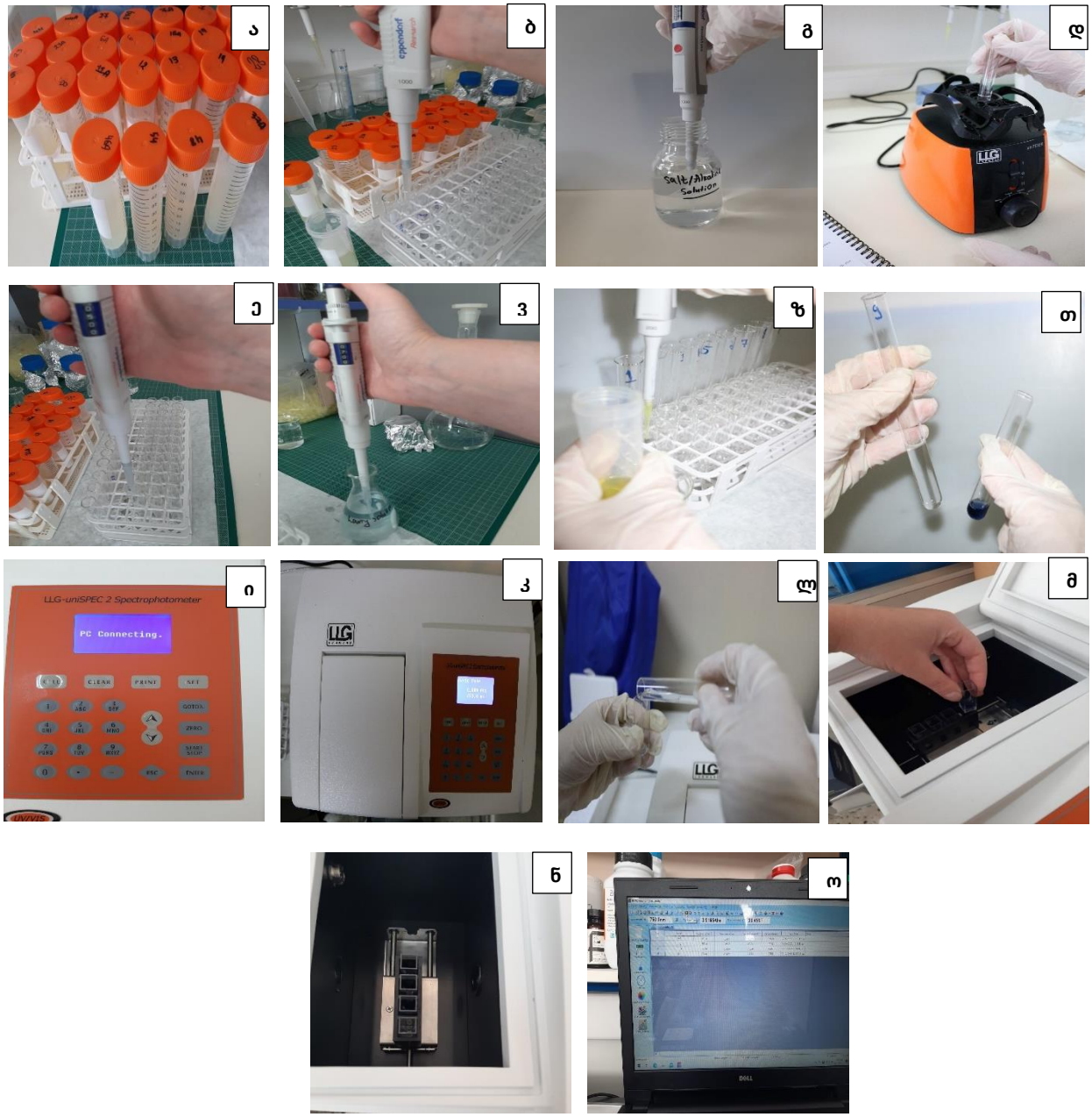
- მოვათავსოთ ისინი წყლის აბაზანაში 60^{0}C-ზე 90 წუთის განმავლობაში ინკუბაციისთვის (სურ.9-ე);
- ყოველ 30 წუთში (ჯამში სამჯერ) დავავორტექსოთ ცენტრიფუგის სინჯარები ინკუბაციის პერიოდში (სურ. 9-ვ);
- 90 წუთის შემდეგ, დავაცენტრიფუგიროთ სინჯარები 4000 ბრ. 4^{0}C-ზე 30 წუთის განმავლობაში (სურ. 9-ზ);
- გადავიტანოთ სუპერნატანტი ცენტრიფუგის სუფთა სინჯარებში (სურ. 9-თ) და შევინახოთ მაცივარში -20 °C -ზე შემდგომი ანალიზისთვის (სურ. 9-ი);
- ჩავწეროთ ანალიზის შედეგები დანართ 2-ში.



სურათი 9 (ა-ი). ცილის გამოყოფის პროცედურა

<u>პროცედურა II: ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა</u>

- <u>მოვამზადოთ საკონტროლო ხსნარი:</u>
  - <u>10 მლ</u> მოცულობის მინის სინჯარაში მოვათავსოთ **0.5 მლ** ნატრიუმის ჰიდროქსიდის/ქლორიდის ხსნარი და <u>0.7 მლ</u> ლოურის ხსნარი, დავავორტექსოთ და შემდეგ მოვათავსოთ სინჯარა ბნელ ადგილას 20 წუთის განმავლობაში;
  - 20 წუთის შემდეგ, დავუმატოთ <u>0.1 მლ</u> ფოლინის ხსნარი და კვლავ მოვათავსოთ ბნელ ადგილას 30 წუთის განმავლობაში.



სურათი 10 (ე-ო). ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრის პროცესი

- <u>მოვამზადოთ ნიმუშები ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის:</u>
  - ცდის დაწყებამდე გამოვიღოთ ცენტრიფუგის სინჯარები მაცივრიდან და მოვათავსოთ ოთახის ტემპერატურაზე რამდენიმე წუთის განმავლობაში (10-ა);
  - გადავიტანოთ <u>1 მლ (1000µl)</u> მოცულობის ნიმუშები პიპეტის საშუელბით მინის სინჯარებში (სურ.10-ბ);
  - დავუმატოთ **1 მლ** ნატრიუმის ჰიდროქსიდის/ქლორიდის ხსნარი პიპეტის საშუელბით (სურ.10-გ) და დავავორტექსოთ (სურ.10-დ);

- დავორტექსების შემდეგ, მინის სინჯარებიდან ავიღოთ **0.5 მლ (500µl)** მოცულობის სუპერნატანტი და გადავიტანოთ ახალ მინის სინჯარებში (სამჯერადი განმეორებით) პიპეტის საშუელბით (სურ.10-ე);
- დავუმატოთ **0.7მლ (700µl)** ლოურის ხსნარი პიპეტის საშუელბით, დავავორტექსოთ (სურ. 10-ვ) და შემდეგ მოვათავსოთ ისინი ბნელ ადგილას 20 წუთის განმავლობაში;
- 20 წუთის შემდეგ, დავუმატოთ **0.1 მლ** ფოლინის ხსნარი პიპეტის საშუელბით და კვლავ მოვათავსოთ ბნელ ადგილას 30 წუთის განმავლობაში (სურ. 10-ზ).
- ინკუბაციის შემდეგ, დავავორტექსოთ სინჯარები. შევნიშნავთ, რომ ხსნარი ფერს შეიცვლის ლურჯ შეფერილობამდე, რაც მიგვანიშნებს ხსნარში არომატული ამინომჟავეების არსებობაზე (სურ. 10-თ);
- სპექტოფოტომეტრის დარეგულირებისათვის, ჩავრთოთ აპარატი ხსნარების ოპტიკური სიმკრივის გაზომვამდე 15 წუთით ადრე (სურ. 10-ი), შემდეგ კი სპექტროფოტომეტრის ტალღის სიგრძე მოვმართოთ 750 ნმ-ზე (სურ. 10-კ);
- გამოვიყენოთ საკონტროლო ხსნარი სპექტოფოტომეტრის დაკალიბრებისათვის. გადავიტანოთ ხსნარი კიუვეტში (სურ. 10-ლ) და მოვათავსოთ სპექტოფოტომეტრში (სურ. 10-მ). საკონტროლო ხსნარის აბსორბციის გაზომვის დროს დავაჭიროთ ღილაკს "ნულოვანი" და დაველოდოთ აბსორბციის (ოპტიკური სიმკრივე) წაკითხვას "0.00";
- ამის შემდეგ, გადავიტანოთ დანარჩენი ხსნარები კიუვეტებში (სურ. 10-ნ) და თანმიმდევრულად გავზომოთ მათი ოპტიკური სიმკრივეები (სურ. 10-ო);
- ცდის მსვლელობისას ჩაწეროთ ყველა მონაცემი დანართი 3-ში.

6. მონაცემთა დამუშავება: ცილის უცნობი კონცენტრაციის გამოთვლა ნიმუშებში

საკვლევ ხსნარში ცილის უცნობი კონცენტრაციის გამოთვლისათვის გვჭირდება ორი მაჩვენებელი: 1. საკვლევი ნიმუშის ხსნარის ოპტიკური სიმკრივის (აბსორბციის) მაჩვენებელი და 2. მრუდის აგების შედეგად მიღებული რეგრესიის განტოლება.

მაგალითად (ცხრ. 8),

1. დავუშვათ საკვლევი ნიმუშის ხსნარის ოპტიკური სიმკრივის (აბსორბცია) მაჩვენებელია: 0.749 Abs.
2. მრუდის აგების შედეგად კი მირებული რეგრესიის განტოლებაა:

Concentration (mg/L)=2.267+89.85 Absorbtion

ნიმუშის N	ნიმუშის ოპტიკური სიმკრივე (Abs)	რეგრესიის განტოლება		კონცენტრაცია (მგ/ლ)
		a	b	©
39A	0.749	2.267	89.85	?

ცხრ. 8. საკვლევ ხსნარში ცილის კონცენტრაციის გამოთვლა

თუ ჩვენთვის ცნობილია საკვლევი ნიმუშის ხსნარის ოპტიკური სიმკრივის მაჩვენებელი და სტანდარტული მრუდის შედეგად მიღებული განტოლება,

მაშინ,

საკვლევ ხსნარში ცილის უცნობი კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის უნდა გამოვიყენოთ რეგრესიის შემდეგი ფორმულა:

$$C = (Abs \times b) + a$$

სადაც,

"C" არის საკვლევი ხსნარის ცილის უცნობი კონცენტრაცია, "Abs" არის საკვლევი ხსნარის ოპტიკური სიმკრივის მაჩვენებელი, "a"კონცენტრაცია და "b" - ოპტიკური სიმკრივე (აბსორბცია) სტანდარტული მრუდის აგების შედეგად მიღებული რეგრესიის განტოლებიდან.

შედეგად,

ცილის უცნობი კონცენტრაცია (C)= (0.749 X 89.85) + 2.267 = 69.56 მგ/ლ

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Goldring JPD. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. Methods Mol Biol. 2019;1855:31-39. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_3. PMID: 30426404.
2. Hanne K. Mæhre, Lars Dalheim, Guro K. Edvinsen, Edel O. Elvevoll, Ida-Johanne Jensen Foods. Protein Determination—Method Matters. 2018 Jan; 7(1): 5. Published online 2018 Jan 1. doi: 10.3390/foods7010005 PMCID: PMC5789268
3. Legler G et al. (1985) On the chemical basis of the Lowry protein determination. Anal Biochem 150:278–287
4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, RJ R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
5. Merrill, A.L., Watt, B.K., 1973. Energy Value of Foods, Basis and Derivation (Revision). Agric. Handbook No. 74. USDepartment of Agriculture, Washington, DC.
6. Noble JE. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes. Methods Enzymol. 2014;536:17-26. doi: 10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7. PMID: 24423263.
7. Olson, B.J. and Markwell, J. (2007), Assays for Determination of Protein Concentration. Current Protocols in Protein Science, 48: 3.4.1-3.4.29. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48
8. Simonian, M.H. (2002), Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. Current Protocols in Cell Biology, 15: A.3B.1-A.3B.7. https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03bs15
9. Thermo Fisher Scientific Inc (2017) Protein assay technical handbook
10. Waterborg JH, Matthews HR. The lowry method for protein quantitation. Methods Mol Biol. 1984;1:1-3. doi: 10.1385/0-89603-062-8:1. PMID: 20512668

დანართი 1. BSA სტანდარტული ხსნარების მომზადება საკალიბრო მრუდისათვის

თარიღი	სინჯარა	გამოხდილი წყალი (მლ)	BSA ძირითადი ხსნარი (მლ)	საბოლოო კონცენტრაცია (მგ/ლ)	რეპლიკაცია	საათი				აბსორბცია	საშუალო	შენიშვნა
						ლოურის ხსნარი/ინკუბაცია (0.7 მლ/20 წთ)		ფოლინის ხსნარი/ინკუბაცია (0.1 მლ/30 წთ)				
						დასაწყისი	დასასრული	დასაწყისი	დასასრული			
	საკონტროლო ხსნარი	**10 მლ**	**0 მლ**	**0 მგ/ლ**								
	2	**9 მლ**	**1 მლ**	**10 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	3	**8 მლ**	**2 მლ**	**20 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	4	**7 მლ**	**3 მლ**	**30 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	5	**6 მლ**	**4 მლ**	**40 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	6	**5 მლ**	**5 მლ**	**50 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	7	**4 მლ**	**6 მლ**	**60 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	8	**3 მლ**	**7 მლ**	**70 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	9	**2 მლ**	**8 მლ**	**80 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	10	**1 მლ**	**9 მლ**	**90 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							
	11	**0 მლ**	**10 მლ**	**100 მგ/ლ**	**1**							
					2							
					3							

დანართი 2. ცილის ანალიზი

ბიოლოგიური ნიმუში	თარიღი	სინჯარა (გ)	ნიმუში (გ)	ინკუბაცია						ცენტრიფუგირება (სთ)
				ნატრიუმ ჰიდროქსიდი/ ქლორიდის ხსნარი (მლ)	დაწყება (სთ)	ვორტექსი (სთ)	ვორტექსი (სთ)	ვორტექსი (სთ)	დასასრული (სთ)	

დანართი 3. ცილის ანალიზი

თარიღი	ნიმუში N	განზავება			რეპლიკაცია	საათი				აბსორბცია	შენიშვნა
		ნიმუში (მლ)	ნატრიუმის ჰიდროქსიდი /ქლორიდი	პროპორცია		ლოურის რეაგენტი (ინკუბაცია)		ფოლინის რეაგენტი (ინკუბაცია)			
						დასაწყისი	დასასრული	დასაწყისი	დასასრული		
	საკონტროლო ხსნარი										
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						
					1						
					2						
					3						

ბროშურის ინგლისური ვერსიის სანახავად იხილეთ QR CODE