

Зертханалық сабақтардың әдістемелік нұсқаулығы

ID 97224 «ГМО мен органикалық өнімдердің қауіпсіздігі»
«6B05103 -Биотехнология» білім беру бағдарламасы

Зертханалық сабақ №1. Ерітінділерді (проценттік, молярлы, нормалды) дайындау әдістері

Мақсаты: проценттік, молярлы және нормалды ерітінділерді дайындау әдістерін игеру.

Эквивалентті масса (эквивалентті заттың молярлы массасы) $m_{\text{эқв}}$ заттың маңызды сипаттамасы болып табылады.

Химиялық элементтер бір-бірімен әрекеттесіп қосылыс түзгенде, ондағы элементтердің мөлшерлері әр уақытта тұрақты болатынын құрам тұрақтылық заңы көрсетеді. Сондықтан химияға эквивалент түсінігі енгізілді.

Эквивалент – екі элементтің немесе екі заттың бір – бірімен қалдықсыз әрекеттесетін тең мөлшерін көрсетеді. Элементтің эквиваленті дегеніміз сутегі атомдарының 1 молімен әрекеттесетін немесе сондай молді қосылыстан ығыстырып шығаратын мөлшерін айтады. Мысалы, иодсутекте HI сутегінің 1 молімен қосылып тұрғандықтан иодтың эквиваленті 1 мольге, күкіртсутекте H₂S сутегінің екі молімен қосылысатындықтан күкірттің эквиваленті 1:2 мольге, аммиакта NH₃, азоттың эквиваленті 1:3 мольге, силанда SiH₄, кремнийдің эквиваленті 1:4 мольге тең. Эквиваленттің 1 эквивалентінің массасын оның эквиваленттік массасы дейді, ал ол г/мольмен көрсетіледі. Жоғарыда келтірілген қосылыстарда иодтың, күкірттің, азоттың, кремнийдің сәйкес эквиваленттік массалары мынадай: 127 г/моль, 32:2 = 16 г/моль, 14:3=4,76г/моль, 28:4=6,5г/моль.

$m_{\text{эқв}}(\text{оксид}) = M_{\text{оксид}}/(\text{оттегі атомдарының саны } x \cdot 2)$ немесе $M_{\text{оксид}}/$ элементтің атом саны x оксид түзетін элементтің валенттілігі;

$m_{\text{эқв}}(\text{негіз}) = M_{\text{негіз}}/\text{негіз қышқылдығы};$

$m_{\text{эқв}}(\text{қышқыл}) = M_{\text{қышқыл}}/\text{қышқыл негізділігі};$

$m_{\text{эқв}}(\text{тұз}) = M_{\text{тұз}}/(\text{металдың атом саны } x \text{ металл валенттілігі}).$

Көп жағдайда негіздің қышқылдығы негіздік формуладағы гидроксил топтарының санына, ал қышқылдың негізділігі қышқыл формуласындағы сутегі атомдарының санына тең болады.

Мысалы: $m_{\text{эқв}}(\text{Fe}_2\text{O}_3) = M(\text{Fe}_2\text{O}_3)/(3 \cdot 2) = 160/6 = 26,7 \text{ г/моль};$

$m_{\text{эқв}}(\text{H}_2\text{SO}_4) = M(\text{H}_2\text{SO}_4)/2 = 98/2 = 49 \text{ г/моль};$

$m_{\text{эқв}}(\text{Ca}(\text{OH})_2) = M(\text{Ca}(\text{OH})_2)/2 = 74/2 = 37 \text{ г/моль};$

$m_{\text{эқв}}(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3) = M(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3)/2 \cdot 3 = 342/6 = 57 \text{ г/моль};$

Заттардың эквивалентті массалары заттар арасындағы химиялық әрекеттесу кезіндегі сандық есептеулер үшін қолданылады.

Нормалды ерітінділер.

1н ерітінді – 1г-экв. 1 л еріткіште.

Мысал. 1н NaOH Молек. салмағы = 23 +16+1= 40. 1 г-экв. = 40 г.
40 г NaOH 1 л дис.суға ерітеді.

Молярлы ерітінділер

1М ерітінді – 1 моль 1 л еріткіште.

Мысал. 1М NaOH Молек. салмақ = 23 +16+1= 40. 1 моль = 40 г.
40 г NaOH 1 л дис.суға ерітеді.

Проценттік ерітінділер

100 г еріткіште гр мөлшері.

Мысал. 10 % NaOH ерітінді
10 NaOH 100 мл дис.суға ерітеді.

Зат массасын (г) көлемге (мл) алмастыру

$$M = \rho \times V; \quad V = \frac{m}{\rho}$$

0,5 н H₂SO₄ дайындау

Молекулалық салмақ H₂SO₄ 2+32+64 = 98 г Тығыздығы H₂SO₄ конц.(кесте бойынша) = 1,84.

1 г/экв. = Мол. салмақ H₂SO₄ /2 = 49 г.

1н – 49 г / 1 л

0,5 н – 24,5 г / 1 л

V = 24,5/1,84 = 13,3 мл H₂SO₄ конц. / 1 л дис.су

Тапсырма 1

А) 2н NaCl ерітіндісін дайындау

Б) 2М ZnSO₄ ерітіндісін дайындау

В) 0, 1мМ CaSO₄ ерітіндісін дайындау

Тапсырма 2

А) 0,1 н H₂SO₄ (тығыздығы 1,84) ерітіндісін дайындау

Б) 0,1 н HCl (тығыздығы 1,19) ерітіндісін дайындау

В) 2мМ H₂SO₄ (тығыздығы 1,84) ерітіндісін дайындау

Зертханалық жұмыс 2. Өсімдік материалынан ДНҚ бөліп алу әдісінің принциптері. Фенолды депротейнизациялау арқылы ДНҚ-ң тұзды экстракциясын алу әдісі.

Мақсаты: өсімдік материалынан ДНҚ бөліп алу әдістерін және принциптерін игеру.

Өсімдік материалынан ДНҚ бөліп алу

Өсімдік материалынан ДНҚ бөліп алу үшін өсімдіктің жаңа кесіп алынған үлгілерінен немесе мұздатып қатырылған сонымен қатар, селикогельде кептірілген немесе гербарлық материалдан бөліп алуға болады. Әйтсе де, кез келген гербарийден ДНҚ бөліп алу мүмкіндігі болмайды. Ал гербарий материалын қолданған жағдайда, жасы 30-40 жылдан аспаған және ол дұрыс жағдайда, яғни сақтау талаптары толық орындалған болса ғана қолдануға болады.

Әдетте өсімдіктерден ДНҚ ны бөліп алу үшін жапырақтар қолданылады. Алайда өсімдіктердің түрлі мүшелері құрамы жағынан химиялық қасиетімен ерекшелінетінеді, сонымен қатар, екінші реттік метаболиттердің болуымен сипатталады. Осыған байланысты, бөліп алынатын ДНҚ ның сапасы анағұрлым жоғары болу үшін, ең тиімді өсімдік материалын таңдау қажет.

Сонымен қатар, өсімдік материалын таңдағанда, оның барлық бөлімдері саңырауқұлақтардан немесе басқа да инфекциялық немесе инфекциялық емес аурулардан таза болуы шарт. Бұл зерттеушінің бөліп алуды көздеп отырған ДНҚ ның бөтен нуклеин қышқылдарымен залалдануын болдырмайды.

Егер өсімдік материалынан ДНҚ жақын арада, яғни 48 сағат ішінде бөліп алу мүмкіндігі болмаса, үлгіні -20 дан -80 0С мұздатып сақтау немес кептіру қажет. Мұздатылған үлгіні ерітіп, одан кейін қайтадан мұздату, яғни мұздатып еріту циклін қайталауға болмайды, себебі бұл жағдайда үлгідегі ДНҚ бұзылып кетуі мүмкін.

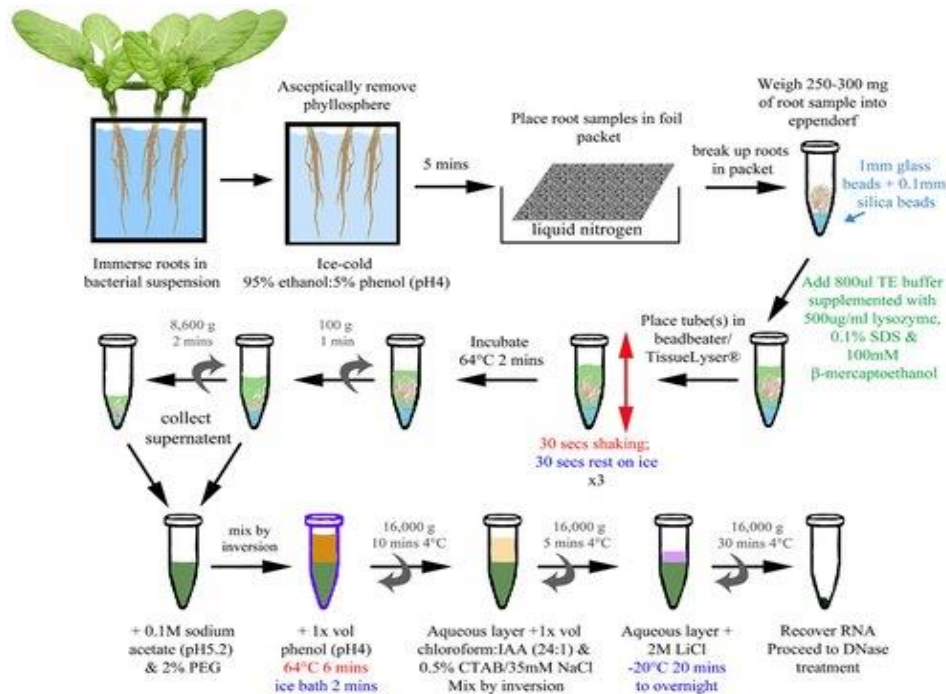
Өсімдік объектілерінен ДНҚ бөліп алу ерекшеліктері

ДНҚ бөліп алу негізін физикалық және химиялық процестерді қамтиды. Өсімдіктерден ДНҚ бөліп алу кезінде клеткалық ферменттерді дезактивтендіру, қор ретінде жиналатын қанттардан, мысалы полисахаридтерден және екінші реттік метаболиттерден (алкалоидтардан, фенолдық қосылыстардан, терпендерден) тазарту керек. Себебі олар ДНҚ бөліп алуда кедергі жасап қоймай, ДНҚ бөліп алу сапасына да теріс әсерін тигізеді. Мәселен, белгілі бір полисахаридтердің тобы ДНҚ бөліп алу кезінде ДНҚ мен байланысып, тұтқыр, желе тәрізді қосылыс түзуі мүмкін. Сонымен қатар, табиғаты түрлі биохимиялық тотықтырғыштар және фенолдық қосылыстар да теріс әсерін береді.

Метаболиттердің алуан түрлілігіне байланысты, әр түрлі токсондар өкілдерінен немесе бір түрге жататын өсімдіктерден ДНҚ бөліп алудың ортақ бір протоколы болмайды.

Негізінен ДНҚ бөліп алудың міндетті түрде орындалатын процедуралары келесі тәртіппен орындалады:

1. Клеткаларды бұзу немесе лизике ұшырату;
2. Мембраналық липидтерден тазарту;
3. Екінші реттік метаболиттерден және қор заттарынан тазарту;
4. Белоктардан тазарту;
5. РНҚ дан тазарту;
6. ДНҚ тұнбаға түсіру.



Бірінші саты – клеткаларды бұзу, лизиске ұшырату.

Өсімдіктердің клеткаларының жануарлар клеткаларынан ерекшелігі клетка қабықшалары берік, целлюлозалық қабатпен қапталған болады.

Белсенді физикалық гомогенизация әдісі клетка қабықшаларын бұзып, клетканың біртұтастығын жояды. Әрі клетка ішілік компартменттерді және олардың ішкі құрылымын құрайтын компартменттерді экстракциялық буферге шығарады. Ұлпаларды бұзу фарфор келі мен келсап көмегімен орындалады немесе гомогенизаторды қолданады.

Өсімдік материалынан алынған үлгіні түрлі қоспалардан тазарту сатысында оның құрамындағы нуклеин қышқылдары оңай бұзылатындықтан, материалды гомогенизациялау уақыты қысқа және буферді қосу мөлшері минималды болуы қажет.

Өсімдік ұлпаларында көп мөлшерде полисахаридтер, солардың ішінде клетка қабықшасында целлюлоза, крахмал; белоктармен комплексті қосылған полисахаридтер, сондай-ақ, липидтермен және нуклеин қышқылдармен комплексті қосылған белоктар, полифенолдар және басқа да қосылыстар болады. Осы көп компонентті қосылыстардан ДНҚ –ны таза күйінде бөліп алу кезінде көптеген

элементтер ДНҚ мен физикалық түрде байланысып, нуклеин қышқылдарын химиялық тұрғыда бұзуы мүмкін.

Өсімдік ұлпаларын сұйық азотқа салу арқылы біртіндеп гомогенизациялау, клеткаларды бұзуды жеңілдетеді, әрі ДНҚ -ны бұзатын барлық биохимиялық және физикалық процестерді тежейді. Егер бастапқы материал мұздатып қатырылған болса, онда гомогенизациялау алдында оны еріту процедурасын жасауға мүлдем болмайды. Клеткалардың қабықшаларын және мембраналады бұзу үшін гомогенизацияланған үлгіні экстракциялауға арналған буфермен өңдейді. Әдетте буфер құрамында EDTA , трис – HCL және СТАВ болады.

2. Мембраналық белоктар мен липидтерден тазарту сатысы;

Өсімдік ұлпаларын гомогенизациялау үшін буфер құрамына детергенттер (беттік белсенді заттар) және хиотропты агенттер қосылады. Олар клеткаларды лизиске ұшыратады және мембраналық белоктар мен липидтердің босап шығуын тудырады. Буфердегі ерітінділерде детергенттер мембрананың фосфолипидті қабатын бұзып, мембарналық белоктарды еритін күйге көшіреді. Осының салдарынан, мембранадағы липидті белокты комплекстер бұзылады, ДНҚ буферге экстракцияланады (шығарылады), яғни еріген күйге көшеді. Детергенттерді таңдау зерттеу мақсатына қарай жасалады.

ДНҚ экстракциясына қолданылатын – **цетилтриметил бромид аммоний (СТАВ)** классикалық катионды детергент болып табылады. СТАВ клеткалық мембраналарды лизиске ұшыратады, ДНҚ –белоктық комплекстерді эффективті бұзады. NaCl-дінің белгілі бір концентрациясында СТАВ нуклеин қышқылдарымен ерімейтін комплекс құрады.

Додecilсульфат натрий (SDS)- анионды детергент болып табылады. белоктың изоэлектрлік нүктесінен төмен жағдайдағы рН мәндерінде SDS белоктармен қосылып, ерімейтін тұнба түзеді.

Додecilсульфат натрий (SDS) анионды агент, және меркаптоэтанол (этиленгликоль және этандитиол туындысы, химиялық күкіртті органикалық қосылыс) – белоктар мен полисахаридтерді ерімейтін комплекс түрінде тұнбаға түсіреді. Меркаптаэтанол дисульфидті байланыстарды үзеді, соның ішінде белоктардағы байланыстарды үзіп, олардың үшінші және төртінші реттік құрылыстарын бұзады, яғни биологиялық антиоксидант ретінде әсер етіп, ДНҚ- ны тікелей немесе жанама бұзатын тотығу процестерден тежейді.

Дисульфидті байланыстардың болуы нуклеазалардың тұрақтылығын қамтамасыз ететіндіктен, меркаптоэтанол клеткалардың лизиске ұшырауы кезінде босап шыққан ферменттердің белсенділігін элиминациялайды.

Тритон X-100 - анионды детергенттер, олар сирек қолданылады.

Тритон X-100 басқаларға қарағанда анағұрлым «жұмсақ» әсер етеді, оның саладрынан белоктар интактты түрде қалуы мүмкін.

Экстракциялауға арналған буферде **дитиотреитол (ДТТ)** қосылуы мүмкін. Ол меркаптоэтанол сияқты күшті тотықтырғыш агент болып табылады. **Дитиотреитол**

(ДТТ) – дисульфидті байланыстарды үзіп, ерітіндіде ДНҚ димерлерінің «тиолирленген» түзілуін тежейді.

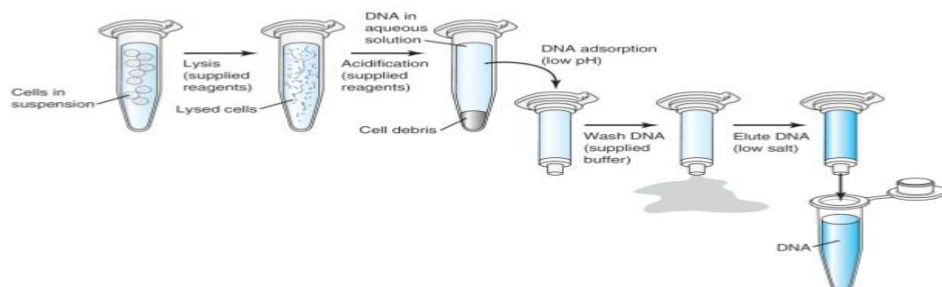
Буферді қыздыру және оның құрамындағы хаотропты агенттер, мәселен тұздар макромолекулаларды денатурациялайды, сутектік байланыстарды үзіп, гидрофобты қатынастарды және Ван -дер -Вальс күштерін бұзады. Тұздардың жоғары концентрациялары полисахаридтерді тұнбаға түсіреді, оның салдарынан ДНҚ мен қосылып желе тәрізді комплекстер құруы мүмкін.

Буфердегі (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} т.б. иондармен байланысатын, хелаттаушы агент -этилендиаминтетрасірке қышқылының (EDTA) болуы салдарынан, өсімдік экстрактындағы металға - тәуелді ферменттер дезактивтенеді. Ең маңыздысы, EDTA магнийге тәуелді фермент кофакторы ДНҚ-азамен байланысады, оның салдарынан ДНҚ белсенділігі төмендейді.

3. Екінші реттік метаболиттерден және қор заттарынан тазарту сатысы; Өсімдіктердің белгілі бір мүшелерінде екінші реттік метаболиттердің көптеп жиналуы орын алады. Біріншіден, бұл қасиет ароматтық және дәрілік өсімдіктерге тән. Осыған байланысты осы өсімдіктерден ДНҚ –ны бөліп алу барысында екінші реттік метаболиттер едәуір кедергі жасайды.

Сонымен қатар, кейіннен ПТР реакциялардың ингибиторлары болуы да мүмкін. Өсімдік ұлпаларын гомогенизациялау барысында олардың құрамындағы полифенолдар тотығу реакциясына түсіп, белоктармен және нуклеин қышқылдарымен ковалентті байланысады, осының салдарынан қоңыр түсті ДНҚ тұнбасы пайда болады. Мұндай ДНҚ үлгілері зерттеуге қолдануға жарамайды. Фенолдарың нуклеин қышқылдарымен байланысқа түсуін болдырмас үшін буфер құрамына полимерлер: поливинилпирролидон (PVP) немесе оның модификациясын - поливинил поливинилпирролидон (PVPP) қосады.

Выделение ДНК



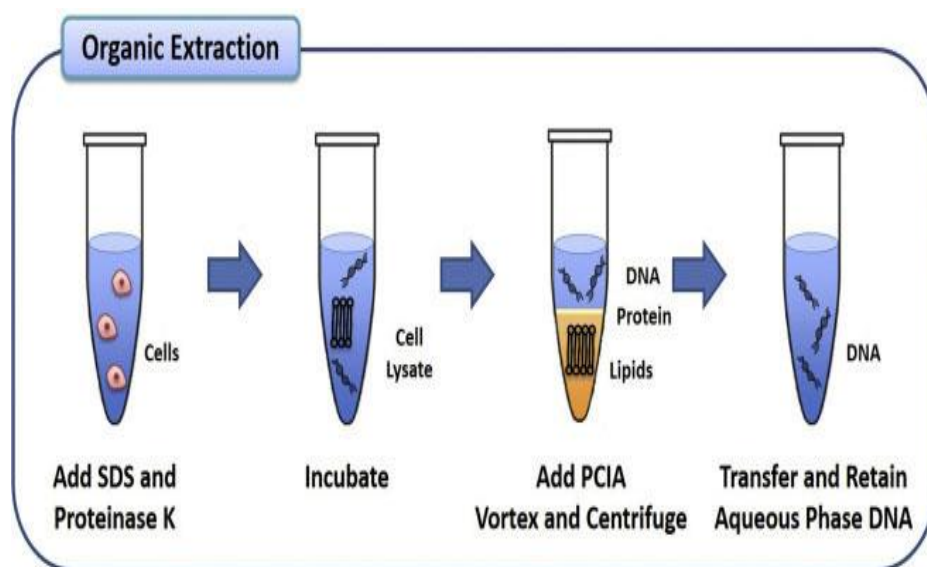
4. Белоктардан тазарту сатысы. Белоктарды протеазалармен тазартады. Сілтілі протеазалар белоктарды гидролиздеп, соның ішінде ДНҚ мен байланысқан гистондарды, клеткадағы ферменттерді (нуклеазаларды) байланыстырады.

Көбінесе **протеиназа К** қолданылады. Оның әсерінен нуклеазалар тиімді инактивтенеді. **Протеиназа К** – денатурациялаушы агенттерге (SDS, мочеви́на), хелаттаушы (ЭДТА) ға, сульфогидрлеуші агнттерге және трипсин мен хемотрипсінге төзімді фермент болып табылады. Протеиназа К - орта рН - ның кең диапазонында (4-12) белсенді болады. Сонымен қатар, ортадағы денатурациялаушы агенттер Протеиназа К-ның белоктардың пептидті байланыстарына қолжетімділігін тудырады. Сонда-ақ, белоктарды тұздармен тұнбаға түсіруге болады. Мәселен: ацетон аммоний, натрий, калий немесе ДНҚ ны фенол мен хлороформ қоспасымен тұнбаға түсіруге болады.

5. РНҚ тазарту сатысы. Зерттеуге алынған үлгі құрамындағы РНҚның көп мөлшерде болуы салдарынан олар магний иондарымен байланысып, ПТР реакциясындағы ДНҚ -полимеразаның белсенділігін төмендетуі мүмкін.

Оның саларынан ПТР реакция өнімі де аз мөлшерде алынады. Осыны болдырмау үшін ортадағы РНҚ ны тазарту керек. Яғни, ДНҚ - ны тұндыру сатысында буферге хлорид литий қосу немесе РНҚ-азаны нуклеин қышқылдарының судағы тунбасына қосу керек. Осыдан кейін 37 °С температурада инкубациялайды, бұл үлгілердегі РНҚ гидролизін тудырады. Осыдан соң ДНҚ ны спиртпен қайта тұндырады, себебі РНҚ- азамен өңделгеннен кейін РНҚ -ның кіші фрагменттері ПТР реакциясында «затравка» қызметтерін атқаруы мүмкін.

6. ДНҚ тұнбаға түсіру сатысы. ДНҚ ны тұнбаға түсіру үшін суық этанол немесе изопропанол қолданылады. себебі полярлы ДНҚ молекулалары полярлы емес спирттерде ерімейді. ДНҚ ны қайта тұндыруға түсіруге қоланылатын спирттің концентрациясы 70 % аспауы тиіс, бұл концентрация ДНҚ жоғалтып алмау үшін алынады.



Тұндырылған ДНҚ экстрактысында ПТР ингибиторлары қалып қалған жағдайда, олардан тазарту үшін фенол/хлороформ/изоамил спиртінің қоспасын қолдануға балады. Бұл жағдайда қоспа келесі фазаларға бөлінеді: су ерітіндісі, онда нуклеин қышқылдары болады; интерфаза су/фенол – онда белоктар мен көмірсулар болады; хлороформ/изоамил спирті – онда еритін липидтер болады.

Су экстрактысы таза пробиркаға бөліп алынады, ондағы нуклеин қышқылын 3 М натрий ацетатымен тұндырылады, осыдан кейін тұнбаны спиртің концентрациясын біртіндеп жоғарлата отырып (70%, 100%) этанолмен жуып алады.

Фенол, хлороформ және изоамил спирті токсикалық заттар болып табылады, сондықтан олармен жұмыс жасағанда қауіпсіздік ережелерін ұстану керек және оларды қолданғаннан кейін бірден утилизациялау қажет. Осыған байланысты бүгінгі күні осы заттар сирек қолданылады.

Сонымен қатар, бүгінгі таңда ДНҚ ны бөліп алуға арналған коммерциялық заттар (жиынтығы) болады. Оларда токсикалық заттар (фенол, хлороформ) болмайды, әйтсе де бұл реактивтер жиынтығы өте қымбат болып табылады.

ДНҚ экстракциялағаннан кейін оларды ПТР ге арналған буферлерде сақтауға болады. Бұл жағдайда келесі мәселелерді ескеру қажет:

ТЕ буфер құрамында ПТР полимеразаның жұмысына қажет магний иондарын байланыстырып алатын ЭДТА болатынын ескеру қажет.

Стерильді суда сақтағанда ДНҚ әлсіз қышқыл түрінде болады, сондықтан біраз уақыттан кейін автобұзылу орын алады.

Фосфорлы буферлер де ДНҚ құрылысына теріс әсер етуі мүмкін.

Трис буфер Tag- полимеразаға әсер етпегенімен, алайда ДНҚ қосқанда ПТР реакциялық ортаның рН өзгеруі мүмкін.

Экстракцияланған ДНҚ ұзақ уақыт $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ал қысқа уақыт $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ сақтауға болады.

Әдістеме. Фенолды депротенизациялау арқылы ДНҚ-ң тұзды экстракциясын алу әдісі

Мақсаты: өсімдік ұлпасынан ДНҚ-ң тұзды экстракциясын бөліп алу әдісін меңгеру.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: өсімдіктің жаңа кесіп алынған жапырақ ұлпасы немесе сұйық азотта мұздатып қатырылған сонымен қатар, силикогельде кептірілген немесе гербарлық материал; фарфор келі мен келсап, центрифуга, микроцентрифугалық пробиркалар, вытяжной шкаф, термостат («Термит»), вортекс.

Реактивтер:

1) трис-НСІ 1 М буфер: H_2O – 70 мл, трис – 12,1 г, НСІ конц. – 8 мл, осыдан кейін 100 мкл қажетті рН мәніне жеткенше қосу (рН-метрде немесе индикатор қағазымен тексеру), жалпы көлемін 100 мл дейін жеткізу;

2) ЭДТА (рН 8,0) – 0,5 М: H₂O –70 мл, ЭДТА – 14,6 г. рН 8,0 дейін құрғақ NaOH жеткізу. (рН-метрде немесе индикатор қағазымен қолдану), жалпы көлемін 100 мл дейін жеткізу;

3) буфер ТЕ: трис-НСl 1 М (рН 8,0) – 1 мл, ЭДТА 0,5 М (рН 8,0) – 20 мкл, бидистильденген су немесе milliQ-мен жалпы көлемін 100 мл дейін жеткізу.

4) экстракциялаушы буфер: трис-НСl (рН 7,5) – 200 мМ, NaCl – 250 мМ, ЭДТА – 25 мМ, лаурилсульфат немесе натрий додецилсульфат (SDS) – 0,5 %.

Әдістеме:

1. 30–40 мг өсімдік материалын гомогенизациялайды. Ол үшін өсімдік материалын сұйық азотта қатырып алады, осыдан кейін экстракциялайтын буфермен өсімдік материалын фарфор келі мен келсап көмегімен жақсылап езеді. Осыдан кейін көлемі 1,5 мл центрифугалық пробиркаға 500 мкл экстракциялық буфер құяды. Пробиркаларды Пробирки Т = 65 °С термостатқа 10 мин қояды.

2. Пробиркаларды суытып алады, осыдан кейін жылдамдығы 10 мың. айн/мин центрифугалайды.

3. Супернатантты бөліп алып көлемі 1,5 мл пробиркаға құяды, оның үстіне 250 мкл (1 М триспен буферленген) фенол қосады. Пробиркаларды сілкіп, Встряхнуть, 5 мин 15 мың. айн/мин.центрифугалайды.

4. Супернатантты интерфазаға тигізбей бөліп алады, пробиркаға құйып, теңдей көлемде хлороформ қосып, сілкіп, 2–3 мин 15 мың. айн/мин.центрифугалайды.

5. Супернатантты таза пробиркаға бөліп алып, үстіне 500 мкл изопропанол қосып, жақсылап араластырып, тоңазытқышқа 20 минутқа қояды. Осыдан кейін 10 минутқа 15 мың. айн/мин.центрифугалайды, соңында супернатантты төгіп тастайды.

6. Қалдыққа 1 мл 70 % этанол қосып, сілкіп, центрифугировать 5 мин минутқа 15 мың. айн/мин. центрифугалайды, спиртті төгіп тастайды, осы тәсілді қайталайды.

7. Пробирканың аузын ашық қалдырып, тұнбаны кептіріп алады. ДНҚны 200 мкл ТЕ буферінде ерітіп алады. Тоңазытқышта сақтайды.

Зертханалық жұмыс 3. Өсімдік материалаынан ДНҚ-ны тез бөліп алу әдісі

Мақсаты: Өсімдік материалынан ДНҚ тез бөліп алу әдістемесін игеру.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: өсімдіктің жаңа кесіп алынған жапырақ ұлпасы немесе сұйық азотта мұздатып қатырылған ұлпалар, фарфор келі мен келсап, центрифуга, микроцентрифугалық пробиркалар, алюминий оксиді, құм.

Ерітінділер:

1) Экстракциялау буфері: трис-НСl (рН 8,0) – 100 мМ, ЭДТА – 50 мМ, NaCl – 500 мМ, SDS – 1,25 %, NaOH – 8,3 мМ, Na₂S₂O₃ –0,83 %;

2) 3 М калий ацетаты, рН 5,0. На 100 мл: 5 М калий ацетаты – 60 мл; СН₃СООН мұзды сірке қышқылы – 11,5 мл; H₂O – 28,5 мл;

- 3) фенол–хлороформ (1:1) қоспасы;
- 4) хлороформ–изоамил спирт (24:1) қоспасы.

Әдістеме:

1. Алдын ала 20 °С температурада тоңазытқышта қатырылған 200 мг өсімдік жапырағын (сұйық азотта тез қатырылған) алып, (300 мкл) экстракциялайтын буфермен өсімдік материалын фарфор келі мен келсап көмегімен гомогенизациялайды. Егер сұйық азот болмаса, материалды езу барысында 0,1 г алюминий оксидін немесе құм қосылады.

2. Экстракциялау үшін келіге 700 мкл буфер қосып, қайтадан жақсылап езіп араластырады.

3. Алынған массаны «Эппендорф» микропробиркасына көшіреді, бұл жағдайда көлемі шамамен 700 мкл (пробиркада межесі болады 0,75 мл) болу керек.

4. Инкубацияланған гомогенатты 65 °С температурада 10 мин бойы араластырады.

5. Осыдан кейін оның үстіне 220 мкл калий ацетатын қосып араластырып, мұзға 20 минутқа қояды.

6. 3 мин 10 мың. айн/мин центрифугалайды. Супернатантты таза пробиркаға көшіреді.

7. Супернатант үстіне тең көлемде изопропанол қосып, араластырып, ДНҚ ны тұндыру үшін 10 мин 10 мың. айн/мин центрифугалайды.

8. Тұнбаға түскен ДНҚ 70 % этанолмен жуып алып, 200 мкл ТЕ буфермен ерітіп алады.

9. Фенолдық депротенизацияны орындау.

Ол үшін пробиркаға ДНҚ бар ерітіндіге тең көлемде фенол-хлороформ қоспасы қосады, жақсылап араластырып, центрифугалайды. Интерфазаға тиіп кетпей супернатантты бөліп алады. Орындалған тәсілді хлороформ–изоамил спиртмен қайта қайталайды. Супернатантты (ДНҚ бар) таза пробиркаға ауыстырады.

10. ДНҚ тұндыру үшін алынған үлгіге алдын ала 1/10 көлемде 3 М ацетата К (рН 5,0) немесе Na (рН 5,2) қосады, осыдан кейін 2,5 көлемде суық 96 % этанол қосып тұндырады.

11. Пробирканы 10 мин бойы максималды центрифугалайды. Супернатантты төгіп тастап, тұнбаны 70 % спиртпен жуады.

12. ДНҚ тұнбасын кептіріп, 50 мкл ТЕ буферінде ерітіп алады.

Зертханалық жұмыс 4. Көкөністер құрамындағы нитраттардың мөлшерін анықтау.

Мақсаты: Әр түрлі көкөністер құрамындағы нитраттардың мөлшерін анықтау.

Құрал-жабдықтар мен реагенттер: спектрофотометр немесе колориметр, өлшегіш колбалар, тамшуырлар, стакандар, нитраттарды анықтауға арналған реагенттер (Грисс реагенті), көкөністер мен жемістердің үлгілері.

Әдістеме:

Үлгілерді дайындау: көкөністерді (қияр, қырыққабат, салат, шпинат т.б.) мұқият жуыңыз, қабығын, тұқымын және т.б. Үлгілерді ұнтақтап, әрқайсысын 5-10 г өлшеп, үлгілерді өлшегіш колбаларға салады, белгіге дистилденген суды қосады. Нитраттарды экстракциялау үшін араластырып, 30 минутқа қалдырады. Алынған сығындыларды сүзіп алады.

Нитраттарды анықтау: 50 мл колбаға 5 мл фильтрат құяды. Оның үстіне 5 мл Грисс реактивін қосып, жақсылап араластырады. Жалпы көлемін 50 мл дистилденген сумен жеткізеді. Осылай дайындалған ерітіндінің оптикалық тығыздығын спектрофотометрде 520 нм толқын ұзындығында анықтайды.

Калибрлік қысық сызық графигін қолданып нитраттардың мөлшерін мг/л анықтап, 100 г өнімдегі нитраттардың концентрациясын есептейді.

Ескерту. Грисс реактивінің қосылатын мөлшері 2-10 мл дейін ауытқуы мүмкін, ол үлгі құрамындағы нитраттардың мөлшерінен тәуелді болады.

Грисс реактивін дайындау: Ерітінді А: 1 г сульфаниламидті 100 мл 3 М тұз қышқылы (HCl) ерітіндісінде ерітеді. Ерітінді Б: 0,1 г N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлоридті 100 мл дистильденген суда ерітеді. Реактивті қолданар алдында осы екі (А және Б) ерітіндіні 1:1 қатынасында қосып араластырады.

Калибрлік қысық сызық графигін дайындау:

Белгілі концентрацияларда (мысалы, 0, 2, 4, 6, 8, 10 мг/л) натрий нитратының стандартты ерітінділерінің сериясын дайындаңыз. Әрбір стандартты ерітіндіге 2 мл *Грисс реактивін* қосып, араластырады. Ерітінділердің оптикалық тығыздығы спектрофотометрде 540 нм толқын ұзындығында өлшенеді. X осінде нитрат концентрациясы және Y осінде оптикалық тығыздығы белгіленген калибрлеу графигін тұрғызылады.

Нитраттардың концентрациясын есептеу тәртібі: нитраттардың мөлшері (мг/кг) = нитраттардың концентрациясы (мг/л) × 5 (сұйылту коэффициенті).

Зертханалық жұмыс 5. Түрлі жемістер құрамындағы нитраттардың мөлшерін тест жүйелері арқылы анықтау.

Мақсаты: Әр түрлі жемістер (алма, алмұрт, шабдалы, қара өрік, жүзім т.б.) құрамындағы нитраттардың мөлшерін анықтау.

NO₃ нитраттарды анықтауға арналған *Salifert* тест жүйесі. Бұл тест жүйесі екі деңгейлі тестілеуге мүмкіндік береді. Концентрациясы бойынша ең төменгі деңгейі: 0,2 – 10 мг/литр нитрат және орташа деңгейі: 2 – 100 мг/литр нитрат.

Әдістеме:

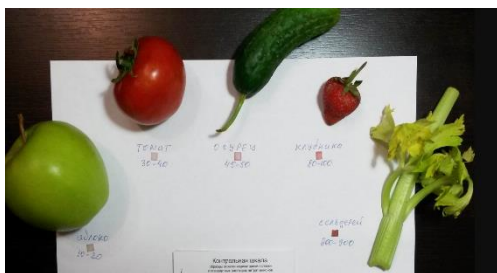
Сынақ бөтелкесіне 1 мл үлгі ерітіндісін құяды. Осыдан кейін алдын ала дайындалған және проиркаға құйылған үлгі экстрактына бірінші NO₃ реагент құтысынан өзінің арнайы межеленген қалағымен (толтырмай) ұнтақ қосады. Осы тәртіппен үстіне екінші реагент NO₃ ұнтағын қосып, 30 секунд бойы ақырын араластырады (шайқамай). Содан кейін 3 минутқа қалдырады.

Алынған нәтиже бойынша зерттеуге алынған үлгілердің түстері тест жолақтарын қолданып салыстырылады. Орта деңгей:

Орташа деңгей. Сынақ бөтелкесін түстер кестесінің ақ бөлігіне қойып, бөтелкеге үстінен қарап, түстерді салыстырады. (түстерді салыстыру күндізгі шашыраңқы жарық жағдайында орындалады) Егер алынған түс нитрат концентрациясының 10 мг/л-ден төмен мәніне сәйкес келсе, түстерді төменгі мәндермен салыстыру дұрысырақ болуы мүмкін (ең төменгі деңгей – төменде қараңыз).

Ең төменгі деңгей. Орташа деңгейді тексеру процедурасы нәтижесінде 10 мг/л-ден төмен мәнді көрсетсе, нитраттың ең төменгі концентрациясын анықтау процедурасын пайдалануға болады. Бұл тестілеудің дәлдігін арттырады. Мән шкаласымен салыстыруға арналған түс сыналған бөтелкенің бүйір жағына қарау арқылы анықталады.

Түрлі түсті таблицаның ақ бөлігі тестіленетін бөтелкенің арт жағына орналастырылады. Түстерді салыстыру күндізгі шашыраңқы жарық жағдайында орындалады. Зерттеу барысында бақыланатын құтыға құйылған ерітіндінің түсі 10 есе арттырылғандықтан, алынған нәтиже бойынша сандық көрсеткішті 10 ға бөлу керек. Мысалы, көрсеткіш 2 ге тең болса, нитрат концентрациясы 0,2 мг/л, ал 50 - 5 мг/л тең болады.



Ескерту: сынақ бөтелкесін және қалақшасын әр қолданар алдында мұқият тазалап жуып, дистильденеген сумен шаю қажет. шайыңыз және әр қолданғаннан кейін шайыңыз.

Қосымша ақпарат

Тағамдық өнім	Дала жағдайында (топырақта) өскен өнім құрамындағы нитрат концентрациясы, мг/кг	Жылыжайда өскен өнім құрамындағы нитрат концентрациясы, мг/кг
Картоп	250	-
Қырыққабат	500	900
Сәбіз	250	400
Томат	150	300
Пияз	80	-
Көк пияз	600	800
Жасыл шөптер (салат, шпинат, петрушка, щавель, кинза, укроп т.б.)	2000	3000
Қияр	150	400
Қарбыз	60	-
Қауын	90	-
Тәтті лазы	200	-
Кабачок	400	-
Жүзім	60	-
Алма, алмұрт	60	-

Нитраттар бойынша адам организміне тәуліктік норма 320 мг (ересек адам үшін) немесе 4-5 г/кг салмақ құрайды. Токсикалық концентрациясы 500 мг/тәулік, ал емізулі нәрестелер үшін 10 мг құрайды.

Жеміс-жидектер мен көкөністердің құрамындағы нитраттарды Нитрат-тест жүйесін қолдану арқылы нитраттарды анықтау әдісі.

<https://yandex.kz/video/preview/5926603537997501422>

Зертханалық жұмыс 6. Ауыл шаруашылығы өнімдеріндегі пестицидтерді зерттеу.

Мақсаты: ауыл шаруашылығы өнімдеріндегі пестицидтердің құрамын зерттеу әдістемелерінің принциптерін түсіну.

Әдістеме

Сынама алу: өсімдік үлгілерін (жапырақтары, сабақтары, жемістері) іріктеу талаптарына сәйкес жинау. Үлгілер репрезентативті болуы және пестицидтің нақты мазмұнын көрсетуі керек. Алынған экстрактты қосалқы заттардан (липидтерден, пигменттерден т.б. заттардан) тазартады.

Талдау жүргізу: заманауи аналитикалық әдістерді қолданып тазартылған экстракт құрамындағы пестицидтерке сандық және сапалық анализ жасайды. Ол үшін келесі әдістерді қолдануға болады:

Масс-спектрометриялық анықтауы бар газ немесе сұйық хроматография (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС).

Ультракүлгін немесе флуоресцентті анықтау арқылы жоғары өнімді сұйықтық хроматографиясы (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-Флуор).

Нәтижелерді есептеу және интерпретациялау: экстракция жылдамдығын және басқа факторларды ескере отырып, үлгілердегі пестицидтердің мөлшерін есептеу. Алынған нәтижелерді берілген дақылға белгіленген стандарттармен (МЛ) салыстыру жасалады.

Сенімді нәтижелерді алу үшін сынама алу, үлгі дайындау және талдауға қойылатын барлық талаптарды сақтау маңызды. Сондай-ақ сертификатталған әдістер мен жабдықтарды пайдалану қажет.

Қосымша ақпарат. Ауыл шаруашылығы өнімдеріндегі пестицидтерді анықтау. <https://www.youtube.com/watch?v=trFTdGg6BP4>

Зертханалық жұмыс 7. Сүт өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін бағалау, бөлім 1.

Мақсаты – сүттің сапасын анықтау дағдыларын меңгеру.

Зерттеу нысаны: шығу тегі және жарамдылық мерзімі әртүрлі сүт.

Қышқылдықты анықтау

Әдістеме. Колбаға 10 мл жақсы араласқан сүтті өлшеп, оған 20 мл тазартылған суды және 3 тамшы фенолфталеинді қосады. Колбаның ішіндегісін айналмалы қозғалыспен араластыра отырып, оны 0,1 н сілті ерітіндісімен бюреткадан бақылау стандартына сәйкес және бір минут ішінде жоғалып кетпейтін қызғылт түс пайда болғанша титрлейді. Осы уақытқа дейін бояу жоғалып кетсе, тағы 1-3 тамшы сілті қосу керек. 10 мл сүтті бейтараптандыруға жұмсалған сілтінің мөлшері, 10-ға көбейтінді, Тернер градусындағы қышқылдықты береді. Параллельді анықтаулар арасындағы сәйкессіздік $\pm 1^{\circ}\text{T}$ аспауы керек. Қышқылдық дәрежесін 0,009-ға көбейткенде (1 мл 0,1 н сілті 0,009 г сүт қышқылына тең) сүт қышқылының мөлшерін көрсетеді.

Ескерту:

- 1) титрлеу кезінде қызғылт реңкті анық анықтау үшін су қосыңыз;
- 2) титрлеуді суды қоспай-ақ жүргізуге болады, бірақ алынған мәліметтерден 2°T шегеру керек (қышқылдықтың кез келген дәрежесінде);
- 3) титрлеу кезінде қосылған судың шамадан тыс мөлшері көрсеткіштерді төмендетеді, ал жеткіліксіз мөлшері оны арттырады;
- 4) сүт үлгілерін сиырларды сауғаннан кейін 1,5 сағаттан 2 сағатқа дейін ерте титрлеу көрсеткішті асыра бағалауға әкеледі, өйткені мұндай сүт көмірқышқыл газына жоғары қаныққан;
- 5) түс эталоны тек дайындалған күні ғана қолданылуы мүмкін, ал сақтау қажет болған жағдайда оған формальдегидтің бір тамшысын қосу керек;
- 6) ұзақ уақыт бойы ашық сақталған сілті ерітіндісі қолдануға жарамсыз.

Зертханалық жұмыс 8. Сүт өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін бағалау, бөлім 2. Сүт өнімдерінің термотұрақтылығын анықтау

Мақсаты сүт өнімдерінің термотұрақтылығын бағалау

Алкоголь сынағы. Әдіс этил спиртінің сүт пен кілегей белоктарына әсер етуіне негізделген, олар тең көлемдегі сүтті немесе кілегейді спиртпен араластырғанда толық немесе ішінара денатурацияланады.

Сүт пен кілегейдің термиялық тұрақтылығын спирттік сынама арқылы 68, 70, 72, 75 және 80% этил спирті ерітінділерінің көмегімен анықтайды. Алкоголь концентрациясы артқан сайын сүттің ұюы баяу болса, ондай өнімнің термотұрақтылығы жоғары екенін көрсетеді.

Әдіс шикізаттың, сондай-ақ майдың массалық үлесі 40%-дан аспайтын термиялық өңделген сүт пен кілегейдің ыстыққа төзімділігін анықтау үшін қолданылады.

Алкогольге сынама жүргізер алдында кілегей үлгісін стақанда су моншасында (43 ± 2) °С температураға дейін қыздырады, араластырады және (20 ± 2) °С температураға дейін салқындатады. Тексерілетін сүттің немесе кілегейдің 2 см^3 таза, құрғақ Петри табақшасына құйылады, қажетті көлемдік фракцияның 2 см^3 этил спиртіні қосып, қоспаны айналмалы қозғалыспен мұқият араластырады. $(2 \pm 0,1)$ минуттан кейін талданған сүт пен кілегей консистенциясының өзгеруін байқаңыз. Сүт немесе кілегейдің талданған қоспаларын спиртпен ағызу кезінде екі Петри табақшасында қабыршақтар пайда болмаса, олар спирттік сынақтан өтті деп есептеледі.

Қандай этил спиртінің ерітіндісі сыналған сүтте немесе кілегейде үлпектердің тұнбасын тудырмағанына байланысты олар төменде көрсетілген топтарға бөлінеді:

Топ	этил спиртінің көлемдік үлесі, %
I	80
II	75
III	72
IV	70
V	68

Зертханалық жұмыс 9. Сүт өнімдерінің бактериялық ластануды анықтау

Мақсаты: сүт өнімдерінің бактериялық ластануды анықтау әдісін меңгеру.

Редуктаза бойынша сынақ жүргізу. Редуктаза – микроорганизмдер синтездейтін фермент. Сүтте микробтар көп болған сайын ферменттер де көп

болады. Бұл фермент метилен көгін немесе ресазурин сияқты бояуларды түссіздендіруге қабілетті. Түсі неғұрлым тез өзгерсе, сүтте соғұрлым көп микроорганизмдер болатынын көрсетеді. Бактериялық ластануға негізделген сүттің класын анықтау әдісі осы үлгіге негізделген санитарлық-гигиеналық ережелерді сақтау керек; Редуктаза сынағы метилен көк және ресазуринмен орындалады.

Метилен көкпен орындалатын сынақ. Сынақ екі әдісті қолдану арқылы жүргізілуі мүмкін: стандартты және жеделдетілген. Әдіс микроорганизмдер бөлетін редуктаза ферментінің қасиетіне, яғни метилен көгін оның түссіз лейко түріне айналдыруына негізделген. Сүтте микроорганизмдер көп болған сайын метилен көгінің түсі тезірек өзгереді. Метилен көгін редуктаза ферменті арқылы қалпына келтірудің оңтайлы температурасы 38-ден 40 ° С-қа дейін.

Әдістеме. Пробиркаға 1 мл метилен көк ерітіндісін және 20 мл сүтті құйып, тығынмен жауып, жақсылап араластырады. Сүт құйылған пробирканы температурасы 38-40 °С су моншасына (немесе редукциялық резервуарға) салады. Ваннадағы судың деңгейі пробиркадағы сүт деңгейінен жоғары болуы керек және судың тұрақты температурасын сақтау қажет. Үлгінің түссіздену уақытын 20 минуттан кейін, 2 сағаттан кейін және 5,5 сағаттан кейін тексеру қажет. Пробиркалардағы сүттің түссіздену сәті редуктаза сынағының соңы болып саналады. Үстіңгі жағында кішкентай түсті сақина тәрізді қабаттың болуы немесе төменгі жағындағы кішкене бөліктің бояуы ескерілмейді.

Егер сүт өнімі жеделдетілген әдіспен зерттелсе, онда метилен көгінің стандартты ерітіндісін 10 рет сұйылту керек және талдауға 10 мл сүт алу керек.

Сүт түсінің өзгеруіне және бақылау ұзақтығына байланысты бактериялық ластану класын кестеде берілген мәлімет арқылы сипаттауға болады.

Кесте – Сүттің бактериялық ластану класын анықтау (метилен көкпен жүргізілгін сынақ бойынша)

Түссіздену ұзақтығы		Бактериялар саны 1 мл (млн)	Сүт сапасы	Сүт класы
стандартным методом	Ускоренным методом			
5,5 сағ жоғары	Свыше 3 сағ жоғары	0,5 дейін	Жақсы	1
2 - 5,5 сағ	1 - 3 сағ	4 дейін	Қанағат.	2
20 мин - 2 сағ	8 мин - 1 сағ	20 дейін	Сапасы нашар	3
20 мин аз	8 мин аз	20 аса	Өте нашар	4

Зертханалық жұмыс 10. Сүт тазалығын анықтау. Калий йодидті крахмалмен пероксидаза сынағы.

Мақсаты: сүт өнімінің тазалығын анықтау және калий йодидті крахмалмен пероксидаза сынағын орындау әдістемесін меңгеру

Әдістеме. Әдіс сүт үлгісін арнайы сүзгіден өткізіп, механикалық қоспаларды үлгіден бөліп алу және визуалды жолмен фильтрде қалған механикалық қоспаларды салыстыруға негізделген. 250 см³ сүт үлгісін (35 ± 5) °С температураға дейін жылытып, жақсылап араластырады, осыдан кейін арнайы ыдысқа төгеді.

Сүзу аяқталған соң фильтрді су өтпейтін пергамен қағазға қояды. Механикалық қоспаларға қарай сүт өнімдерін үш топқа жіктейді.

Кесте Сүт үлгілерінің тазалығы бойынша топтарға жіктеу

Тазалық бойынша жіктелу	Сипаттама
бірінші	Сүзгіде механикалық қоспалардың бөлшектері жоқ. Шикі сүт үшін сүзгіде механикалық қоспалардың екіден көп емес бөлшектерінің болуына рұқсат етіледі
екінші	Сүзгіде механикалық қоспалардың жеке бөлшектері бар (13 бөлшектерге дейін)
үшінші	Сүзгіде механикалық қоспа бөлшектерінің (шаштар, тағам бөлшектері, құм) айтарлықтай шөгіндісі бар.

Ескерту - Сүзгінің түсі NTD талаптарына сәйкес сүттің түсіне сәйкес болуы керек. Сүзгі түсі өзгерген кезде сүт сүзгіде болатын механикалық қоспалардың мөлшеріне қарамастан үшінші тазалық тобына жатқызылады.

Әдістеме. Калий йодидті крахмалмен пероксидаза сынағы. Әдіс сутегі асқын тотығын пероксидаза ферменті арқылы ыдыратуға негізделген. Сутегі асқын тотығының ыдырауы кезінде бөлінетін белсенді оттегі калий йодидін тотықтырады, йодты босатады, ол крахмалмен көк түсті қосылыс түзеді.

Белгіленген мөлшердегі өнім мен суы бар пробиркаға 5 тамшы калий йодид крахмал ерітіндісі мен 5 тамшы 0,5% сутегі асқын тотығы ерітіндісін құйып, пробирканың ішіндегісін әрбір реагент қосқаннан кейін айналмалы қозғалыстармен араластырады. Содан кейін пероксидазаның болуы түс өзгеруімен анықталады.

Егер крахмал мен калий йодидінің ерітіндісі бөлек қолданылса, келесі әрекеттерді орындаңыз: өнімдері бар әрбір пробиркаға 0,5 см³ 1% крахмал ерітіндісін, 2 тамшы калий йодидінің 10% ерітіндісін және 5 тамшы 0,5% ерітіндісін құйыңыз. сутегі асқын тотығы, әрбір реагентті қосқаннан кейін пробиркалардың ішіндегісін араластырыңыз, содан кейін түсінің өзгеруі бойынша пероксидазаның болуын анықтаңыз.

Сүт пен сүт өнімдерінде пероксидаза болмаған жағдайда пробиркадағы заттардың түсі өзгермейді. Сондықтан сүт және сүт өнімдері кем дегенде 80 °С температурада пастерленген.

Сүт пен кілегейде пероксидаза болған жағдайда пробиркалардың мазмұны қою көк түске ие болады. Демек, өнімдер пастерленбеген немесе 80 °С төмен температурада пастерленген немесе пастерленбеген сүт өнімдерімен араласқан. Калий йодидті крахмал мен сутегі асқын тотығын қосқаннан кейін 2 минуттан астам пробиркалардағы түстің пайда болуы пастерлеудің жоқтығын көрсетпейді, өйткені

ол реагенттердің ыдырауынан туындауы мүмкін. Әдістің сезімталдығы пастерленген сүт өнімдерінің кем дегенде 5% пастерленген сүт өнімдерінің қосылуын анықтауға мүмкіндік береді.

Зертханалық жұмыс 11. Асханалық қызылша құрамындағы бояғыш заттарды анықтау.

Мақсаты: қызылша құрамындағы бояғыш заттардың (бетанин, бетаксантин) мөлшеріне тамыржемістің көлемі мен өңдеудің тигізетін әсерін зерттеу.

Әдіс қызылшадағы бояғыш заттарын (бетанин, бетаксантин) қышқыл ортада экстракциялауға және олардың оптикалық тығыздығын анықтап, алынған көрсеткіштерді 1% кобальт сульфатының судағы ерітіндісінің оптикалық тығыздығымен салыстыруға негізделген.

Әдістеме.

1. Үлгілерді дайындау әдістемесі. 1) Ірі және көлемі кіші тамыржемістерді (3 дана) ағынды су астында жақсылап жуып, фильтр қағазымен кептіріп, сыртқы қабығынан тазартады және көлденеңнен екіге бөледі. Жарты бөлігін үккіштен өткізіп, массаны жақсылап араластырады. 2) Ірі және көлемі кіші тамыржемістерді (3 дана) ағынды су астында жақсылап жуып қайнақ суда 20 минут өңдейді (бланшировка), осыдан кейін оларды суытып, көлденеңнен екіге бөледі, жарты бөлігін үккіштен өткізіп, массаны жақсылап араластырады.

2. Үлгілерден салмағы 1 г (0,001 г дәлдігі) өлшеп алып 50 мл үш стаканға салады. Осыдан кейін үлгілерді межеленген 250 мл колбаларға ауыстырады. Бояғыш заттарды жоғалтып алмас үшін бастапқы стакандарды бірнеше рет дистильдеген сумен шайып, колбаларға құяды. Әр колбаға 10 мл концентрлі қышқыл құйып, көлемін 250 мл дейін дистильденген сумен жеткізеді және жақсылап араластырады. Осыдан кейін экстракттарды қағаз фильтрден өткізіп сүзіп алады. Алынған экстракттарды бояғыш заттарды анықтау үшін қолданады.

3. Спектрофотометрде стандартты 1% кобальт сульфатының судағы ерітіндісінің және алынған экстракттардың оптикалық тығыздығын спектрофотометрде, кюветаның қалыңдығы 10 мм, 480 нм (бетаксантин үшін) және 535 нм (бетанин үшін) анықтайды.

4. Бетанин мен бетаксантиннің концентрациясын келесі формуламен есептейді:

$$X = \frac{0,022 D_1}{4 m D_2} 100,$$

Мұндағы X – бетанин (бетаксантин) мөлшері, г/100 г; 0,022 – бояғыш заттардың массасы, боялу бойынша 1 дм³ стандартты ерітіндіге сәйкес, г; D_1 – зерттелетін ерітіндінің оптикалық тығыздығы, салыстырмалы көрсеткіші; D_2 –

стандартты ерітіндінің оптикалық тығыздығы, салыстырмалы көрсеткіші; m – тәжірибеге алынған шөкім массасы, г.

Тәжірибе жұмысының нәтижелері бойынша тиісті кесте құрастырыңыз, қорытындысы мен тұжырымдарын жазыңыз.

Зертханалық жұмыс 12. Ет өнімінің балғындығын анықтау.

Мақсаты: ет өнімінің балғындығын күкірт қышқылды мыс сапалы реакциясымен анықтау.

Ет сапасының балғандығын күкірт қышқылды мыс сапалы реакциясымен анықтауға болады. Балған ет сорпасына 5% күкірт қышқылды мыс ерітіндісін қосқанда ешқандай өзгеріс немесе тек әлсіз лайлану байқалады. Ал балғын емес ет сорпасында көгілдір несеме жасыл түсті үлпектер немесе іріткі тәрізді тұнба түседі. Сорпада үлпектердің пайда болуы мыстың әсерінен алғашқы өнім белоктарының ыдырауын көрсетеді. Ал боялған тұнбаның түзілуі алғашқы өнім белоктарының қатты ыдырағанын айқындайды.

Әдістеме. 20 г ет фаршын 150–200 мл колбаға салып үстінен 60 мл дистильденген су құяды. Колбаны жақсылап араластырып, аузын сағаттық шынымен жауып, қайнап жатқан су моншасына 10 минутқа қояды. Алынған ыстық сорпаны тығыз (қалыңдығы 0,5 см кем болмауы тиіс) дәкеден өткізіп пробиркаға құяды. Осыдан кейін осы пробирканы суық су құйылған стаканға салады. Егер фильтрациядан соң сорпада үлпектер қалып қойған жағдайда, қағаз фильтр арқылы өткізеді. Келесі пробиркаға 2 мл сорпа құып оның үстіне үш тамшы 5%-го күкіртқышқылды мыс тамызады. Пробирканы екі-үш рет шайқап, 5 минуттан соң нәтиже көрсеткіштерін балдық жүйе арқылы тіркейді.

Кесте. Алынған нәтижелерді балдық жүйемен бағалау көрсеткіштері

Реакция нәтижелері	балл
Сорпа мөлдір немесе аздап лайланған	0
Сорпада үлпектердің болуы	3
Сорпада іріткі тәрізді көк немесе жасыл тұнбаның түсуі	4

Тәжірибе жұмысының нәтижелері бойынша тиісті кесте құрастырыңыз, қорытындысы мен тұжырымдарын жазыңыз.

Зертханалық жұмыс Ет сапасын рН көрсеткіші арқылы анықтау

Мақсаты: ет сапасын рН көрсеткіші арқылы анықтау әдісін меңгеру

Өңдеу және сақтау технологиясы тұрғысынан ет сапасының маңызды көрсеткіші - рН мәні болып табылады. Еттің суды байланыстыру қабілеті бұлшық ет ұлпасындағы сутегі иондарының концентрациясына, өнімнің шығымына, сақтау кезінде салмағының төмендеуіне, сонымен қатар шіріткіш микрофлораның

дамуына қатысты өнімнің тұрақтылығына байланысты. Басқа көрсеткіштермен қатар рН мәні ет өңдеудің сәйкес бағыттарын анықтау үшін қолданылады.

Ет өнімдерін сапасы жағынан жіктеуде (PSE, DFD, NOR) өнімнің рН көрсеткішін анықтайды, ол үшін зерттеу материалын сойылған малдан (1 сағаттан кейін) және 24 сағат суытылған соң алады. Бұл көрсеткішті колориметриялық немесе потенциометриялық әдіспен анықтайды.

Әдістеме. Үлгі дайындау. Түрлі ет (сиыр, жылқы, тауық, қаз) өнімдерінің судағы экстрактысы дайындалады. Ол үшін 10 г ет фаршын колбаға салып, оның үстінен 100 мл бидистильденген су құйып 30 минутқа бөлме температурасында қалдырады. Экспозициялау аралығында ерітіндіні ауық-ауық араластыру керек. Осыдан кейін ерітіндіні қағаз немесе мақта фильтр арқылы сүзіп алып, рН көрсеткішін зертханалық рН метр көмегімен анықтайды.

Тәжірибе жұмысының нәтижелері бойынша тиісті кесте құрастырыңыз, қорытындысы мен тұжырымдарын жазыңыз.

Зертханалық жұмыс 13. Ет құрамында аммиактық азотты анықтау.

Мақсаты: Ет құрамында аммиактық азотты анықтау әдістемесін меңгеру.

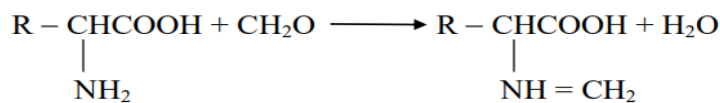
Белоктардың шіріп ыдырау процесі белок молекулаларының пептидтік байланыстарының бұзылуымен басталады. Осының салдарынан бос карбонилді және аминды топтар көбейеді. Сонымен қатар амин қышқылдардың дезаминденуі орын алып, аммиак пен оның қосылыстары жиналады. Сәйкесінше ет құрамында азоттың аминотоптары және аммиак (аминоаммиакты азот) мөлшері артады, бұл ет құрамындағы белоктардың шіріп ыдырау көрсеткіштерінің бірі болып табылады.

Аминоаммиакты азотты анықтау әдісі аминотоптар мен аммиакты формальдегидпен байланысына және карбоксилді топтардың сілтімен титірлеу және саны аминотоптардың азоты мен аммиактың азотына эквивалентті қышқыл валенттілікке негізделген. Осы реакциялардың химизмі төменде келтірілген.

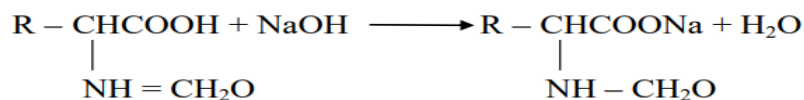
1. Белоктардың гидролиздік ыдырауы:



2. Аминотоптарының формальдегидпен байланысып табиғаты қышқылды, метиленді қосылыстар түзіледі.



3. Бұл қышқылдар бос аминқышқылдарға қарағанда күштірек болып келеді, оларды сілтімен титірлеуге болады. Титрлеу реакциясы келесідей өтеді:



Титрлеуге кеткен сілті мөлшері бойынша амин топтарындағы азотты анықтауға болады.

Формальдигидтің қатысуында сілтімен титрлеу кезінде аммиактық қосылыстардан ығыстырылатын аммиак бұғатталады, ал осы процесс кезінде босап шыққан қышқыл қалдықтары сілтімен титрленеді. Сілтінің көлемі аммиак азотының санына сәйкес келеді.

Әдістеме. 25 г ет фаршын 30–40 мл дистильденген сумен келіде езеді. Ет ботқасын 100 мл колбаға салады. Қалдық ет езіндісін дистильденген сумен жақсылап жуып, көлемі 100 мл ден асып кетпейтіндей етіп құяды. Колбаның аузын резеңке тығынмен бітеп, 3 мин бойы шайқайды, осыдан кейін тұндырып, 2 мин бойы қайта шайқайды, соңында үш қабат дәкемен сүзеді. 40 мл ет сығындысын көлемі 100 мл колбаға құяды. Белоктарды тұнбаға түсіру үшін езіндіге біртіндеп 10 %-алюмоаммиакты қвасцы және барий гидроксидінің қаныққан ерітіндісін қосады, олардың жалпы көлемі өзара тең қатынасында немесе ет сығындысынан аздап асатындай болу керек.

Алюмоаммиакты қвасцы және барий гидроксидінің қаныққан ерітіндісінің қатынасын анықтау үшін келесідей тәсіл қолданылады. 10 мл алюмоаммиакты қвасцыға бес тамшы 1 %-го фенолфталеин ерітіндісін тамызып, барий гидроксидінің қаныққан ерітіндісімен титрлейді. Титрлеуге кеткен сілті көлемі бойынша белокты тұндыруға кететін реактив мөлшерін анықтайды. Мысалы, 10 мл 10 % қвасцы ерітіндісін титрлеуге 8 мл барий гидроксидінің қаныққан ерітіндісі кетсе, сәйкесінше, 40 мл ет сығындысындағы белоктарды тұндыру үшін 25 мл қвасцы ерітіндісін және 20 мл натрий гидроксиді қосылады. Тұндырғыштарды қосқаннан кейін ерітіндінің жалпы көлемін межеге дейін жеткізіп, жақсылап араластырып, 10 минутқа тұндыруға қояды.

Бақылау варинатын дайындау 100 мл колбаға қвасцы және барий гидроксидін (бақылау вариантындағыдай) қосып, межеге дейін дистильденген сумен жеткізеді.

Тәжірибелік вариантты белоктарды тұндырғаннан соң және бақылау ерітіндісін фильтрден өткізеді.

Колбаға 20 мл ет фильтратын құяды, оның үстіне 0,3 мл № 1 индикатор қосып (оның құрамы тең қатынастағы 0,1 % нейтралды қызыл мен 0,1 % метилен көгінің спирттегі ерітінділерінен тұрады) күлгін түстен жасыл түске ауысқанша 0,1 н. NaOH титрлейді (осыған кеткен сілтінің мөлшері есепке алынбайды). Осыдан кейін осы колбаға 10 мл формольді қоспаны қосады, оның үстіне 0,5 мл № 2 индикатор қосады (оның құрамы 1:3 қатынасындағы 0,1 % нейтралды қызыл 1 %-го фенолфталеин ерітіндісінен тұрады). Колбадағы қоспаны (көгілдір-күлгін түсті) 0,1 н. NaOH ерітіндісімен титрледі. Сілтіні қосу барысында бастапқыда ашық жасыл

түске, одан кейін күлгін түске боялады. Зерттеуге алынған фильтрат түсінің ашық жасыл түстен күлгін түске ауысуы тәжірибенің аяқталуын меңзейді.

Осы әдістемеге ұқсас 20 мл бақылау вариантының ерітіндісін де титрлейді.

Аминоаммиактық азотты ААМА) $\omega_{\text{ААМА}}$ (мг %) анықтау келесі формуламен есептеледі:

$$\omega_{\text{ААМА}} = \frac{1,4 \cdot 100 \cdot 100 (V_1 - V_2) K}{25 \cdot 40 \cdot 20} 100 = 70 (V_1 - V_2) K,$$

Мұндағы 1,4 – 1 мл 0,1 н. NaOH ерітіндісіне эквивалентті азот мөлшері, мг; V1 – зерттеу фильтратын титрлеуге кеткен 0,1 н. NaOH ерітіндісінің мөлшері, мл; V2 – бақылау варианты ерітіндісін титрлеуге кеткен 0,1 н. NaOH ерітіндісі мөлшері, мл; K – сілті тиртінің түзету коэффициенті.

Алынған нәтижелерді балл жүйесімен талдау

Аминоаммиактық азот мөлшері	балл
80 мг % дейін (балғын ет)	0
80-130% (еттің балғындығына күмән тудырады)	1
130% жоғары (балғын емес ет)	2

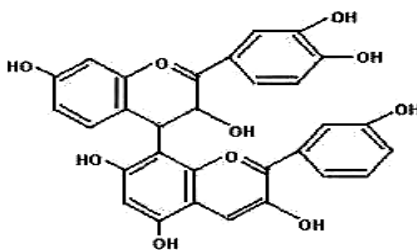
Тәжірибе жұмысының нәтижелері бойынша тиісті кесте құрастырыңыз, қорытындысы мен тұжырымдарын жазыңыз.

Зертханалық жұмыс 14. Шәй құрамындағы танинді анықтау

Мақсаты: шәй құрамындағы танинді анықтау әдісін игеру.

Таниндер (галлотан қышқылдары, танин қышқылдары) – құрамында гидроксил топтары көп болатын фенолды қосылыстар. Өсімдіктер әлемінде кең таралған. Химиялық құрылымы бойынша танин глюкоза мен дигал қышқылының қалдықтарынан тұратын гликозид болып табылады. Тотығу қасиеттерімен және ерекше тұтқыр дәмімен сипатталады.

Таниннің тұтқыр әсері оның шырышты қабықтарға немесе жараның бетіне жаққанда шырыш протеиндерінің немесе жара экссудатының ішінара коагуляциясын тудыратын тығыз альбуминаттардың түзілуімен ақуыздардың тұнбасын тудыру қабілетімен байланысты болады, астындағы тіндердің сезімтал жүйке ұштарын тітіркенуден қорғайтын пленка болып табылады. Бұл жағдайда жергілікті тамырлардың тарылуы пайда болады, секреция шектеледі, жасушалық мембраналар тығыздалады, бұл қабыну реакциясының төмендеуіне әкеледі. Асқазанда танин ақуыздық заттармен қосылып, ішекке аз мөлшерде түседі, сондықтан оның әсері тек аш ішектің бастапқы бөлігінде 3-24 сағат ішінде көрінеді.



Сурет. Танин құрылысы

Таннин алкалоидтар мен ауыр металдардың тұздарымен ерімейтін қосылыстар, ал кейбір алкалоидтармен (морфин, кокаин, атропин, никотин, физостигмин) тұрақсыз қосылыстар түзеді. Әдіс индикатор ретінде индигокарминнің қатысуымен шай таниннің калий перманганатымен тотығуға негізделген (ГОСТ 19885-74 «Шай. Таннин мен кофеиннің құрамын анықтау әдістері»).

Реактивтер: индигокармин ерітіндісі; 0,1 Н калий перманганаты, 10% күкірт қышқылының ерітіндісі.

Ыдыстар мен приборлар: көлемі 250 мл колбалар; аналитикалық таразы; су моншасы; шыны таяқша; титрлеуге арналған бюретка.

Әдістеме.

Үлгіні дайындау. 1. 2,5 г шәй ұнтағын (0,0001 г дәлдікпен өлшенген) 250 мл колбаға салып, оның үстіне 200 мл қайнақ дистильденген су құйып, су моншасына 45 мин экстракциялауға қояды. Экстрактты фильтрден өткізіп, 250 мл колбаға ауыстырады, суытып, үстінен дистильденген сумен межеге дейін жеткізеді.

Талдау жасау.

2.1. Зерттеу объектісі жоқ вариантқа жасалатын тәжірибе (холостой опыт).

25 мл индигокармин және 750 мл краннан аққан ағынды суға 10 мл 10 % күкірт қышқылын қосып, кристаллизаторда шыны таяқшамен үздіксіз араластыра отырып, стандартты 0,1 н. перманганат калий ерітіндісімен титрлейді. Бұл жағдайда көк түс көгілдір жасыл түске, қою, ашық жасыл, сарғыш жасыл, алтын т.ске дейін ауысады. Реакцияның аяқталуы жасыл түстің сары т.ске ауысуымен анықтайды. Индигокармин мен суды титрлеуге кеткен KMnO_4 мөлемін анықтайды.

Танин мөлшерін анықтау.

Колбадан 10 мл шәй экстрактын алып, кристаллизаторға құяды, оның үстіне 750 мл краннан аққан ағынды су және 25 мл индигокармин, 10 мл күкірт қышқылының (10 %) ерітіндісін құяды, осыдан кейін қоспаны шыны тақшамен үздіксіз араластыра отырып 0,1 н. KMnO_4 ерітіндісімен титрлейді. Соңында таниннің тотығуына кеткен KMnO_4 кеткен көлемін табады.

Таниннің массалық үлесін есептеу.

Шәй құрамындағы таниннің мөлшері келесі формуламен табылады:

$$A = \frac{(a - a_1) \cdot 0,004157V}{V_1 \cdot m} \cdot 100,$$

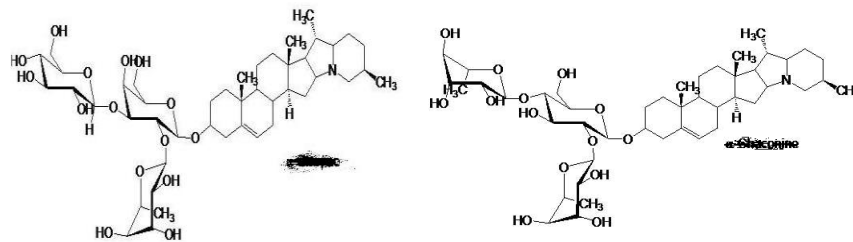
мұндағы a – таниннің тотығуына кеткен 0,1 н. калий перманганатының мөлшері, мл; a_1 – су мен индигокарминнің титріне кеткен 0,1 н. калий перманганатының мөлшері, мл; 0,004157 – 1 мл 0,1 н. калий перманганаты тотықтыратын танин мөлшері, г; V – шәй экстрактының көлемі, мл; V_1 – сынаққа алынған шәй экстрактының көлемі, мл; m – құрғақ шәй үлгісінің массасы, г.

Алынған нәтижелер бойынша қорытынды жасаңыз.

Зертханалық жұмыс 15. Картоп құрамында соланинді анықтау

Мақсаты: Картоп құрамында соланинді анықтау әдістемесін игеру

Стероидты алкалоидтар тобына соланиндер мен шакониндер жатады. Әйтпесе гликоалкалоидтар деп аталады, олардың құрамында бірдей агликон (соланидин), бірақ әртүрлі қант қалдықтары бар. Соланин - Solanaceae тұқымдасына жататын өсімдіктерде жиі кездесетін глюкозид. Картопта алты гликоалкалоид табылды, олардың бірі α -соланин. Бұл заттың күшті уыттылығына байланысты оның картопта таралуы бірқатар зерттеулердің тақырыбы болды; қалыпты өспеген картоптағы соланин мөлшері соңғы анықтамалар бойынша 0,05% жетеді; аршылған картопта оның мөлшері шамамен үш есе аз, яғни соланин түйнектің сыртқы бөліктерінде шоғырланған; өну кезінде соланин мөлшері айтарлықтай артады және ол негізінен өскіндерде шоғырланып, мазмұны 0,1% -дан асады.



Сурет. α -соланин мен α -шакониннің құрылымдық формуласы

Басқа картоп гликоалкалоидтарының құрамдық ерекшеліктері олардың құрылымдық компоненттерін салыстыру арқылы көрінеді:

α -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза + рамноза;

β -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза;

γ -соланин: соланидин + галактоза;

α -шаконин: соланидин + глюкоза + рамноза + рамноза;

β -шаконин: соланидин + глюкоза + рамноза;

γ-чаконин: соланидин + глюкоза.

Сонымен, картоп гликоалкалоидтары құрамы жағынан ұқсас және α-соланин биосинтезінің аралық өнімдері болып табылады. Бұл орташа уыттылықтағы заттар, олардың картоп түйнектерінде жиналуы (түйнектің көгерген бөліктерінде олардың мөлшері артып, 500 мг/кг жетуі мүмкін) ащы дәм береді және уланудың типтік белгілерін тудырады; Бұл қосылыстардың антихолинэстеразалық белсенділігі бар. Соланиндер мен шакониндер баклажан, қызанақ және темекіде кездеседі.

Соланин күшті сірке қышқылымен, концентрлі күкірт қышқылымен және сутегі асқын тотығымен әрекеттескенде қарқынды қою қызыл немесе қызыл түс береді.

Реактивтер: 80-90 % сірке қышқылы; тығыздығы 1,84 г/см³ күкірт қышқылы; 30 % сутегінің асқын тотығы.

Жұмысқа қажет ерітіндіні дайындау үшін 5 % раствора концентрлі сутегінің асқын тотығын сумен 1:5 сұйылтады. Ерітіндіні жұмыс бастар алдында дайындайды.

Ыдыстар мен приборлар: 25 см³ фарфор келісі, 1 и 5 см³ пипеткалар, 50 см³ колбалар, 25 см³ цилиндр.

Әдістеме. Картоп түйнегінен қалыңдығы шамамен 1 мм болатын бірнеше тілім жасаңыз:

бойлық (түйнекті тең жартыға бөлетін жазықтық бойымен жоғарыдан түбіне дейін); көлденең (түйнек түбінде және жоғарғы жағында); бүйірлерден; көзге жақын жерлерде.

Бөлшектерді фарфор келісіне салып, үстіне күшті сірке қышқылын (80-90%) тамшылатып, содан кейін концентрлі күкірт қышқылын және бірнеше тамшы 5% сутегі асқын тотығын тамызады. Құрамында соланин бар кесілген жерлерде бірден қарқынды қою қызыл немесе қызыл түс пайда болады. Тәжірибе нәтижелері бойынша картопты тағамдық мақсатта пайдалану мүмкіндігі туралы қорытынды жасаңыз.