

КОНЬЮГИРЛАНГАН ОКСИЛЛАРНИ ОЛИШ УСЛУБЛАРИ

Г.А. ДУШАНОВА, У.Р. НИЁЗОВ

Самарқанд Давлат Университети, Ўзбекистон Республикаси, Самарқанд

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

Г.А. ДУШАНОВА, У.Р. НИЁЗОВ

Самаркандский Государственный Университет, Республика Узбекистан, г. Самарканд

METHODS OF PRODUCING CONJUGATED PROTEINS

G.A. DUSHANOVA, U.R. NIYOZOV

Samarkand State University, Republic of Uzbekistan, Samarkand

Ҳозирги кунда турли хил инфекцион касалликлар таиҳисидида тест-тизимлардан фойдаланилади. Тест-тизимлар биологик табиатга эга бўлиб, уларни яратишда биотехнологик услублар қўлланилади. Охирги йилларда инфекцион касалликларни аниқлашда ТОРЧ- инфекциялар тизимида гепатит В,С, замбуруғли касалликларни таиҳиси учун турли хил тест-тизимлар яратилган бўлиб, иммунофермент таҳлили кенг тарқалгандир.

Калит сўзлар: конъюгираш, оксил, пероксидаза, тест- системалар.

Today, in the diagnosis of infectious diseases are various test systems based on conjugated protein which is one of conjugating horseradish peroxidase and immunoglobulin G. This research provides cleaning methods, isolation and conjugating enzyme and immunoglobulin G. The conjugation using glutaraldehyde is an effective method used in the practice of creating test systems

Key words: conjugated, proteins, peroxidase, test systems.

Иммунофермент таҳлили биринчи марта 1971 йилда аниқланган ва унинг муаллифлари Энгвал ва Перлман бўлиб Нобель мукофотида сазовор бўлган [3,4]. Реакция асосида антиген-антитана бирикмаси ҳосил бўлади ва уни иммун реакцияси конъюгат-фермент билан нишонланган оксил реакцияси ёрдамида кучайтирилади. Радиоиммун услубларга нисбатан таъсирчанлиги юқори бўлиб, хусусийлиги билан ажралиб туради, яъни аниқлик даражаси юқоридир. Иммунофермент таҳлилнинг икки хил тури мавжуддир. Гомоген ва гетероген- ёки қаттиқ фазада турлари бўлиб, гомоген тури ишлатиш услубига қараб оддий ва тез амалга оширилади, яъни вақт тежаш хусусиятига эга. Бу услуб ёрдамида гормонлар, оксиллар, доривор воситалар ва наркотик моддалар, яъни пастмолекулярли моддаларни аниқлаш қулайдир [5].

Қаттиқ фазада ёки гетероген иммунофермент таҳлили реакция компонентларни ажратиш, қаттиқ фазада планшетада иммобилизиранган антиген ёки антитанани ишлатишга асосланган. Оддий ювиш услубини қўллаш натижасида балласт ёки иммун реакцияларга киришмаган бирикмаларни йўқотиш мумкин. Шунинг учун қаттиқ фаза ўрнида сорбцион хусусиятга эга бўлган полимер материалдан тайёрланган планшеталар қўлланилади. Шундай қилиб, қаттиқ фазада иммунофермент таҳлили қаттиқ фазада кетма-кет ўтадиган хусусий иммунокимёвий реакциялар

натижасида кўп қаватли комплекс ҳосил бўлишини назарда тутди ва ҳар бир босқичда реакцияга киришмаган компонентлар ювилиб борилади [7]. Гетероген иммунофермент таҳлили тўғри ва тўғри бўлмаган турларига ажратилади. Тўғри вариантыда асосан инфекцион касалликлар қўзғатувчисига нисбатан фермент билан нишонланган антитана ишлатилади. Реакция бир босқичда ўтказилади, лекин реакция натижаларини стандартлаш қийинлик билан амалга оширилади. Иммунофермент услубининг асосийси бу тўғри бўлмаган тури бўлиб, унинг натижасида тиббиёт амалиётида тест- тизимлар ишлаб чиқилган бўлиб, инфекцион касалликлар таиҳисидида кенг қўлланилади. Тест тизимлар таркибида:

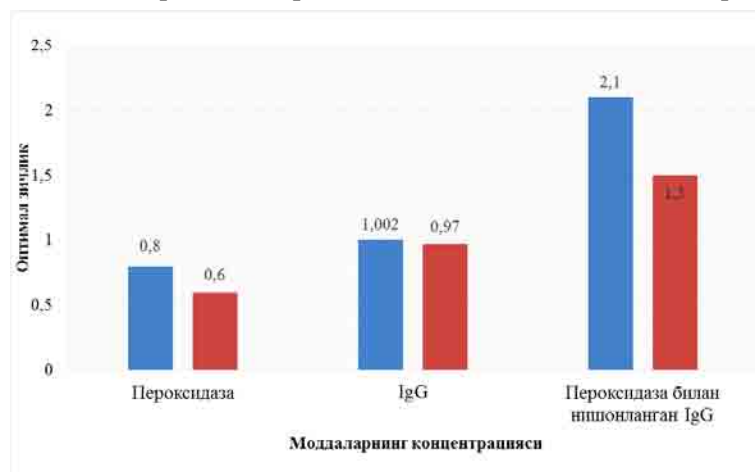
1. Иммобилизиранган антиген+антитанали планшеталар.
2. Эритма 1 (IgG, IgM ли зардоб).
3. Конъюгат (фермент билан нишонланган оксил).
4. Ювиш эритмасини тайёрлаш учун тайёр реактивлар.
5. Стоп-реагент.

Иммунофермент таҳлили учун ишлатиладиган конъюгат асосан конъюгириланган, яъни фермент билан нишонланган антитана бўлиб, таҳлил учун кўпинча хрен ўсимлигининг пероксидазаси билан нишонланган иммуноглобулин ишлатилади. Ушбу оксил конъюгатларини олиш технологиясини ишлаб чиқиш тест-тизимларни маҳаллий шароитда

ишлаб чиқиш имконини беради ва шу жиҳатдан долзарб ҳисобланади.

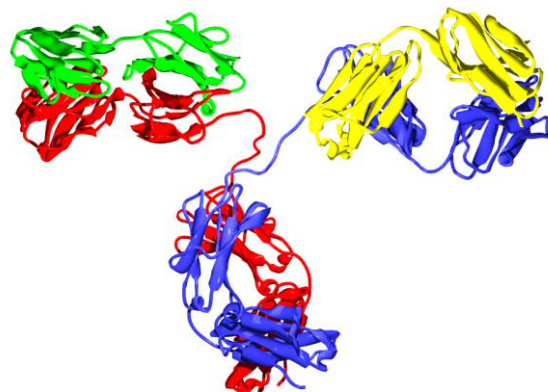
Материал ва услубий қисм. Хрен ўсимлигидан пероксидаза ферментини ажратиб олишда НУ, патент №172872 дан фойдаланилди. Ушбу услубга асосан пероксидаза ферментини ажратиб олиш, ўсимлик илдизини гомогенизация қилиш, ферментни сув билан экстракция қилиш, ҳосил бўлган экстрактнинг аммоний сульфат билан фракцияларга ажратиш ва уни гелфильтрация қилиш ёрдамида ажратиб олинади. Ушбу услубнинг камчиликларига тоза ҳолдаги ферментнинг кам маҳсулот ҳосил қилинишидир [6].

1. Ўсимлик туқимасининг гомогенизацияси.
2. Ўсимлик туқимаси сифатида хрен ўсимлигининг илдизи ва шунингдек, озиқ-овқат маҳсулотларини тайёрлашда ўсимлик илдиз чиқиндиларидан фойдаланиш.
3. Фермент экстракцияси.
4. Гель-фильтрация ёрдамида тозалаш.
5. Фермент лиофилизацияси.

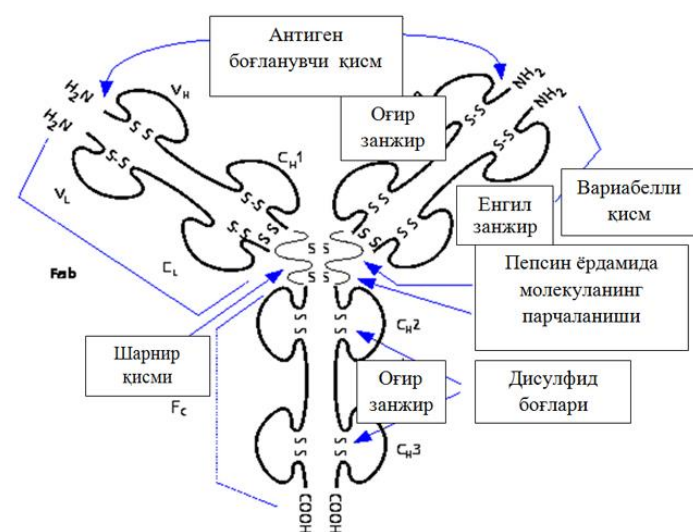


1-расм. Оксилнинг фермент билан нишонланиш даражаси

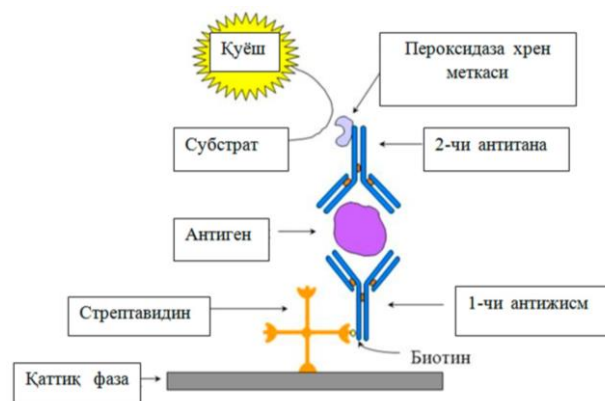
Бунинг учун 3 кг хрен ўсимлигининг илдизларини гомогенизаторда майдаланади. Ўсимлик экстракцияси бир соат давомида ўтказилади. Экстракт ажратиб олингандан сўнг, бир кун давомида 4 градус ҳароратда ушланади ва филтр қоғоздан ўтказилади. Ҳосил бўлган эритма ҳажми 0,5л ни ташкил қилади. Кейинчалик фермент эритмасига 200 гр аммоний сульфатнинг 35% тўйинган эритмаси қўшилади. 3 соат давомида 4 С ҳароратга қолдирилади. Ҳосил бўлган чўкма центрифугада 9000 айланиш тезлигида ўтказилади, ҳосил бўлган супернатант ажратиб олинади. Фракциялар 2л 5мМ буфер эритмада диализ қилинади, диализ охиригача буфер эритма 4 марта алмаштирилади ва лиофил куриштилади. Ҳосил бўлган пероксидаза аморф масса ва тўқ рангга эга бўлади ва буферли сувли эритмаларда яхши эрийди. Ҳосил бўлган фермент 500 мг ни ташкил қилади. Фермент тозалик даражаси СФ да текширилади (403 ва 278 нм тўлқин узунлигида) кўрсаткич 2,7 тенг бўлиши керак. Фермент фаоллиги 1 мг миқдорда 1000 бирлик ҳисобига тенглаштирилади.



2- расм. Иммуноглобулин G нинг фазовий тузилиши



3-расм. Иммуноглобулин G нинг структур тузилиши



4-расм. Иммунометрик тест

IgG ни ажратиб олиш услуги. Бошқа иммуноглобулинлар синфига нисбатан IgGни тоза ҳолда ажратиб олиш осондир. IgGни аммоний сульфат эритмаси билан чўктириб, анионалмашинувчи хроматография қилинади, масалан ДЭАЭ-целлюлоза ёки ДЭАЭ-сефадексларда. Ажратиб олинувчи материал сифатида қон зардоби ишлатилади. IgG иммуноглобулинлар гетероген эритмасидан иборат бўлиб, таснифлари жиҳатидан ҳам бири-бирига ўхшаш бўлади. Бу иммуноглобулинларни анионалмашинувчиларда ажратиш мумкин бўлади, элюент ион кучини ўзгартириш ёрдамида.

Юқори миқдордаги IgG ни олиш услуги.

Аммоний сульфат ёрдамида чўктириш.

100 мл қон зардобига 50 мл туйинган аммоний сульфат эритмаси солинади. Чўкма центрифуга қилиш ёрдамида олиб ташланади. 50 мл дистилланган сув қушилиб яна чўкма ҳосил қилинади 25 мл аммоний сульфат ёрдамида. Чўктириш худди шундай 4-5 маротаба қайтарилади. Кейинчалик олинган эритма диализ қилинади. Бир хил ҳолларда диализ 40% тузни ишлатган ҳолда қўлланилади, чунки эритма чиқиши тезлашади, лекин воситанинг тозалик даражасига таъсир қилади.

Пероксидаза ферменти билан IgG ни нишонлаш услуги. 10 мг пероксидаза pH 6,8 ли 0,2 М га эга бўлган фосфатли буферда эритилади. Буфер таркибида 12,5 г/л глутар альдегиди бўлиши керак. 18 соат хона ҳароратида инкубация ўтказилгандан сўнг, хроматография ўтказилади. СФ да 403 нм тўлқин узунлигида пероксидаза фаоллиги текшириб кўрилади. Агарда фаоллик паст бўлса, пероксидаза яна қушилиши зарур бўлади. Бу эритмага сўнгра, 5 мг иммуноглобулин антитаналар қушилади. Антитаналар олдиндан 1 мл 0,15М ва 0,1 мл 0,1М карбонат-бикарбонат буферидида эритилиши зарур бўлади. 24 соат 4 С ҳароратда инкубация қилингандан сўнг 0,1 мл 0,2 М лизин эритмаси қўшилади. Ҳосил қилинган эритма 2 соат фосфат-тузли буферда диализ қилинади ва фермент билан нишонланган антитаналар аммоний сульфат тузлари билан чўкмага туширилади.

Тадқиқот натижалари. Фермент билан нишонланган IgG оксиллари СФ –Миндрай да 403 нм ва 630 нм тўлқин узунлигида текшириб кўрилди. Назорат варианты сифатида тоза иммуноглобулин эритмаси ва пероксидаза ферменти тадқиқот қилинган. Тадқиқот натижалари 1-расмда келтирилган. Олинган натижаларга кўра, энг юқори кўрсаткич пероксидаза билан нишонланган иммуноглобулин G да 630 нм оптик зичликдаги тўлқин узунлигида кузатилган (2,7 ммоль/л) 403 нм оптик зичликдаги тўлқин узунлигида кўрсаткич 2,1ммоль/л га тенг бўлган. 1-расмда келтирилган маълумотларга

кўра, конъюгирланиш даражаси глутар альдегидини қўллаган шароитда оптимал ўтган ва клиник амалиётда қўллаш мумкинлигини билдиради. Иммуноглобулин G нинг структур ва фазовий тузилишига кўра (1, 2 расм), нишонланиш асосан антигенбоғланувчи қисмидаги вариабелли қисмидаги $-NH_2$ ва пероксидаза ферментининг $-COOH$ гуруҳлари ўртасидаги боғланиш туфайли юз беради (4-расм).

Адабиётлар:

1. Bromuro C., Romano M., Chiani P., Berti F., Tontini M., Proietti D., Mori E., Torosantucci A., Constantino P., Rappuoli R., Cassone A. Beta- glucan –CRM197 conjugates as candidates antifungal vaccines. *Vaccine*, 2010, vol.28, no. 14, pp.2615-2623.
2. Bryant K.A., Block S.L., Baker S.A., Gruber W.C., Scott D.A., PCV13 Infant Study Group. Safety and immunogenicity of a 13- valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, 2010, vol. 125, no. 5, pp. 866- 875.
3. Dagan R., Poolman J., Siegrist C.A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 34, pp. 5513-5523.
4. Hwang K.W. Haemophilus influenza type b (Hib) vaccine and its carrier proteins. *Arch. Pharm. Res.*, 2010, vol. 33, no. 6, pp. 793-795.
5. Kuo Y.C., Chung C.Y., Transcytosis of CRM197-grafted polybutylcyanoacrylate nanoparticles for delivering zidovudine across human brain-microvascular endothelial cells. *Colloids Surf. B:Biointerfaces*, 2012, vol. 91, pp.242-249.
6. Leka O., Vallese F., Pirazzini M., Berto P., Montecucco C., Zanotti G. Diphtheria toxin conformational switching at acidic pH. *FEBS J.*, 2014, vol. 281, no.9, pp. 2115-2122.
7. Park K. Targeted delivery to monocytes. *J. Control. Release*, 2012, vol. 158, no. 1, p.1.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

Г.А. ДУШАНОВА, У.Р. НИЁЗОВ

На сегодняшний день при диагностике инфекционных заболеваний применяются различные тест-системы на основе конъюгированных белков, одним из которых является конъюгирование пероксидазы хрена и IgG. В данной исследовательской работе приводятся методы очистки, выделения и конъюгирования фермента и IgG. Конъюгирование с использованием глутарового альдегида является эффективным методом применяемым в практике создания тест-систем.

Ключевые слова: конъюгирование, протеин, пероксидаза, тест-системы.