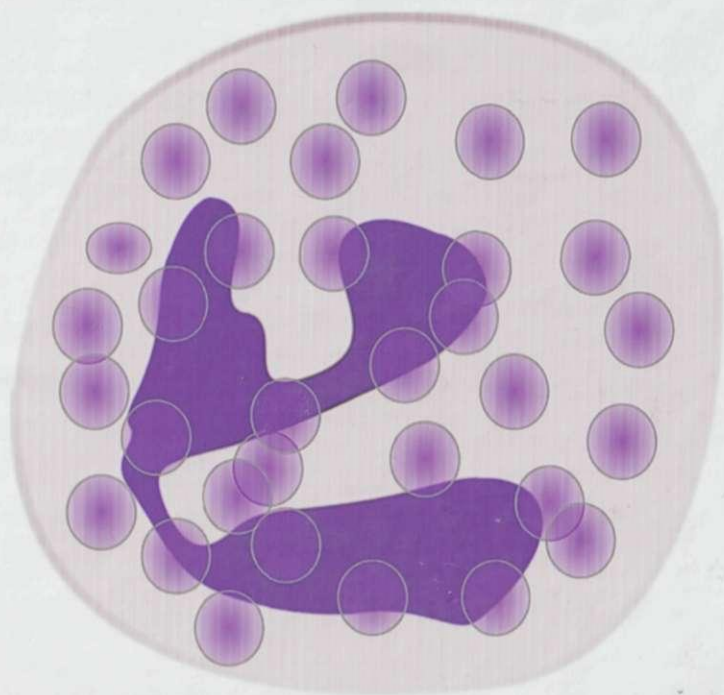


Sh. Toshmuxamedova

# IMMUNO- BIOTEKNOLOGIYA



30.16 ya 73  
T-95

2 ta

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI  
OLIV VA O'RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI

MIRZO ULUG'BEK NOMIDAGI  
O'ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI

SH. S. TASHMUHAMEDOVA

# IMMUNOBIOTEXNOLOGIYA

*O'quv qo'llanma*

Toshkent  
"Innovatsiya-Ziyo"  
2020

UDK: 373.6  
BBK: 74.200.526  
T 95

**Sh.S.Tashmuhamedova**

**Immunobiotexnologiya /o'quv qo'llanma/. – Toshkent: «Innovatsiya-Ziyo», 2020, 82 bet.**

*Ushbu o'quv qo'llanma immunobiotexnologiya fani bo'yicha tayyorlangan bo'lib, oliy o'quv yurtlarining biotexnologiya yo'nalishi bo'yicha tahsil olayotgan talabalarga, mo'ljallangan. Qo'llanmada zamonaviy immunobiotexnologiyaning asosiy yutuqlari va shu bilan birga sezgirlik darajasi o'rta yuqori bo'lgan, hozirgi zamon talabiga javob beruvchi usul, liposomal immunolizis tahlilining mohiyati keng yoritib berilgan. Bundan tashqari, immunoenzim va liposomal asosidagi immunolizis tahlili usullarining klassifikatsiyasi keltirilgan.*

**Mas'ul muharrir:**

**K.T.Alnmatov** – b.f.doktori, professor

**Taqrizchilar:**

**L.S.Kuchkarova** – b.f.doktori

**R.M. Ortiqova** – b.f.nomzodi

Mazkur o'quv qo'llanma O'zbekiston Respublikasi Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirligini Muvofiqlashtiruvchi Kengashining buyrug'iga asosan nashr etishga ruxsat berilgan.

ISBN 978-9943-6791-3-9

© Sh.S.Tashmuhamedova 2020.  
© "Innovatsiya-Ziyo", 2020.



## KIRISH

Zamonaviy biotexnologiyaning analitik yo'nalishlari orasida immunoenzim tahlili (IET) usullari turli sohalarda, ayniqsa amaliyotda keng qo'llanilmoqda. Ular diagnostikani va biokimyoviy tahlil jarayonlarini sezilarli darajada tezlashtirdi. (Gosling, 1990; Yegorov va boshq. 1991; Hro, Buttler, 1991; Zaitova A.Z., 1992; Nosogaya, 1995; Rongen et al., 1997; Park, Purst, 2000; Tashmuhamedova, 2008 va boshqalar).

Hozirgi kunda IET keng qo'llanilishiga qaramay, ushbu tahlilning yuqori sezgirlikka ega metodlarini ishlab chiqish dolzarb muammoligicha qolmoqda. Qo'llanilayotgan immun tahlilning ko'pgina usullari ichida, liposomalar ishtirokida olib boriladigan metodlari muxmi ahamiyat kasb etadi. IET da liposomalarni qo'llanilishi immun taxlilga analogik bo'lgan boshqa variantlarni paydo bo'lishiga olib keldi. Ushbu metodlarga liposomalar va ularga kiritilgan turli marker molekulalar (bo'yoqlar va flyuoroforlar, fermentlar va ferment substratlari, oqsillar, nuklein kislotalar, ionlar va radioaktiv izotoplar) qo'llaniladigan qattiq fazali immunoenzim tahlili (ELISA) guruhlariga mansub tahlillarni kiritish mumkin. Markerlar odatda ularni kalorimetrik, fluorimetrik, xemilyuminometrik, elektrokimyoviy yoki boshqa sezgir metodlar yordamida aniqlash imkonini beruvchi moddalar hisoblanadi. Agar bordiyu, ushbu usullarda markerlar o'rnida fermentlar qo'llaniladigan bo'lsa, fermentativ faollikning paydo bo'lishi natijasida, hosil bo'lgan signal (reaksiya mahsuloti) tahlilni qo'shimcha kuchaytirish imkonini beradi.

Aytish lozimki, immun tahlil metodlari orasida muhim bosqich bo'lib, turli komponentlarni (komplementlar, melittin, fosfolipazalar va boshqalar) qo'shilishi hisoblanadi va bular liposomalarning samarali lizisini (parchalanishini) va markerlarning liposomalardan tashqaridagi muhitga chiqishini ta'minlaydi. Liposomal immunolizisga asoslangan tahlilning bu

guruhi, hozirgi kunda LILA (liposomal immunolizis analizi yoki tahlili) deb nomlanadi.

LILA ning geterogen va gomogen metodlari, ularning yuqori sezgirigidan kelib chiqqan holda, o'simliklar va hayvonlarning turli kasalliklarini diagnostika qilish maqsadida, immunokimyoviy analizda, turli patogen mikroorganizmlar, toksinlar, ksenobiotiklarni aniqlashda keng qo'llaniladi. Liposomalarni qo'llagan holda yangi takomillashtirilgan metodlarning o'zgartirilgan ko'rinishlarini paydo bo'lishi va rivojlanishi farmasevtikada va biotexnologiyada biologik faol moddalarni inkapsullangan barqaror formalarini olishda, tibbiyotda esa turli kasalliklarni diagnostikasida, shuningdek, genoterapiyada hozirgi kunda juda muhim rol o'ynamoqda.

Bu o'rinda shuni aytib o'tish lozimki, eng oddiy usullar bilan turli antigenlarni va shu bilan birga kasallik belgilari alomatlarini aniqlash ancha mushkul hisoblanishi bilan bir qatorda, kasallikni boshlang'ich holatlarida aniqlashga ojizlik qiladi. Kasalliklar, aniqrog'i antigenlar doimo ham aniq ravshan bo'lmasligi yoki boshqa biror bir potagen mikroorganizmlar, ayniqsa, viruslar ta'sirida kasallik belgilari o'zgargan holatda ko'rinishi mumkin.

Viruslarni turli sezgirlik darajasi past testlar asosida aniklash, ko'p hollarda yaxshi natija bermaydi. Shu sababli viruslarni elektron mikroskop yordamida aniqlab, ular haqida ma'lumot olish mumkin. Biroq, ushbu usul faqat viruslarni bor yoki yo'qligini aniklash imkonini berib, bundan tashqari ko'p hollarda virusni idenfikatsiya qilishni qiyinlashtiradi. Shu bilan birga ushbu usul, o'ziga xos asbob uskunalarni talab etadi. Shuning uchun ham viruslarni ayniqsa, fito -viruslarni o'ziga xos immunologik metodlar yordamida diagnostika qilish, sezgirlik darajasi o'ta yuqori bo'lgan usullar bilan aniqlash muhim ahamiyatga egadir.

Hozirgi kunda antigen, antitana komponentlari asosida boradigan turli immunologik metodlar jumladan, agglutinatsiya reaksiyasi, pretseptatsiya, immunodiffuziya, immunoelektron mikroskop asosida tekshirish, radioimmun analiz (RIA),

immunoenzim tahlili (IET) kabi usullar mavjud bo'lib, ular turli antigenlarni va viruslarni aniklash imkonini beradi. Yuqorida qayd etilgan ma'lumotlardan ko'rinib turibdiki, turli antigenlarni aniqlash uchun turli sezgir testlar mavjud va bu sohada katta yutuqlarga erishilgan. B yangi usullar yaratish ustida ishlash va mavjudlarini yanada takomillashtirish aktual muammolardan biri hisoblanadi. Shu sababli hozirgi kunda biotexnologiya fanining asosiy yo'nalishlaridan biri bo'lgan immunobiotexnologiya sohasida olib borilayotgan ilmiy tadqiqotlar asosan yangi tezkor usullarni yaratishga qaratilgandir. Keyingi yillarda juda keng qo'llaniladigan sezgir va aniq usullardan biri bu - albatta immunoenzim tahlili hisoblanadi. Immunoenzim tahlili sezgirligi jihatidan o'ta yuqori usul hisoblanib, ushbu usulda antigen, antitana komponentlarini identifikatsiya qilish, ferment molekulari asosida amalga oshiriladi. Ushbu usul tibbiyotda, qishloq ho'jaligida, oziq-ovqat sanoatida keng qo'llanilib, hozirda esa uning o'ziga xos yangi usullari yaratilgan va ba'zilari esa yanada takomillashtirilmoqda.

Yuqorida qayd etilgan barcha klassik va zamonaviy immunologik usullar o'zaro antigen va antitanalarning munosabatlariga va ta'siriga asoslangandir. Shu sababli, bu ikki komponentning tuzilishi, strukturasi va bajaradigan funksiyalari haqida ma'lumotga, bilimga ega bo'lish, immunoximiya, immunobiotexnologiya kabi fanlarni o'zlashtirishda muhim ahamiyatga egadir.

## 1. ANTIGENLAR, ANTITANALAR VA ULARNING XUSUSIYATI, FUNKSIYALARI

Antigen – bu yot modda bo‘lib, u organizmga kirishi bilan o‘ziga qarshi va spetsifik bo‘lgan, o‘z navbatida antigen bilan o‘zaro ta’sirlashadigan yangi oqsillarni vujudga keltiruvchi immunogen faol modda hisoblanadi. Antigen sifatida turli moddalarni jumladan, mikroorganizmlar, viruslar, polisaxaridlar, turli oqsil moddalar, hujayra, hottoki to‘qimalar ham rol o‘ynashi mumkin. Umuman olganda antigen deb shunday moddani aytish mumkinki, ya’ni organizm uchun yot bo‘lgan modda organizmda unga qarshi bo‘lgan yangi oqsil moddani – glikoproteinlar sinfiga kiruvchi immunoglobulinlarni, ya’ni antitanalarni sintezlanishiga olib keshishi kerak. Bordini, yot modda organizmga kirsa, antitanalar hosil bo‘lmasa, bunday moddalar serologik jihatdan faol modda hisoblanmaydi. Biologik faol moddaga nisbatan antitanalar hosil qilish kerak bo‘lsa, avvalo ana shu moddaning titri, ya’ni serologik jihatdan faolligi aniqlanadi. So‘ngra, immunologik jihatdan stimullovchi moddalar bilan (adyuvand Freyd moddasi yoki boshqa stimulyatorlar) xayvon organizmiga yuboriladi va shundan so‘ng organizmda antitana hosil bo‘lish jarayoni kuchayadi. Organizmda sintezlangan antitanalarda faol markazlari mavjud bo‘lib, ushbu markaz V- variabel qismi deb yuritiladi. Antitanalar ana shu variabel qismi bilan antigen bilan o‘zaro ta’sirlashib bog‘langanda, ulardagi faol markazlar muhim rol o‘ynaydi. Antigenning antitana bilan bog‘lanadigan qismi faol markaz orqali amalga oshib, ushbu qism - antigen determinanti deb ataladi.

Immun sistemani faoliyatini kuchaytiruvchi va vujudga keltiruvchi antigen, yuqorida qayd etganimizdek, immunogenlik xususiyati kuchli modda hisoblanadi. Ko‘pincha antigenlar oqsil tabiatiga ega moddalar bo‘lib, organizmda albatta ma’lum bir immunologik reaksiya turini amalga oshiradi. Axmmo antigenlik xossalari past bo‘lgan, ba’zi boshqa turdagi moddalar ham

mavjuddir. Masalan, nuklein kislotalar, antibiotiklar, garmonlar, yog'lar, gaptelar shular jumlasidandir.

Antigenlik yoki immunogenlik xususiyati past bo'lgan moddalar asosan kichik molekularli moddalar hisoblanib, ular gaptelar deb yuritiladi. Kichik molekularli birikmalarni o'zaro yoki boshqa makromolekulalar bilan birlashtirib /assotsiatlarni, ya'ni immunogenlik xususiyatini hosil qiluvchi moddalar/ gibril, molekular massasi katta bo'lgan moddalarni sintezlash mumkin. Bundan tashqari antigenlarni sun'iy ravishda olish mumkin. Hozirga kunda sun'iy sintezlangan makromolekulalar hosil qilish bilan immunoximiya yo'nalishida faoliyat ko'rsatayoigan bir guruh olimlar shug'ullanishmoqda.

Antigen haqida so'z borganda shuni aytib o'tish lozimki, antigenlar faqat tashqi muhitdan kiradigan moddalar hisoblanmay, balki organizmda fiziologik o'zgarishlar natijasida hosil bo'lgan, organizmning shaxsiy o'ziga xos molekularli ham antigen hisoblanadi. Ular ham spitsefik oqsillar-antitelolar hosil bo'lishiga ko'maklashadigan, genetik jihatdan muhim ahamiyatga ega bo'lgan oqsil tabiatli moddalar guruhi hisoblanadi.

Immunoglobulinlar gruppasiga kiruvchi barcha murakkab oqsillar plazma oqsillaridir. Antitelolarni ya'ni immunoglobulinlarni kimyoviy tuzilishi, funksiyalari juda mukammal o'rganilgan. Ularda ikki turdagi zanjir mavjud bo'lib, ularning og'ir zanjirlari N-zanjir va yengil zanjirlari esa L- zanjir deb yuritiladi. Ushbu zanjirlar turli og'irlikka ega bo'lib, 4 ta polipeptid zanjirdan ya'ni 2ta og'ir va 2ta yengil zanjirdan tuzilgan. Quyida ko'rsatilgan rasmda antitelani tuzilishi va uning qanday qismlardan tashkil topganligi sxematik ravishda tasvirlangan. Og'ir va yengil zanjirlar bir-bilan sulfid ko'priklari orqali bog'langan / -N/ bog'lar. Xuddi shunday bog'lar ikkala og'ir zanjirlar orasida ham bor. Har bir yengil va har bir og'ir zanjirlarda ichki bog'lar mavjud bo'lib, ular ikki tipdagi uchastkalariga ajraladi: doimiy uchastkaga- ya'ni har xil immunoglobulinlarda turlicha bo'ladigan aminokislotalar ketma-ketligidan iborat qismga, /S va SN uchastkalar/ va doimiy

bo'lmagan qismga, ya'ni variabel uchastka, ularda aminokislotalar ketma-ketligi o'zgaradi. Immunoglobulinlarning giper-variabel qismi antitelaning faol markazi hisoblanib, ushbu qism segmentlari to'g'ridan to'g'ri u yoki bu antigen bilan o'zaro ta'sirlashib bog'lanish uchun javobgardir. Har qaysi uchastka 60-70tagacha aminokislota qoldig'idan tashkil topgan, xalqa shakliga ega bo'lib, fazoviy ko'rinishda tahlangan tuzilishga ega bo'lib ko'rinadi. Ikkita og'ir zanjirning S-oxirgi bo'laklari immunoglobulin molekulasida effektor qismi hisoblanib, ba'zi fiziologik faol moddalarni, masalan komplementni bog'lash vazifasini bajaradi. Antitana bilan ta'sirlashgan antigen antitanani boqlovchi uchastkani hosil qiladi. Variabel va konstant uchastkalar funksional uchastkalar bo'lib, antigeni tanishga javobgardir. Immunoglobulinlarda mavjud N-bog'larni turiga qarab, ularni 5ta sinfga ajratish mumkin. Masalan IgA, IgM, IgD va IgG, IgE ga ajratiladi.

Immunoglobulinlarni og'ir zanjirlari, H zanjirdagi – bog'lari jiddiy farqlanadi. Yengil va og'ir zanjirlarni bir-biriga solishtirish ular strukturasi o'xshash aminokislotalar ketma-ketligi mavjudligini ko'rish mumkin. Immunoglobulinlarning zanjirlarini so'ngi uchastkasi S – uchastka deb belgilanadi va antitelaning konstant qismi hisoblanadi. Og'ir zanjirdagi konstant qism- S<sub>n</sub> uchastka leib yuritiladi. Bundan tashqari og'ir va yengil zanjirlarda domenlar mavjud bo'lib, ular immunoglobulin harakatini ta'minlaydi. Og'ir zanjirda 3ta, yengil zanjirda esa 1tadan domen mavjuddir. Og'ir zanjirdagi domenlar varmabel va konstant domenlarga bo'linadi. S<sub>n1</sub> og'ir zanjirning birinchi konstant domenini bildiradi..

Immunoglobulinlar o'zlariga xos bo'lgan, alohida genlarda sintezlanadiler. DNK strukturasi immunoglobulinlarni doimiy va variabel uchastkalar hakida ma'lumot yozilgan gen uchastkalari bo'ladi. Ushbu gen uchastkalari bir necha tur antitanalar hosil kilishga javobgar hisoblanadi. Hujayra darajasida immunoglobulinlarni hosil bo'lishi uch turdagi xujayralarni kelishilgan ishtirokida kechadi, ya'ni T - limfotsitlar V -

limfotsitlar va makrofaglar. Makrofaglar komplement sistemasi uchun retseptorlarga ega hujayra hisoblanadi. Organizmga tushgan antigen spesifik kompleks ko'inishida T xujayraga va makrofagga yoki faqat makrofagga bog'lanadi. Makrofag antigenni antitelolar sintezini stimullaydigan immunogenga aylantiradi. Makrofagni antigen bilan bog'lanishi V-limfotsitlarni ko'payishiga ham sabab bo'ladi. V- limfotsitlar antitanalar sintezini boshlash uchun, plazmatik xujayralarga aylanadi va o'ziga xos antitanalarni sintezlay boshlaydi.

**Antitanalar faol markazi va uning roli.** Antitanalar molekulari orasidagi ingichka bo'shliq antigen bog'lovchi maydonni hosil qiladi. Faol markazda gipervariabel' yuqori darajada o'zgaruvchanlikka ega uchastka sigmentlari joylashgan bo'ladi. Aminokislota ketma-ketligi bilan farqlanadigan antigen bog'lovchi uchastka antigen determinantini komplementar o'zaro ta'sirini ham ta'minlaydi. Bu o'rinda shuni aytib o'tish lozimki, bitta politseptid zanjiridan hosil bo'ladigan fermentlarning faol markazidan farqi o'laroq, antitanalarda kombinatsion xilmaxillikni ta'minlaydigan ikkita zanjir ishtirok etadi. Buning natijasida ularda yangi xususiyatlar vujudga kelib, ular polispesifik hisoblanadi, ya'ni birgina antitana molekulasini, bir kator antigenlar to'plamiga komplementar bo'lishi mumkin. Bunday holatda, antitana o'xshash tuzilishga ega antigen determinantlari hamda umuman boshqa struktupara ega determinant bilan ham birikishi mumkin.

**Antitanani antigen bilan o'zaro ta'siri.** Immunoglobulinning (gipervariabel uchastkasi) molekulasining tuzilishiga qarab, bir yoki bir necha gruppaga antigenlar antitanalar bilan o'zaro spesifik ravishda ta'sirlashishi mumkin. Bunday holatda antigen va antitana orasida hosil bo'layotgan bog'lanish juda yuqori bo'ladi. Biroq, ba'zi xolatlarda ko'p miqdordagi antigen antitela komplekslariga ta'sir etadi. Antitana molekulasini simmetrik va kami bilan antigen bog'lovchi ikkita markazga ega. U ikkita xar xil antigen molekulasiga tegishli xar xil antigen determinantlari bilan o'zaro ta'sirlanishi mumkinligini bildiradi.

Shuning uchun antigen-antitana kompleksilari hosil bo'lishida cho'kmalar vujudga keladi, ya'ni presipitatlar. Presipitatsiya reaksiyasi jarayonlari mohiyatini tushunishda ushbu tushuncha muhim ahamiyat kasb etadi. Agar antigen oqsil modda bo'lmay, xujayra bo'lsa, unda xujayra yuzasidan ko'p mikdorda aynan shu antitanalarni boglaydigan determinantlar mavjud bo'lishi mumkin. Bunda yuzadagi manfiy zaryadlarni ekranlashishi yuz beradi va xujayralar yopisha boshlaydi va agglyutinatsiya reaksiyasi amalga oshadi.

Shuning uchun presipitatsiya va agglyutinatsiya reaksiyalari faqat antigen va antitanalarni o'zaro bir-biriga bo'lgan nisbati, ma'lum mikdorda bo'lgandagina sodir bo'ladi. Shu bois, immunokimyoviy reaksiyalarni qo'llash bilan olib boriladigan analitik jarayonlar (oddiy va qo'sh diffuziya, immunoelektroforez, har xil immunoanaliz, immunoenzim tahlili) ta'sirlanuvchi birikmalarning optimal nisbatida olib borilishi lozim. Antitana haqida so'z borganda, albatta monoklonal antitanalarni roli va ularning ahamiyati, ularni olish usullari haqida bilish juda muhimdir. Sababi IET va liposomal IETning sezgirlik darajasi ushbu komponentga juda bog'liqdir.

**Gibridom texnologiya asosida monoklonal antitanalar olish.** Monoklonal antitanalar – gomogen antitanalar bo'lib, gibridd hujayralar tomonidan ishlab chiqariladi. Bu hujayralar bitta izotipli spetsifik immunoglobulinlarni ishlab chiqaradi. Bunday gibridd hujayralar – gibriddomalarni olish metodikasi 1984 yilda Milshteyn, Kyoler va Yerne tomonidan ishlab chiqilgan. Bu metod quyidagi jarayonlarni o'z ichiga oladi: immunizatsiyalangan hayvon (masalan, sichqon) taloq hujayralaridan V-limfotsit xujayralari olinib, mieloma (rak) hujayralari bilan qo'shiladi va gibridd xujayra hosil qilinadi. So'ng gibridd hujayralar ko'paytiriladi va seleksiya qilinadi. Bunda seleksiyada kerakli klonlar ajratib olinadi. Ular ma'lum antitanalarni ishlab chiqaradi. Bu antitanalar esa yuqori spetsifiklikka ega bo'ladi. Olingan antitanalar ma'lum epitopga nisbatan spetsifikligi bilan ajralib turadi.

Monoklonal antitanalar bir jinsli bo'lib, ular o'zining quyidagi xususiyatlari bilan ajralib turadi. Masalan:

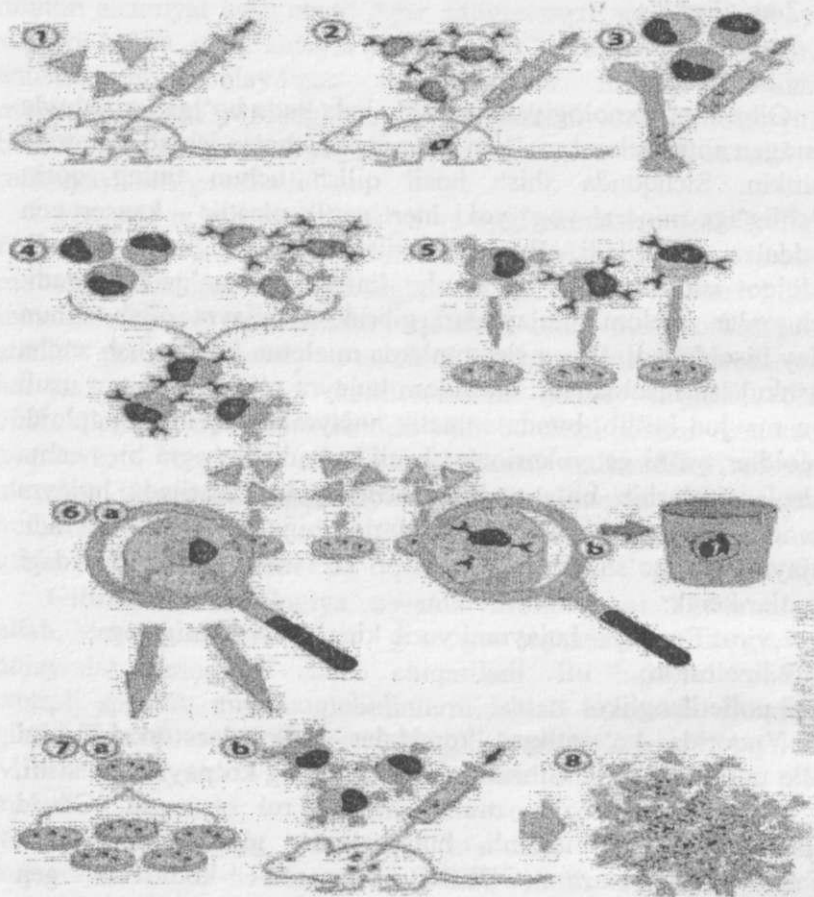
1. spesifikligi;
2. avidligi;
3. affinligi;
4. barqarorligi

Gibridom texnologiyalar asosida juda katta bo'lgan miqdorda gomogen antitanalarni ma'lum antigenga nisbatan ishlab chiqarish mumkin. Sichqonda shish hosil qilish uchun uning qorin bo'shlig'iga mineral yog' yoki inert qattiq plastik – kanserogen moddalar yuboriladi. Buning natijasida shish hosil bo'ladi. Tadqiqot ishlari inbred sichqonlar liniyasida amalga oshiriladi. Sichqonlar mieloma hujayralari gibridom hujayra olish uchun qulay hisoblanadi. Biroq sichqonlarda mieloma hosil qilish ancha mushkul ish hisoblanadi. Gibridom hujayra olishni spontan usuli ham mavjud bo'lib, bunda somatik hujayralar gibrida tetraploid, diploidlar, ya'ni geterokarionlar hosil bo'ladi. So'ngra bir nechta yadrolar birlashib bitta yadroni hosil qiladi. Natijada hujayra xromosomalarini birlashtirgan gibrid hujayra hosil bo'ladi. Hujayralarni qo'shilish chastotasini ko'tarish uchun quyidagi agentlar kerak:

1. virus Senday – hujayrani yorib kirish xususiyatiga ega;
2. lizolesitin;
3. polietilenglikol

Yuqorida ko'rsatilgan moddalar hujayralar qo'shilishini to'liq ta'minlamaydi. Gibridlar hujayralarning ko'payishi, o'sishi, seleksiyasi uchun oziqa muhiti muhim rol o'ynaydi. Gibrid hujayra olishda mielomli hujayralarda gipoksantin-guanin-difosriboziltransferaza (GGFRT) fermentini kodlovchi gen repressiya qilinishi zarur. Mielomli hujayralar muhitida GGFRT bo'lmaganligi uchun halok bo'ladi. Normal hujayralarda bu ferment bo'lsa ham, ular ko'paya olmaydilar, natijada ular ham halok bo'ladi. Gibrid hujayralarni seleksiya qilishda GAT (gipoksantin, amidopterin, timidin) oziqa muhiti ham ishlatiladi. Bu holda ham mutant, ya'ni gibrid hujayralar GAT muhitida

faoliyat ko'rsatadi, normal va mielom hujayralar esa halok bo'ladi. Hosil bo'lgan gird hujayra klonlaridan maqsadli antigenlar uchun monoklonal antitanalar ajratiladi (1-rasm).



- 1-rasm. Gibridom texnologiya asosida gibrid hujayra olish: (1) hayvonlarni immunizatsiyalash;  
 (2) taloqdan V-limfotsitlarni ajratib olish;  
 (3) mieloma hujayralari kulturasi;  
 (4) V-limfotsitlar va mieloma hujayralarini qo'shilishi;  
 (5) hujayra liniyalarini sekresiyasi;

- (6) antitanalar ishlab chiqaruvchi liniyalarni skrining va seleksiyasi;  
(7) gibridomani in vitro (a) yoki in vivo (b) ko'payishi;  
(8) antitanalarni olinishi.

## Monoklonal antitanalarni ahamiyati

Monoklonal antitanalar diagnostikada keng qo'llaniladi. Buning sababi. ularning sezgirligi, spesifligi o'ta yuqori bo'lishidadir. Ma'lumki, organizmada immunologik reaksiyalarda ishtirok etuvchi T-hujayralarning bir necha turlari mavjud: T-xelperlar, T-supressorlar, T-kuchaytiruvchilar, T-effektorlar, T-normal killerlar, T-tabiiy killerlar, T-nulinchi hujayralar. T-xelperlar turli immunologik reaksiyalarni o'tkazilishida yordamchi hujayra sifatida muhim rol o'ynaydigan hujayralar hisoblanadi. T-supressorlar esa immunologik reaksiyalarni boshqaradigan hujayralar bo'lib, asosan immunologik reaksiyani to'xtatish funksiyasini bajaradi. Hozirgi kunda ushbu hujayralarning markerlariga spesifik monoklonal antitanalar olingan. Ushbu antitanalar T-hujayra tiplarini aniqlashda keng qo'llanilmoqda. Quyida organizmda immunokompetent hujayralar yordamida antitana sintezi ko'rsatilgan:

Th1 + AG + Makrofag + V-limfotsit → AT ishlab chiqariladi.

Th2 + Makrofag + V-limfotsit → AT ishlab chiqariladi.

Yuqorida keltirilgan reaksiya jarayonidan ko'rinib turibdiki, organizmda antitana sintez bo'lishida immunokompetent hujayralarning roli juda katta. Biroq ushbu reaksiya asosida hosil bo'layotgan antitanalar poliklonal antitanalar hisoblanadi. Poliklon antitanalar spesifligi jihatidan monoklonal antitanalardan ancha past hisoblanadi. Shuning uchun monoklonal antitanalar diagnostikada keng qo'llanilib, virus gepatitini A, B, C, D formalarini ham aniqlashda, SPID virusini, tuberkulyoz kasalligini aniqlashda va boshqa turli kasalliklarda keng qo'llaniladi. Ma'lumki, hujayra membranasida hujayraning differensirovkasida ishtirok etadigan oqsil-determinantlari mavjuddir. Ularni identifikatsiyasi monoklonal antitanalar orqali amalga oshirilmoqda. Ko'rsatilgan usul orqali inson hujayrasining

differensirovkasi, jumladan, fibroblastlar va asab to'qimalarining shakllanishi aniqlangan. Monoklonal antitanalar biotexnologiyaning affin xromatografiyasida ligand sifatida foydalaniladi. Masalan, monoklonal antitanalar asosida, 500 marta tozalangan interferon olish usuli ishlangan. Monoklonal antitanalar yordamida oqsil, toksin, gormon va boshqa moddalarning gomogen preparatlarini olish mumkin. Tibbiyotda monoklonal antitanalar turli kasalliklarni IET yordamida aniqlashda ishlatilmoqda. Bakteriyali kasalliklardan koklar, parazitli infeksiyalar, bezgak va boshqa turdagi ko'pgina kasalliklarga tashhis qo'yishda monoklonal antitanalar qo'llaniladi. Monoklonal antitanalar individual yoki terapevtik maqsadlarda ham foydalanilmoqda. Radioaktiv moddalar bilan nishonlangan monoklonal antitanalar selektiv ravishda rak hujayralari retseptorlari bilan bog'lanib, to'qimalarning ko'payishini sekinlashtiradi yoki to'xtatadi. Monoklonal antitanalarni xavfli shish kasalliklariga qarshi ishlatiladigan sitotoksik moddalar bilan bog'lab, ularni rak hujayralarga yo'naltirish orqali kasallikni davolash ishlari amalga oshiriladi. Hozirgi kunda ayrim tabiiy toksinlarni modifikatsiya qilish orqali, spesifik immunotoksinlar olinib, ular yordamida rak hujayralarini rivojlanishi to'xtatilmoqda. Masalan, kanakunjut urug'ida uchraydigan ritsin degan toksin ikkita polipeptid zanjiridan iborat. Polipeptidning A-zanjiri toksik xususiyatga ega, uning 2- V-zanjiri galaktoza ishtirokida hujayra membranasiga bog'lanadi. Natijada, A-zanjir dissotsiyalanib, hujayra ichkarisiga kirib, oqsil sintezini to'xtatadi. Polipeptidning V-zanjirini mkAT bilan almashtirib, hosil bo'lgan immunotoksinni xavfli shish hujayralarini davolashda ishlatish mumkin.

Hozirgi kunda AQSh va Yevropaning farmasevtik firmalari monoklonal antitanalarni ko'p miqdorda ishlab chiqarmoqda. Ular kasalliklarda, laboratoriya amaliyotlarida va ilmiy-tadqiqot izlanishlarini olib borishda keng qo'llanilmoqda.

## Turli antigenlarni va viruslarni diagnostika qilishda qo'llaniladigan immunologik testlar

Immunologik reaksiyalarni yukori spesifligi biologik faol moddalarni aniklashning sezgir metodlarini ishlab chikish nuktai nazaridan katta qizikish uyg'otdi va bu o'z navbatida klinik diagnostika uchun alohida axamiyat kasb etdi deb aytilsa, mubolag'a bo'lmaydi. Antigen-antitana kompleksi ma'lum sharoitda hosil bo'lsa, ushbu kompleks eritmada cho'kmaga tushganligi uchun tez aniqlash mumkin bo'ladi. Polivalent antigenlar polivalent antitanalar bilan o'zaro ta'sirlashib, katta to'rsimon komplekslarni hosil kiladilar va ular reaksiya davomida o'zgarmaydilar. Eritmada antigen-antitana konsentratsiyasi taxminan teng bo'lgan vaktida, bunday komplekslar juda to'lik presipitatsiyalanadi. Eritmada antitana ko'p bo'lgan vaktida, antigenning bitta molekulasi bir nechta antitana molekulalari bilan bog'lanishi mumkin, antigen ko'p bo'lgan vaktida esa, antigen bog'lovchi uchastkalar tuyinadi va ortiqcha immun komponentlarni qolishiga sabab bo'ladi. Ma'lum miqdordagi immun komplekslar ikkala holda ham sodir bo'ladi. Presipitatsiya reaksiyalari amalga oshirishdan oldin, antizardob tarkibidagi antitanalar mikdoriga, to'g'ri keluvchi antigenning ma'lum miqdori qo'shiladi va reaksiya olib boriladi. Reaksiya o'tkazilgandan so'ng esa, antigen antitana xususiyatiga karab, cho'kmada ularning miqdori aniklanadi.

Biroq cho'kmaga tushgan kompleks har doim ham maksimal miqdorda bo'lavermaydi, chunki presipitatsiya reaksiya borishi uchun antigen ko'p miqdorda bo'lishi kerak.

Serologik reaksiyalarni aniqlashda keng tarqalgan metodlardan biri agar gelining poralarida qo'sh diffuziya metodi hisoblanadi. Antigen va antitananing o'zaro ta'sirida ularni uchrashish /qo'shilishi/ joyida presipitatsiya chizigi hosil bo'ladi. Bu reaksiya ikkala immun komponentning bir-biriga spesifligini bilish uchun juda muhimdir. Immun komponentlar spesifligini aniqlash usullaridan yana biri immunoelctroforez usuli

hisoblanadi. Bunda bir yunalish buyicha antigenlarni, boshqa yunalish buyicha esa antitanalarni ajratish mumkin bo'ladi.

Immun komponentlarni aniqlashda ularning sezgirligini oshiruvchi usullar ham mavjud bo'lib, ushbu usulga misol qilib, radioimmunologik metodni aytib shtish mumkin. Radioimmunologik usul o'ta yukori sezgirlikka ega bo'lib, bunda antigen va antitana radiaktiv izotop bilan nishonlanadi va radioaktivlikning mikdoriga karab, kerakli komponentni konsentratsiyasi aniqlanadi. Radiaktiv nishon o'rniga fluoritsent moddalarni ham nishon sifatida qo'llash mumkin Ammo immunologik reaksiyalar samarasini oshirish nuqtai nazaridan, nishon sifatida ferment preparatlarini qo'llash bir muncha afzalliklarga ega bo'lib chikdi. Sababi bu holda metodni sezgirligi bir necha ming barobar oshadi. Chunki fermentlar biokatalizatorlar bo'lib, o'z substratini maxsulotga aylanish reaksiyasini o'ta yuqori darajada tezlashtirish qobiliyatiga egadir. Shu sababli fermentlarni o'ziga xos xususiyatdan foydalanish maqsadida, 60- yillarga kelib ularni nishon sifatida qo'llash taklif etildi. Shundan so'ng, immunoenzim tahlili metodlariga asos solindi. Keyingi yillarda esa, ushbu yo'nalish asosida immunobiotexnologiya, immunoximif kabi fanlar rivojlanib, taraqqiy eta boshladi va bu sohada katta yutuqlarga erishildi. Immunobiotexnologiyaning eng katta yutuqlaridan biri –bu itmunoenzim tahlilini ishlab chiqilishidir. Ushbu tahlilning selektivligi, uning negizida bir kator yangi aniqlash metodlarini vujudga keltirdi. Bu sohadagi asosiy yutuklar ferment -substrat va antigen-antitana, hamda makromolekulalar biologik spesifikligiga asoslangan reaksiyalarni o'rganish va ularning o'ziga xos tomonlarini aniqlash tufayli qo'lga kiritildi.

Viruslar – antigen sifatida bir necha xil antigen determinantlarga ega antigen hisoblanib, ularni hayvon organizmiga yuborganda, ularga karshi antitanalar hosil bo'lishi kuzatiladi. Sababi viruslar, antigenlik hususiyati ega bo'lgan, turli antigen determinantasi mavjud bo'lgan mikroorganizm hisoblanadi. Viruslar nuklein kislotasini o'rab turgan tashqi oqsil

qavatidan tashkil topgan bo'lib, antitana hosil kilishda sabab bulgan antigen determinantlari esa, odatda 3-----5 yo'nalishga ega aminokislota qoldiqlaridan iborat bo'ladi.

Antitanalar ya'ni immunoglobulinlar virus antigen determinantasiga nisbatan sintez bo'ladi. Bunda antitanalar boshqa oqsillardan farqi o'laroq, har hil effektor funksiyali geterogen populyatsiyalar hosil qiladi. Sun'iy immunizatsiyada hosil bo'ladigan turli antitanalar – ko'p holatlarda o'ziga xos hususiyatlariga ko'ra serologik testlarda muhim rol o'ynaydi.

Ishlab chiqilgan immunologik metodlar antigen va anti zardob oqsillari o'rtasida bo'ladigan munosabatlarga asoslanib, ushbu metodlarni bir qancha guruhlariga ajratish mumkin. Birinchisi – bu antigenlarni o'ziga xos antitanalar bilan presiptatsiyalanishiga ya'ni agar gelida /cho'kishiga/ asoslangan metoddir. Boshka guruh metodlari presipitatsiya reaksiyasiga asoslangan bo'lib, ammo pretseptatsiya antigen va antitanalarni agar poralaridagi diffuziyasidan so'ng yuz beradi. Ushbu usulda elektr maydoni orqali diffuziya jarayonini tezlashtirish mumkin. Bir qator metodlar, agglyutinatsiyaga asoslangandir, ya'ni antizardob bilan /antitana/ antigenni o'zaro "yopishishi" tufayli yuz beradi. Hosil bo'lgan agregatlarni oddiy ko'z bilan (yoki bir muncha kattalashtirgan holda) kuzatish mumkin.

**Presipitatsiya reaksiyasi.** Keng qo'lamda qishloq ho'jaligida qo'llaniladigan metodlardan biri bu- tomchi metodi, hamda ammoniy – sulfat metodlaridir. Tomchi metodini amalga oshirish jarayonida o'simlikni tozalanmagan soki bir tomchi antizardob bilan buyum oynachasi ustida aralashtiriladi. Xloroplastlarga, hujayra devorlari – parchalari, mitoxondriyalar va boshka o'simlik komponentlariga yopishgan virus zarralari shu virus antizardobi bilan spesifik ravishda bog'lanib, ko'rinarli darajada pretipitat hosil qiladi. KMD tozalanmagan o'simlik shirasi asosida olib borilgani uchun, yuqori sezgirlikka ega emasdir. Shuning uchun ham u faqat o'simlik bargida yuqori konsentratsiyada to'planadigan viruslarni aniqlashda qo'llaniladi. Ammo zarari katta bo'lgan va bargda kam to'planadigan viruslar



uchun, masalan, VTM, XVKlar (tomat mozaika virusi, kartoshka virusi) uchun bu metod yaxshi natija bermaydi. KMDning, ya'ni tomchi metodining boshqa bir usuli mavjud bo'lib u halqali presipitatsiya usuli deb ataladi. Ushbu virus o'ziga xos antizardob bilan kontaktda bo'lganda presipetatdan iborat halqa hosil bo'ladi. Halqa hosil qiluvchi metod tez amalga oshishiga qaramasdan sezgirliги juda pastdir.

Ammoniy – sulfat metodi /ASM/ KMDga o'hshash usul hisoblanib, faqat ba'zi halaqit qiluvchi xujayra shirasidagi ba'zi komponentlarni avval yo'qotish kerak bo'ladi. Shu sababli ushbu usulda avval hujayra komponentlarini yo'qotish uchun xujayra shirasiga ammoniy sulfat bilan ishlov berilib, keyinchalik sentrifuga qilinish yo'li bilan olib tashlanadi. ASM, KMDga nisbatan juda ham katta afzalliklarga ega emas.

KMDga o'hshash uning mikrovariantli reaksiya turi bu mikropresipitatsiya usuli hisoblanadi (RMP). Bu holatda gidrofob yuzada reagentlar viruslar va antizardob (AS) aralashtiriladi, bug'lanishni oldini olish uchun, ustidan paradin moyi quyilib, aralashtiriladi va 24 soat davomida inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng, olingan natija baholanadi. Bu metodlarni sezgirlik daradasi I mkg/ml dan oshmaydi, reaksiya muddati bir necha soatdan bir necha sutkani tashkil etadi.

### **Diffuzion testlar**

Ko'zga ko'rinadigan presipitatlarni hosil bo'lishi uchun immunodiffuziya reaksiyasi (RID), ikki tomonlama diffuziya reaksiyasi (RDD), immunoelektroforez (IEF) oson hamda sezgir testlar hisoblanadi. RIDni o'tkazish uchun antigen bilan to'ldirilgan agardagi o'yiqchalardan foydalaniladi. O'yiqchalar atrofidagi, ya'ni agar gelida hosil qilingan o'yiqchalar antizardob bilan to'ldiriladi. Shundan so'ng ma'lum muddat inkubatsiya qilinadi (48 soat). Inkubatsiyadan sung, agar geli maxsus bo'yoq yordamida bo'yalsa, hosil bo'lgan presipitat chiziqlar hosil bo'ladi. Izometrik viruslar ancha oson diffuziya bo'ladi va yaxshi farqlanuvchi chiziqlar hosil bo'lishini kuzatish mumkin. Buning

uchun 0,75 % agar geli tayyorlanib, gelda X -ipsimon viruslar diffuziyasi amalga oshiriladi. Diffuziyani yengillashtirish va mahsus presipitatlarni hosil bo'lishini tezlatish uchun virus antigeni sifatida gidrolizlangan virus zarralari ishlatiladi. Buning uchun ba'zi kimyoviy moddalardan foydalanish mumkin. Masalan, piridin, pirrolidin, farmonid, mochevina, natriy dodesilsulfat kabilar yoki ultratovush, termodenaturatsiya kabi fizik ta'sirlardan foydalanish mumkin. Natijada virusni to'la dezgodatsiyasi qilish mumkin. Ushbu jarayondan so'ng, virus kapsidining oligamerlari /D- protein/ hosil bo'ladi va ular pretseptatsiya reaksiyasini amalga oshiradi. Ko'pgina holatlarda D - proteinlarning immunohimiyaviy o'ziga hosligi birlamchi nativ virusnikidan farq qiladi. Natijada denaturatsiya bo'lgan virus pretseptatsiya chizig'ini hosil qilmaydi. Ushbu holatni dezgodatsiya qilingan VSHI, XVK , BK kabi viruslarda kuzatish mumkin. RDD da agar AS bilan shimdirilmaydi, presipitatni hosil bo'lishi virus antigeni gamologik antizardoblar bilan to'latilgan o'yiqchalar orasida hosil bo'ladi. Yuqorida qayd etilgan metodlarda, jumladan RID va RDDlar qo'lanilganda ba'zi muammolar kelib chiqadi. Masalan, RIDning sezgirligi RDDdan ancha yuqoridir. Bu holat XVK virusi aniqlanganda yaxshi ko'rinadi. RID usuli yordamida XVK virusini aniqlanish miqdori 1,0 mkg/ml tashkil etsa, RDDda esa bu ko'rsatgich 10mg/mlni tashkil etadi. XVK virusi D proteinini RID asosida va RDDi yordamida aniqlab, RMPka metodiga solishtirilsa, RMK ning ancha sezgirligini ko'rish mumkin. Bunda RMPning sezgirligi 0,5mkg/mlni RIDniki - 1,0 mkg/ml va RIDniki esa 10mkg/mlni tashkil etdi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, yuqoridagi usullarning sezgirligi qator faktorlarga bog'liq bo'ladi. Bunda virus va antitana komponentlari muhim rol o'ynaydi. Ya'ni ularning tozalik darajasi, ishlatilayotgan moddalar konsentratsiyasi, nospesifik jarayonlar shular jumlasidandir.

Barcha reaksiya sharoitiga ta'sir etuvchi omillarni hisobga olgan holda, aniqlanayotgan antigen virusini aniqlanish darajasini 1 - 2 mkg/mlga ko'tarish mumkin. Bunda ishlatilayotgan

antizardob yuqori titrga ega bo'lishi kerak. Ushbu usulga bir necha omillar ta'sir etishi mumkin. Masalan, o'yiqchalar hajmi, ular orasidagi masofa, detergentning konsentratsiyasi va agarning tozalik darajasi shular jumlasidanlr.

Yuqorida ko'rsatilgan misollardan ko'rinib turibdiki, RID va RDD yordamida turli antigenlarni, shu jumladan o'simlik viruslarini serologik jihatdan tahlil qilish mumkin. 90mmli Petri likopchasida 500-600ta namunani joylashtirib, kerakli natijani olish mumkin.

Barcha immunodiffuzion testlarni amalga oshirish va testning aniqlik darajasi, antigen va antitanani diffuziyalanishiga bog'liq bo'lib, diffuziyalanish qanchalik yuqori bo'lsa, test natijasi shunchalik aniq bo'ladi. Testni borishida paydo bo'ladigan noaniqlik, nospesifik reaksiyalar yuz berishiga bog'liqdir. Ya'ni bunday holatda, ba'zida maxsus bo'lmagan reaksiya turlari amalga oshib, yolg'on musbat pretseptitsiya zonalarini hosil bo'lishiga olib keladi (komponentlarni denaturatsiyasi asosida hosil bo'ladigan ba'zi komponentlar, shuningdek, turli "tikuvchi" va "yopishtiruvchi" agentlarni bo'lishi).

### **Agglyutinatsiya reaksiyalari**

(Lateks -test LT) Yana bir ancha keng tarqalgan testlar gruppasiga agglyutinatsiya reaksiyalariga asoslangan testlar guruhini kiritish mumkin. Agar birorta "olib yuruvchi tashuvchi"- (lateks, bentonit, bakteriya xujayralari, eritrotsit va hakoza) AS bilan sensibilizatsiya qilingan bo'lsa va tashuvchi gomogen suspenziyasiga virus solinsa, bunda har xil razmerli agregatlar hosil bo'lishi kuzatiladi. Masalan, polistrol lateksga asoslangan agglyutinatsiya reaksiyasi yordamida fitoviruslar aniklangan. Bunda 0,31 mkm razmerli lateks zarrachalari immunoglobulin fraksiyasi bilan sensibillanadi. So'ngra bu diagnostikumni bir tomchisi shisha plastinka yoki kapillyarda bir tomchi o'simlik shirasi bilan aralashtiriladi, hamda maxsus aralashtirgichda chayqatiladi. Agar musbat reksiya bo'lsa, lateks zarralari

agglyutinatsiyasi kuzatiladi. Reaksiya natijasini oddiy ko'z bilan yoki mikroskopni kichik ob'ektivida (kattalashtirilgan holatda) ko'rish mumkin. Ushbu jarayonning amalga oshirish muddati ancha kam vaqtni ya'ni 10-60 minutni tashkil etadi. Lateks testni takomillashtirilgan formasi ham mavjud bo'lib, u oltin, ya'ni tilla kabi sariq yaltiroq stafilokokkni A-oqsili asosida boradigan reaksiya turidir. Lateks-test reaksiyasida- lateks zarrasi A-stafilokokk oqsili bilan, keyin esa antizardob bilan aralashtirilib, reaksiya qo'yiladi. Bunda ushbu usul bilan ba'zi viruslar diagnostika qilinganda, uning sezgirligi 2-16 ga ko'tarilishi aniqlangan. Bunda ushbu usulning sezgirligini oshishini quyidagicha izohlash mumkin. Birinchidan, lateks A oqsil bilan sensibilizatsiya qilinsa, oqsil unga yaxshi birikadi va uning birikish miqdori boshqa oqsillarga qaraganda ancha ko'p miqdorni tashkil etadi. Ikkinchidan lateksga nisbatan, xaos bo'lib joylashgan antitananing aktiv markazlari tashqi tomonga yunalgan holatda joylashadi. LT ning yukori sezgirligi, tezligi, past titrga ega zardoblarni qo'llash mumkinligi, LTni faqat laboratoriyada o'tkaziladigan ilmiy tadqiqot ishlarida emas, balki, dala sharoitida olib boriladigan ba'zi ishlarda ham qo'llash imkonini beradi. Uning yordamida kartoshkani X, Y viruslarini 4-10 minut ichida aniklash mumkin. Bentonit flokulyatsiyasi testi - /BFT/ spetsefik antitela bilan sensibillangan bentonitni virus zarrasi ishtirokida agglyutinatsiya bo'lishiga asoslangan. Bentonit-oston gidratlanadigan alyumosilikat bo'lib, suspenziya holatida, nospetsefik ravishda oksillirni biriktiradi. Uni sesibillash uchun suyultirilmagan antizardob, ya'ni sulfat ammoniy bilan cho'ktirish natijasida olingan gamma-globulin fraksiyasi ishlatiladi. Reaksiyani amalga oshirish jarayoni, xuddi LTga juda o'xshashdir. Ushbu metod asosida VTM tomatini halka mozaykasi, soya mozaykasi viruslarini toza preparatlari 0,3-1 mkg/ml gacha bo'lgan miqdorini aniklash mumkin.

Noto'g'ri gemmaglomotinatsiya reaksiyasi /RNGA/ fitoviruslar aniklashda ancha kam qo'llaniladi. RNGA odatda kapsid oksilida gemaglyutini bor viruslarni aniklashda

ishlatiladi. Odatda eritrotsit diagnostikum noto'g'ri usulda tayyorlanadi: eritrotsitni ustiga antitelalar polifunksiyali tikuvchi agentlar (gludar dialdegidi, formaldegid, xromxlori, tanin va boshqa moddalar) yordamida "tikiladi". Shundan so'ng unga aniqlanayotgan modda, ya'ni antigen solinadi va ma'lum muddat inkubatsiya qilinadi. Reaksiya jarayoni nihoyasiga yetgandan so'ng, natija tahlil qilinadi. Ushbu usul yordamida VShMYa virus preparati aniklangan bo'lib, uning sezgirligi 0,01 mkg/mlni tashkil etgandir. Bundan shunday xulosa qilish mumkinki, bir qator viruslar uchun RNGA, LTga qaraganda 8-40 marta sezgirroqdir. Sensibillash uchun noorganik va polimeor moddalardan tashqari, ba'zi mikroorganizm xujayralari ham ishlatiladi. Eng keng ko'lamda aktivligi yo'qotilgan tillasimon stafilakokk ishlatiladi. Bunda antizardob va bakteriya xujayralari aralashtirilib, so'ngra ushbu aralashmaga antigen qo'shilsa, yuqori tezlikda agglyutinatsiya reaksiyasi yuz beradi. Avallo, bu metod mikroorganizmlarni serotiplarga ajratishda qo'llanilgan bo'lsa, keyinchalik esa, fitoviruslarni diagnostika qilishda keng ishlatila boshladi. Tillasimon stafilakokni muhim tomoni unda A deb ataluvchi oqsil modda mavjud. A- oqsil ajoyib xususiyatga ega bo'lib, u immunoglobulin molekulalarini Fs-fragmenti bilan bog'lanish xususiyatiga egadir, bunda antitanani antigen bilan bog'lanadigan faol markazi bo'sh qoladi. Bu xususiyat faqat A oqsilga xos bo'lmay, balki ko'pgina mikroorganizmlar oqsillariga ham xosdir. Faqat ular yetarlicha chukur o'rganilmagan. A oqsil esa ancha yaxshi o'rganilgan bo'lib, yetarli ma'lumotlar to'plangan. Ushbu oqsil xujayra devorini tashqi qavatida joylashgan, tekis tarqalgan va immunoglobulinlar bilan /antizardob AS/ boglanishi ancha osondir. Bundan tashqari A-oqsilini toza preparati olingan bo'lib, uning strukturasi va fizika - ximyoviy xususiyatlari o'rganilgan. Reaksiya jarayonida antigen bilan antitanani o'zaro birlashishiga A- oqsil to'sqinlik qilmaydi. Bunda reaksiya davomida Fs- fragmentini A- oksiliga nisbatan "spesifiklikligi"- moyilligi yanada oshadi. A- oqsilining bunday xususiyati va uning mikrobiologik diagnostikada keng ishlatilishi,

shuningdek, fitoviruslarni diagnostika qilishda, yana virobakteriya agglyutinatsiya /ABV-test/ metodini yaratilishida turtki bo'ldi. ABV-testning mohiyati shundan iboratki, bunda 10%li stafilokokk suspenziyasi virus antizardobi bilan bilan aralashtiriladi. So'ngra diagnostika qilinayotgan eritmaning bir tomchisi, masalan, virus preparatining bir tomchisi buyum oynachasi ustida aralashtiriladi. Ma'lum muddat o'tgandan so'ng, esa agregatsiya bo'lgan stafilokokklarni opok cho'kmasi hosil bo'lganligini oddiy ko'z bilan kuzatish mumkin bo'ladi. ABV-test yordamida viruslarni 0,2-0,5mkg/ml gacha aniqlansa bo'ladi. Albatta ushbu usul RIA, FIA va IET usullarining sezgirligidan ancha pastdir, ammo tahlilni ancha oson amalga oshirish mumkinligi, uni amaliyotga keng tadbiiq etish imkonini beradi. Ushbu metod ixtsodiy jihatdan qulay bo'lib, ko'p mablag' talab etmaydi.

Bundan tashqari AS ni 100-200 marta suyultirib ishlatilganda ham, yaxshi natija olish mumkin. Shuning uchun ushbu usul hujayrada juda kam to'planadigan viruslarni aniqlashda keng qo'llaniladi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, yuqorida qayd etilgan diffuzion, agglyutinatsion usullar sezgirliigi jihatidan past hisoblanib, hozirgi kun talabiga javob bermaydi. Shu sababli, sezgir, qulay, zamon talabiga javob beradigan metodlarni ishlab chiqish muhimdir. Biroq sezgirlik darajasi past bo'lgan, yuqorida qayd etilgan ushbu testlar amaliyotda, turli ilmiy tadqiqotlarda, shuningdek ba'zi testlarni nazorat qilishda o'z o'miga egadir. Hozirgi kunda juda katta sezgirlik darajasiga ega metodlarni ishlab chiqishda, immunologik reaksiyalarni amalga oshirishda nishon sifatida radioaktiv izotop modda, fluoressent- zont, DNK-zont, shuningdek, ferment molekulalaridan foydalaniladi. Ayniqsa, ferment molekulalari nishon sifatida keng qo'llaniladi. Sababi, ular bir necha qulayliklarga ega bo'lib, har tomonlama afzal biologik faol moddadir. Avvalo ular inson organizmi va atrof- muhit uchun hech qanday xavf tug'dirmaydigan moddalar hisoblanib, yuqori fermentativ faollikka ega bo'lganligi uchun, reaksiya jarayonini  $10^{12}$  tezlashtirishi mumkin.

## Immunoenzim tahlilining mohiyati

Immunoenzim tahlili 60-yillarni o'rtalarida vujudga kelib, avval, gistologik preparatda antigenni identifikatsiyalash, keyin esa immunodiffuziya va immunoelektroforez testlarida presipitatsiya chiziqlarini aniqlashda qo'llanilgan. Bundan tashqari biologik suyuqliklarda antigenlar va antitelalarni miqdoriy tahlili uchun ishlatila boshlangan. Metodni geterogen usulini ishlab chiqishda Ye.Engvall va R.Perlmann, shuningdek, ularga bog'liq bo'lmagan ravishda V.K. Van Veemen va A.Shuurslar 1971 yili o'z tadqiqot ishlarini olib borganlar va ushbu usulning muallifi hisoblanadilar. 1972 yili esa Ye.K. Rubenshteyn o'z shogirdlari bilan IET gomogen usulini ishlab chiqishga muvaffaq bo'lganlar. Ushbu IET lari usullarini ishlab chiqqan mualliflar aynan, o'z tadqiqot ishlarida va shuningdek, amaliyotda IET talablariga javob bera oladigan ferment molekularini va ularning kofaktorlarini nishon sifatida qo'llab, ko'nyugat olish mumkinligini isbotlaganlar.

Sababi, yuqorida aytib o'tilgandek, fermentlar o'z substratlari ishtirokida kimyoviy reaksiyani  $10^6$ - $10^{12}$  marotaba tezlashtirar ekanlar, shu bilan birga ular antigen va antitanalar o'rtasida bo'ladigan immunokimyoviy jarayonlarning sezgirligini ham bir necha bor oshirib, aniqlanishi kerak bo'lgan modda miqdorini (pkM) juda kichkina qiymatlarda aniqlash uchun kerakli fermentativ reaksiya turini katalizlash imkoniyatga ega moddalar hisoblanadilar. Shuning uchun immunokimyoviy reaksiyalarda, faqat ferment molekulari emas, balki ularning kofaktorlari ham maxsus markerlar sifatida IET ning turli usullarida keng qo'llanilmoqda.

Hozirgi vaktida immunoenzim tahlili (IET) usulining xilma-xil turlari ishlab chiqilgan. IET turli xil moddalarni aniqlash uchun keng qo'llaniladi. Jumladan, dorivor preparatlarni, gormonlarni, antitanalarni, virus va bakterial antigenlarni, oziq-ovqat toksinlarini, fitotoksinlarni, narkotik moddalarni, hamda sifiliz, malyariya taksoplazmoz, alveokok, qizilcha va

gelmintlarni, salmonellezni va kasallik tug'diruvchi mikroorganizmlarni diagnoztika qilishda keng qo'llaniladi. Modomiki, IET antitanalarni aniqlashda ham qo'llanilar ekan, bu esa o'z navbatida ko'p kasalliklarni boshlanish bosqichida oldini olish va serodiagnostika qilish imkoniyatini yaratadi.

IETning asosiy mohiyati shundan iboratki, biokatalizator molekulasi reaksiya ketadigan zonada antigen bilan yoki antitana bilan bog'langan shaklda bo'lishidir.

\Antigen yoki antitananing ferment molekulasi bilan bog'langan shakli kon'yugat deb yuritiladi. IETni o'tkazish vaqtida antigen antitana molekulasi bilan bog'langandan so'ng, ushbu kompleksni aniqlash uchun, fermentning substrati kiritiladi va reaksiya natijasida xosil buladigan mahsulotlar aniqlanadi. Shuni aytib o'tish lozimki, IETda fermentativ reaksiyani deteksiya qilish hosil bo'lgan mahsulotni aniqlash bilan chegaralanmay, balki reaksiyasi natijasida rangli o'zgarish, issiklik ajralish yoki yutilish, flyuretsensiya, paramagnit xususiyatlarni yoki boshka fizik-kimyoviy parametrlarni o'zgarishi natijasida aniqlashni amalga oshirish mumkin.

Hozirgi kunda qo'llaniladigan immunoenzim tahlili metodlarining umumiy ko'rinishini sxematik ravishda quyidagicha izohlash mumkin.

I bosqich. Immun komponent sifatida qo'llaniladigan moddalarni olish.

<i>Oqsillarni yoki makromolekularni modifikatsiyalash</i>	<i>Kon'yugantlarni olish.</i>	<i>Mikroorganizm va viruslarni antigen sifatida qo'llash uchun tayyorlash</i>
---	-------------------------------	---

II bosqich. Antigenlarni ajratish, tozalash modifikatsiyalash.

<i>Immunizatsiya yuli bilan aniq antigenga antitana olish</i>	<i>Kon'yugantlarni sintezi uchun fermentlarni yoki ularning substratlarini, kofaktorlarini yoki ushbu fermentni effektorlarini olish.</i>	<i>Tashuvchilarni tanlash va ularga antigenlarni immobillash</i>
---	---	--

### III bosqich. Antitanalarni ajratish, tozalash va modifikatsiyalash.

Ma'lum antigenga qarshi olingan antitanalarni ajratish va tozalash.	ferment kon'yugatlarini antitana yoki antigen bilan olish.	Immobilangan antigenlarni yoki antitanalarni olish.	Fav fragmentlarni ajratish va ularni modifikatsiyalash va immobilash.
---	--	---	---

### IV bosqich. IET metodlarini ishlab chikish.

<i>IETni o'tkazish usulini tanlash va ishlab chikish.</i>	<i>IETni o'tkazish va olingan natijani aniqlash uchun kerakli asbobni tanlash.</i>	<i>Aniqlanadigan modda uchun kalibrovka tayyorlash va aniqlashni amalga oshirish</i>
---	--	--

IETni o'tkazishda immun komponentlarning tozalik darajasi muhim ahamiyatga egadir. Sababi, IETning sezgirlik darajasi komponentlarga va ayniqsa, unda nishon sifatida qo'llanilayotgan ferment molekulasi faolligiga bog'liq bo'ladi. Antitana serologik jihatdan faol va antigenga nisbatan titri yuqori bo'lishi uchun, antigenning immunogenlik xususiyati yuqori bo'lishi kerak. Shunda antigen kerakli antitanalarning uzluksiz sintezini amalga oshirishga qodir bo'ladi. IETda ishlatilayotgan immun komponentlarning titri yuqori bo'lmasa, ushbu oqsillar modifikatsiyadan so'ng denaturatsiyalanishi hisobiga inaktivlanadi. Zaharli bo'lgan oqsil tabiatli ba'zi moddalar, viruslar, ba'zi mikroorganizmlarni faol bo'lmagan shtammlarini antigen sifatida olish, kon'yugatlarini kimyoviy sintezida ijobiy natija bermaydi. Shu sababli antigen antitanalarni ma'lum manbadan ajratish va ularni tozalash va kalibrovka egri chiziklarini tayyorlash talab etiladi. Antitanalarni tozalashda biosferik xromatografiya usuli yordamida amalga oshiriladi. Buning uchun avvalo biospesifik va immunosorbentlar sintez yo'li bilan olish zarur. Ushbu immunosorbentlar faqat immun komponentlarni tozalash uchungina ishlatilmay, balki

IETning geterogen variantlarini ishlab chiqishda ham keng qo'llaniladi. Immunosorbentlar olish uchun immobilizatsiyalangan antigen yoki antitanalarni sintezlash zarur. Sababi, geterogen IET qattiq tashuvchi yuzasida olib boriladi.

IETni qaysi usuli amalga oshmasin unda albatta nishon sifatida ferment molekulari ishlatiladi. Shu sababdan avvalo antigen yoki antitana kon'yugati sintezlanadi. Buning uchun antigenga nisbatan aniq spesifik bo'lgan antitana tikuvchi komponent bilan modifikatsiyalanadi ya'ni antitana ferment molekulasiga kimyoviy (kovalent) bog'lanadi. Kimyoviy sintezlangan kon'yugatlarining fermentativ va serologik faolliklari aniqlanadi. Kon'yugatlar tahlilni o'tkazish uchun yaroqli bo'lsa, nihoyat so'ngi bosqichda IET o'tkaziladi. Olingan ma'lumotlar kerakli asboblar yordamida tahlil qilinadi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, immunoenzim tahlilini o'tkazishda bir qancha qoidalarga rioya qilish talab etiladi.

### **Immunoenzim tahlilini amalga oshirish qoidalari**

Immunoenzim tahlilini ishlab chiqishda, yaratishda bir qator qoidalarga rioya qilish kerak. Birinchidan aniqlanayotgan moddani, ya'ni antigeni taxlil qilishda yukori darajada mos keladigan, unga o'ta spesifik bo'lgan antitanalarni tanlab olish talab etiladi. Ikkinchidan shunday fermentni nishon sifatida ishlatish uchun tanlab olish kerakki, u antigen yoki antitana bilan shuningdek, tashuvchi bilan kimyoviy usulda bog'langanda ham, o'z xususiyatini o'zgartirmasligi va bir vaqtning o'zida antigen va antitana o'rtasida kechadigan immunologik reaksiyaga ta'sir kilmasligi va ayniqsa, fermentativ faolligini saqlab qolishi kerak. Uchinchidan, IETni o'tkazishda qo'llaniladigan reagentlar va asbob uskunalari

shuningdek, immun komponentlarni immobillash uchun ishlatiladigan tashuvchilar har tomonlama qulay va iqtisodiy jihatdan talabga javob beradigan bo'lishi lozim. Nihoyat ahamiyatli omillardan yana biri, IETda komponentlarni barqarorligini ta'minlash muhimdir. Bunda yuqori barqarorlikka ega bo'lgan komponentlarni olish uchun tikuvchi agentlar yordamida tashuvchilarga immobillash jarayonini amalga oshirish yordamida erishish mumkin. Immunoenzim tahlilini, asosan ikkita katta usulga ajratish mumkin: geterogen va gomogen usullarga.

IETning geterogen usuli qattiq tashuvchi ishtirokida olib boriladi Bunda immun kompleks tashuvchiga immobillangan antitana yoki antigen va ferment bilan nishonlangan antitana yoki antigen bilan immun kompleks hosil qiladi va immun reaksiya amalga oshgandan so'ng, fermentativ faollikni o'lchash orqali antigen miqdori kalibrovka chizig'i yordamida aniqlanadi.

IETning gomogen usulida esa, barcha jarayonlar suyuq muhitda, ya'ni qattiq tashuvchi ishtirok etmagan sharoitda olib boriladi. Immun kompleksni registratsiya qilish jarayoni katalitik yoki ferment reaksiyalari ketishi bilan bog'lik o'zgarishlar asosida amalga oshiriladi. Yuqorida qayd etilgan ikkala usul uchun ham umumiy talab shundan iboratki, antigen yoki antitanalarni standart eritmalari asosida oldindan kolibrovka chizigini yaratish kerak bo'ladi. Chunki, aniqlanayotgan modda miqdorini aniqlash, IET natijasini tahlil qilish ana shu kolibrovka asosida ko'rsatib beriladi.

### **Immunoenzim tahlilida ferment effektorlarini qo'llash**

Biror antigenni aniqlashda nishon sifatida ferment molekulalarini, shuningdek, aktivatorlar va ingibitorlarni

qo'llab IETni o'tkazish, yukorida aytib o'tilgan ikkita metod prinsiplari asosida olib boriladi. Biroq, har bir fermentning faollovchi effektorlari soni ko'p bo'lganligi va ular xilma-xil tabiatga ega ekanligi uchun, effektorlarni IETda qo'llash bir oz qiyinchilik tug'diradi. Bunga qaramay effektorlar IET ning bir necha usularida qo'llaniladi. Bunda birinchi navbatda antigen va antitana kon'yugati sintezlanadi va immunologik jarayon bir necha bosqichda olib boriladi.

Antigen o'z navbatida effektor bilan birga bog'lansa, aktivlash xususiyatiga ega bo'lgan (yoki ingibirlovchi) kompleks yoki kon'yugat hosil kiladi. Bunda effektor bilan bog'langan antigen va aniklanishi lozim bo'lgan antigen, antitela bilan bog'lanish uchun bir-biri bilan raqobatlasha boshlaydi. Immun reaksiyasi o'tkazilgandan so'ng, eritmaga ferment va ferment- substrati aralashmasi solinadi. Immunokimyoviy reaksiyaga kirishgan effektor, ferment aktivligiga ta'sir qila olmaydi. Bir vaqtning o'zida ferment bilan bog'langan effektor ferment aktivligini oshiradi ( agar u aktivator hisoblansa). Aniklanayotgan namunada antigen miqdori qancha ko'p bo'lsa, antigen bilan bog'langan effektor ta'siriga boglik bo'lgan ferment faolligi ham shuncha katta bo'ladi.

Agar effektor aktivator emas, balki ingibitor bo'lib hisoblansa, reaksiyon sistemada aktivlikni kamaytirish bilan birga, namunadagi aniqlanayotgan antigen miqdorining kamayishi kuzatiladi.

IETda ferment substratlarining ham roli katta. Ko'pincha IETda ishlatiladiga ferment molekularining substratlari suvda yaxshi eriydigan moddalar bo'ladi. Ammo bir kator fermentlar polimolekular yoki polimolekular assotsiatsiyalar tashkil kilgan substratlarga ta'sir kiladi. Bunday hollarda substrat hosilalarining kattaligi ferment molekulari kattaligidan katta va xatto immun komplekslarni o'zidan ham katta yoki ularga teng

bo'lishi mumkin. Bunday hollarda immun reaksiya o'tkazilgandan keyin, ferment o'z substratlari bilan ta'sirlanish qobiliyatiga ega bo'lmay qoladi. Ushbu metodda antigen va antitana immun komponentlarining ferment bilan olingan kon'yugatlarini qo'llanilishi mumkin.

IETni titrlash usuli yordamida biror modda, masalan antitana aniqlanishi lozim bo'lsa, bunda nishonlangan antigenlar qo'llanilib, bunda antigen kon'yugatini antitana bilan titrlash orqali kon'yugatni berilgan miqdoriga ekvivalent antitana konsentratsiya aniqlanadi. So'ngra antitanaga aniklanayotgan antigen mavjud namuna qo'shiladi. Nishonlanmagan antigen antitelalar bilan bog'lanadi. Xuddi shu namunaga antigen ferment kon'yugatining dastlabki miqdori qo'shiladi. Bynda birinchi immun reaksiya o'tkazishda antitanani sarflanishi xisobiga nishonlangan kon'yugatning birki erkin koladi. Xuddi ana shu erkin qolgan kon'yugat immun komponent bilan o'zaro ta'sirlashish qobiliyatiga ega bo'ladi. Bundan shunday xulosa etish mumkinki, tekshirilayotgan eritmada qancha antigen ko'p bo'lsa, ferment faolligi shuncha yuqori bo'ladi. Shuni ta'kidlamoq kerakki, ushbu metodning hamma bosqichlari ham gemogen sharoitda olib borilmaydi. Ko'pincha substratlar suvli eritmalarda geterogen sistemani hosil kiladi. Shunday kilib, so'ngi bosqich mohiyatiga ko'ra geterogen fermentativ jarayonni tashkil etadi. Yuqorida keltirilgan misollardan shunday xulosa qilish mumkinki, IET usullari to'rtta asosiy prinsip asosida amalga oshiriladi: 1. Titrometrik usul 2. Raqobatlashish 3. "Sendvich" va 4. Ekranlashtirish prinsipi. Bulardan har biri IET ning geterogen va gomogen usullari yordamida olub boriladi.

## 2. IMMUNOENZIM TAHLILINING USULLARI

### *Immunoenzim tahlilining titrometrik usuli*

IETning titrometrik prinsipi bir necha bosqichda amalga oshiriladi. Birinchi bosqichda, aniqlanayotgan antigen va antitanalar o'rtasida immunkimyoviy reaksiya amalga oshadi, reaksiyaning keyingi bosqichida esa, reaksiyon muhitga erkin holdagi antigen qo'shiladi. Shundan so'ng, nishonlangan ferment molekulasi reaksiyon muhitga kiritiladi. Birinchi bosqichda immun reaksiya natijasida antigen immobilizatsiyalangan holatdagi antitanalarni bir qismi bilan bog'lanadi. Bog'lanmagan komponentlar immobilizatsiyalangan antitanalar bilan bog'lanishga harakat qila boshlaydi, shunda reaksiyon muhitga fermentni oldindan aniqlangan miqdordagi kon'yugatlar qo'shiladi.

Kon'yugatni miqdori shunday tanlab olinadiki, u namunadagi immobilangan antitanalar miqdoriga ekvivalent bo'lishi kerak. Ikkinchi immun reaksiya o'tkazilganda, namunaga qo'shilgan konyugat antigenlardan bo'sh qolgan, immobilangan antitanalar bilan bog'lanadi.

Ya'ni antigenlardan bo'sh qolgan antitanalar kon'yugatlar bilan titrlanadi. Ferment molekularini miqdorini shu ferment substrati bilan reaksiya o'tkazish orqali, ferment faolligini aniqlash amalga oshiriladi. Kon'yugatning fermentativ faolligini o'lchash jarayonida faollik qancha kam bo'lsa, namunada aniqlanayotgan antigen miqdori shuncha ko'p bo'ladi. Bordini, reaksiya mahsulotini hosil bo'lishi kam miqdorda bo'lsa, u holda (antigen umuman bo'lmagan kontrol tajribaga nisbatan) aniqlashning alternativ usuli qo'llanilib, ikki immun reaksiya o'tkazilgandan so'ng, ferment

kon'yugatining faolligi farqi asosida antigen miqdori aniqlanadi.

Namunada antigen miqdori qancha ko'p bo'lsa, bu holda kon'yugat faolligining farqi shuncha ko'p bo'ladi. Hosil bo'lgan fermentativ reaksiya mahsuloti yoki reaksiyaga kirishmay qolgan substrat miqdori biror bir sezgir va qulay metod yordamida aniklanadi. Ko'p holatlarda, ko'pincha bo'yovchi moddalar ishlatiladi. Buning natijasida fermentativ reaksiya mahsulotining rangi o'zgaradi va bu o'zgarish o'z navbatida aniqlanayotgan namunada antigenni borligidan dalolat beradi. Ushbu usul insulinni aniqlashda muvaffaqiyatli qo'llanilgan.

### **Raqobatlashish prinsipi**

Ushbu prinsip immunkomponentlar bilan ferment kon'yugati o'rtasida boradigan raqobatga asoslangan. Bunda immobillangan antitanaga bog'lanish uchun antigen va aynan shu antigen kon'yugati raqobatlashadi. Immun reaksiyani o'tkazish uchun avval, immobilizatsiyalangan antitana mavjud inkubatsion muhitga aniqlanayotgan antigen va antigen ferment kon'yugati eritmasi solinadi. Aniqlanayotgan namunada antigenlar miqdori kancha ko'p bo'lsa, nishonlangan ferment antigeni va aniklanayotgan antigen orasida antitanalar bilan bog'lanish rakobati shuncha /konkurensiya/ oshadi.

Bunda bog'lanuvchi kon'yugat molekulalarini fermentativ faolligi qancha kam bo'lsa, namunadagi antigen miqdori shuncha ko'p bo'ladi. Raqobatlashish prinsipi turli biologik moddalarni, masalan tiroksinni, globulinni, ditoksin kabi moddalarni va boshqa turli antigenlarni aniqlashda keng qo'llaniladi.

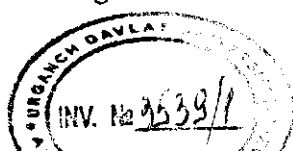
## "Sendvich" prinsipi

Yuqorida qayd qilingan prinsiplar ferment kon'yugatlari va antigen o'rtasida boradigan immun reaksiyalarga asoslangan bo'lsa "Sendvich" prinsipi esa aniklanayotgan antigenni bir vaqtda, aynan shu antigenga qarshi olingan antitana, hamda antitana kon'yugatlarini o'zaro ta'sirlashiga asoslangandir. Ushbu usulda titrlash prinsipiga o'xshash immun reaksiyasi bir necha bosqichda amalga oshiriladi.

Biriichi bosqich immobillangan antitanalarning bir qismi aniklanayotgan antigen molekulari bilan bog'lanadi. So'ngra tashuvchi yuvib tashlanadi. Tashuvchi yuzasida antigen-antitana kompleksi qoladi. Shundan keyin kompleks ustiga ferment bilan nishonlangan antitana kon'yugati qo'shiladi. Ferment kon'yugatlari antigen molekulasi mavjud kompleks bilan bog'lanadi. Ushbu jarayonda aniqlanayotgan namunadagi antigenlar qancha ko'p bo'lsa, ferment bilan nishonlangan antitanalar kon'yugatining fermentativ faolligi shuncha ko'p bo'ladi. Ya'ni ferment substrati bilan reaksiya o'tkazish bosqichida uning mahsulot hosil qilish tezligi yuqori bo'ladi. Imobillangan antitana va ferment bilan bog'langan antitanalar orasida siqilgan antigen kompleksi "sendvich" hosil qiladi va shu sababli ushbu prinsip "sendvich" deb yuritiladi. Hozirgi vaktida "sendvich" prinsipi turli xil antigenlarni aniqlashda immunoenzim tahlilida keng miqyosda qo'llanilmokda.

## Ekranlashtirish / to'sish / prinsipi

Substratlarni o'z fermentlariga yoki aksincha fermentlarni substratlari o'rtasida bo'ladigan reaksiyalar, nishonlangan antigen-antitana va ferment komponentlari orasidagi immun reaksiyasini o'tishi natijasida o'zgarishi



mumkin. Immun reaksiya ketayotgan muhitda antigen-antitana komplekslari hosil bo'lgandan so'ng, bog'langan holdagi ferment molekulalarini antigen yoki antitanalar to'sadi. Bunday sharoitda ferment molekulasi o'z substratining ta'siri natijasida namoyon bo'ladi. Xuddi ana shu jarayonga immunoenzim tahlilining bir qator prinsiplari va usullari asoslangan.

Ushbu ekranlashtirish prinsipining birinchi bosqichida aniqlayotgan antigen, antitana bilan o'zaro immun reaksiyasiga kirishadi. Buning natijasida bir qism antitanalar antigen bilan bog'lanadi. So'ngra muhitga ferment bilan nishonlangan antigen kon'yugatlarini kiritiladi. Reaksiya natijasida ortib qolgan antitana, antigen kon'yugatlarini bilan boglanadi va ferment molekulasi bir kismini substrat bilan ta'sirlashtirishdan to'sadi. Ushbu prinsipni qo'llash samara berishi uchun supersubstratlarni gidrolizlovchi yoki boshqacha aytganda katta substratlarni, masalan lipid, fosfolipidlarga ta'sir etuvchi ferment molekulalari nishon sifatida ishlatilganda yaxshi natija olish mumkin.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, aniqlanayotgan namunada antigen qanchalik ko'p bo'lsa, erkin holda qolgan antitanalardan fermentni to'silishi shuncha kamayadi. Ya'ni bunda fermentativ faollik aniqlanayotgan namunadagi antigenlar miqdoriga proporsional bo'ladi. Ekranlashtirish prinsipini katta antigenlarni aniqlashda qo'llash, masalan turli virus antigenlarini aniqlashda ishlatish yaxshi natija berishi amaliyotda kuzatilgan.

### 3. IMMUNOENZIM TAHLILINI O'TKAZISHDA QO'LLANILADIGAN TURLI YONDASHISHLAR

Yuqorida aytib o'tilganidek, IETning metodlari antitanani antigen bilan spesifik bog'lanishiga asoslangandir. Bunda komponentlardan biri ferment bilan nishonlanib, ma'lum xromogen substrat bilan reaksiyaga kirishadi. Reaksiya natijasida olingan ma'lumotni spektrofotometrik usul bilan yoki bo'lmasa hosil bo'lgan rangli mahsulot asosida vizual ravishda aniqlash mumkin bo'ladi (1-rasm).

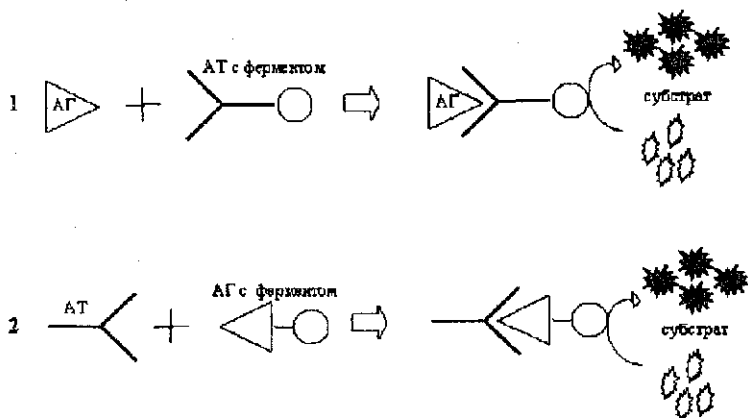
Antigen va antitanalarni turli tashuvchilarga bog'lash imkoniyatini mavjudligi, immobillangan immun komponentlarni immunoenzim tahlilining geterogen usullarida keng ishlatilish mumkinligini ko'rsatdi.

Monoklonal antitanalarni olish texnologiyasini ishlab chiqilishi esa, IET ni keyingi rivojlanishiga xizmat qildi, bu esa o'z navbatida uning spesifligi, sezgirligini va aniqlash darajasini yanada oshirish imkonini berdi. IET nazariy jihatlarini zamonaviy immunoximiya, immunobiotexnologiya va enzimologiya ma'lumotlariga, shuningdek antigen-antitanalar o'rtasida boradigan immunologik reaksiyalarning reaksiyasining fizik-kimyoviy qonuniyatlariga va analitik kimyoni asosiy prinsiplariga asoslangan.

IETning sezgirligi va uni o'tkazilish jarayoni bir necha asosiy omillar bilan jumladan, antigen-antitana reaksiyasini kinetik, termodinamik xarakteristikalariga, reagentlar nisbati, fermentning faolligi va uni deteksiya qilish metodlarining xususiyatlariga bog'liq bo'ladi. Umuman olganda, antigen-antitana o'rtasidagi reaksiyani sxematik tarzda quyidagicha tavsiflash mumkin:



Pastmolekular birikmalardan va yuqori murakkabroq tuzilishga ega virus va bakteriyalargacha bo'lgan xilma-xil tadqiqot ob'ektlarini IET yordamida aniqlash, ushbu metodni nihoyatda ko'p variantlarini ishlab chiqilishini taqozo etadi.



*2-rasm. Immunoenzim tahlili asosida antigen va antitanalarni aniqlash jarayonining sxematik ko'rinishi*  
 1-antigenlarni aniqlash;  
 2-antitanalarni aniqlash

IETda kon'yugatlarni sintez qilishda tahlil uchun har tomonlama mos fermentlardan foydalaniladi. Bunda nishon sifatida qo'llanilishi mumkin bo'lgan fermentlar eritma tarkibida o'zining faolligini namoyon qilishi kerak. Sababi, fermentning fermentativ faolligi qancha yuqori bo'lsa, sezgirlik ham shuncha oshadi. Shu sababdan, IETda nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlarga quyidagi talablar qo'yiladi:

1) Kichik konsentratsiyadagi molekullarni aniqlash uchun qo'llaniladigan ferment yuqori spesifiklikka va fermentativ faollikka ega bo'lishi kerak;

2) Nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlar kimyoviy modifikatsiyadan so'ng, yuqori fermentativ faollikka ega bo'lishi kerak;

3) Fermentlar antigen va antitanalar ta'sirida, shuningdek, ular bilan kimyoviy bog' hosil qilganlarida ham, o'z barqarorliklarini yo'qotmasligi zarur;

4) ferment faolligini aniqlash usuli sodda va yuqori sezuvchanlik darajasiga ega bo'lgan usul bo'lishi kerak;

5) ferment preparati rangli mahsulot berishi kerak. Sababi IFAni miqdor, sifat jihatdan tahlil qilish mumkin.

IET da 15 xildan kam bo'lmagan fermentlar ishlatilishi mumkin. Yuqorida aytib o'tilgan talablarga javob bera oladigan va ko'p qo'llaniladigan ferment – xren peroksidazasi, ishqoriy fosfotaza va  $\beta$ -D-galaktozidaza, amilaza kabi fermentlar hisoblanadi. Ushbu fermentlar barqaror, yuqori fermentativ faollikka ega bo'lib, fermentativ reaksiya amalga oshgandan so'ng, rangli mahsulot hosil qiladi. Bu esa o'z navbatida katalizdan so'ng, aniqlanayotgan antigen haqida, sifat jihatdan tahlil qilish imkonini beradi. Bundan tashqari, shu fermentlar bilan katalizlanadigan reaksiyalar natijasida olinadigan mahsulotlar ishlatilayotgan substratga qarab nafaqat kolorimetrik metodlar, balki fluoressent metodlar bilan ham aniqlanishi mumkin. Boshqa fermentlar nisbatan kam ishlatiladi. Bu esa ularning xren peroksidazasi va ishqoriy fosfotazaga nisbatan ancha past solishtirma faollikka egaligi va ayniqsa IET talablariga to'liq javob bermasligi bilan xarakterlanadi.

#### *Substratlar*

Substratni tanlash birinchi navbatda nishon sifatida ishlatilayotgan ferment bilan belgilanadi, chunki ferment-substrat reaksiyasi yuqori spesifikdir.

Substratga qo'yiladigan asosiy talablar quyidagilardan iborat:

-kon'yugat fermentativ faolligini aniqlashda metodni yuqori sezgirligini ta'minlash;

- ferment-substrat reaksiyasining aniq ko'rish mumkin bo'lgan (masalan, bo'yalgan) reaksiya mahsulotlarini hosil qilishi;

- ferment substrati xavfsiz, arzon va ishlatish uchun qulay bo'lishi;

#### **Immunoenzim tahlilini o'tkazish bosqichlari**

Immunoenzim tahlilining barcha mavjud variantlari quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi:

1)immun reaksiyani o'tkazilishi: immun reagentlar (ulardan biri ferment nishonni o'zida tutadi)ni bosqichma-bosqich yoki

birdaniga qo'shish natijasida immunokimyoviy kompleksni olinishi;

2) bog'lanmagan komponentlardan xalos bo'lish maqsadida qattiq fazani yuvilishi;

3) fermentativ reaksiyani o'tkazilishi; bu jarayon substrat eritmasini (yoki substrat va xromogen) qo'shish bilan boshlanib, so'ng jarayonni to'xtatadigan-reagentni kiritish bilan to'xtatiladi;

4) olingan natijalarini tahlil qilish;

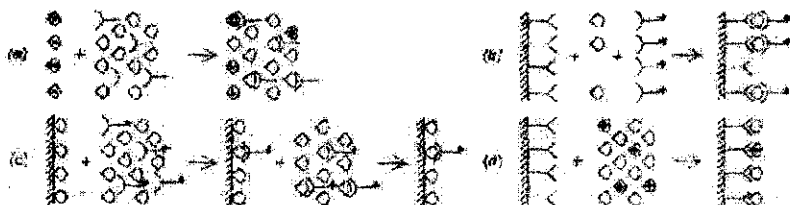
5) tahlil natijalarini baholash.

Shuni qayd etish lozimki, gomogen tahlilda ikkinchi bosqich o'tkazilmaydi.

### Immunoenzim tahlili metodlarining klassifikatsiyasi

IET usullari klassifikatsiyasi haqida so'z borganda uning barcha metodlarini geterogen va gomogen usullarga asoslanganligini ta'kidlash joizdir. Bunga ko'ra, tahlilning geterogen usulga asoslangan barcha bosqichlari qattiq faza ishtirokida, gomogen usullari esa, faqat eritmada olib boriladi (1-rasm).

Umumiy holda esa, har qanday immunokimyoviy tahlilning biron bir usuli asosida aniqlanayotgan birikmaning o'ziga xos antitana bilan spesifik kompleks hosil qilib bog'lanishida, ularning faol markazlari muhim rol o'ynashini hisobga olish lozimdir. (Hro, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988; Rongen et al, 1997).



3-rasm. IET usullarining klassifikatsiyasi.

- antitana
- antigen
- nishon
- a) gomogen raqobatli immunotahlil
- v) geterogen immunotahlil
- g) geterogen raqobatli immunotahlil
- d) geterogen raqobatli immunometrik tahlil

IETning barcha usullari, ularning sezgirlik darajasi tahlilning birinchi bosqichidayoq foydalaniladigan reagentlar tipiga bog'liq bo'lishi mumkin. Agar birinchi bosqichda sistemada faqat tahlil qilinayotgan modda va unga mos keluvchi bog'lanish markazlari (antigen va spesifik antitana) ishtirok etsa, bunday usul raqobatsiz usul (nokonkurent) hisoblanadi. Agar birinchi bosqichda sistemada bir vaqtning o'zida tekshirilayotgan modda va uning (tekshirilayotgan birikma ferment bilan nishonlangan yoki qattiq fazada immobillangan aniqlanayotgan modda) spesifik bog'lanish markazlariga bog'lanuvchi raqobatchi analog ishtirok etayotgan bo'lsa, bu metod raqobatli usul (konkurent) hisoblanadi. Raqobatli usullar reaksiya muhitda antigen va antitana spesifik bog'lanish markazlariga nisbatan bog'lanish uchun raqobatlashadigan biron bir analog bo'lgandagina mavjud bo'ladi.

Geterogen IET ikki fazali sistemada olib boriladigan usullarni birlashtiradi, bunda fazalardagi ajralish tahlilning turli bosqichlarida sodir bo'lishi mumkin. Geterogen usullar turli fazalarda joylashgan nishonlangan birikma asosida hosil bo'lgan kompleksning bo'linish bosqichlarini o'z ichiga oladi.

Geterogen usullarga erkin va bog'langan nishonlangan reagent immun kompleksining ajralishi immobillangan reagent bilan qattiq faza ishtirokida amalga oshadigan metodlarga kiradi. Shuningdek, ushbu usul sistemaga qo'shimcha komponentlarni: tuzlar, polietilenglikol, spirt, ikkilamchi antitelalar, A oqsilni kiritish orqali immunokomplekslarni cho'ktirish yo'li bilan ham amalga oshiriladigan metodlar ham kiradi.

Birinchi spesifik reagentning qattiq fazaga bog'lanish jarayoni fizik sorbsiya, kovalent bog'lanish yoki ushbu usullarni birgalikda qo'llanilishi yo'li orqali amalga oshirilishi mumkin. Qattiq fazadagi spesifik reagentning fizik sorbsiyasi gidrofob, donor - akseptorli bog'lanish yoki vodorod bog'lanishlar hisobiga hosil bo'ladi, qattiq fazaning manfiy sirt zaryadi kattaligi elektrostatik adsorbsiyaning mavjudligini ko'rsatuvchi intensivlik bilan belgilanadi.

IETda qo'llaniladigan turli tipdagi immunosorbentlar mavjud bo'ib, ularni taqqoslash muhim ahamiyatga egadir. Biomaterial va polimerli tashuvchilarni tahlilda qo'llanilishi bir muncha afzalliklarga ega ekanligi, tadqiqotchilar tomonidan, ishlatilayotgan tashuvchilarni taqqoslash yordamida ko'rsatib berilgan.

Mualliflar tomonidan, tahlilda plastik qattiq faza tashuvchi sifatida qo'llanilganda diazobirikish orqali immunosorbent bilan komponentlar orasida bog'lanish sodir bo'lishi aniqlangan.

Tahlilning sezuvchanligi sorbsiyalangan oqsilning miqdoriga, qattiq tashuvchining tabiatiga va spesifik reagentga bog'liq bo'ladi. Tashuvchi sifatida ishlatilgan shariklar, probirkalar va boshqa ko'rinishdagi polipropilen, polistrirol va boshqa silliq polimerli sirtlarga ega qattiq tashuvchilar qoniqarli darajadagi sorbsion sig'imga egaligi ma'lum va ular o'rtacha 1,5 - 4,0 ng/mm qiymatga egaligi adabiyotlarda qayd etilgan. Yanada yuqori sorbsion sig'imga ega bo'lish, umumiy sirtni orttirib borish hisobiga va suspenziyalarni qo'llash orqali erishiladi. Juda ham katta sorbsion afzallikka nitrotsellyuza yoki poliamiddan tayyorlangan porali membranalar misol bo'lishi mumkin.

Fizikaviy adsorbsiya qilish usullarining asosiy kamchiliklari tahlilni o'tkazish jarayonida immun komponentlarni desorbsiyalanishi hisoblanadi. Shu sababli ba'zi molekular massasi yuqori bo'lgan oqsillar, oligopeptidlar va xattoki gaptenlar uchun tashuvchining sorbsion sig'im qiymati muhim rol o'ynaydi. Bu kamchiliklarni spesifik reagentni qattiq fazaga kovalent bog'lash hisobiga, tahlilda katta sorbsion sig'imga ega

tashuvchini qo'llash hisobiga yo'qotish mumkin. Bordiyu tashuvchida faol reaksiya guruhlar mavjud bo'lmasa, u holda polistirol singari tashuvchi polimerlarga amino -, gidrazido – yoki diazo – guruhlar tipidagi yangi reaksiya guruhlar kiritiladi. Kapron yoki neylondan iborat qattiq fazalar amid guruhlariga ega bo'lib, ularni faollashtirish onorganik kislota yordamida, suv xammomida 45<sup>o</sup>S haroratda 48 soat davomida olib borilishi ma'lum.

Meshandina A.G., Shmakova S.V (1994)larning sharhlarida qattiq bioligandlarni yaratishdagi xemosorbsiya jarayonlarining xususiyatlari tahlili ko'rsatilgan va shu bilan birga polimerli immun tashuvchilarning, jumladan, azobirikish metodidan foydalanish yordamida ligandning polimerli qattiq faza bilan ma'lum temperatura va rNda kimyoviy bog'lanishi, jarayonda qo'llanilayotgan ligandni modifikatsiya qilish orqali sodir bo'lishi asoslab berilgan.

Oxirgi yillarda suyuq va qattiq fazalarni tez va qulay ajratish imkonini beruvchi supermagnitli mikrozarrahalarni qo'llash orqali IET usullari yanada boyitiladi va keng doirada qo'llanilishiga erishildi.

Hozirgi kunda Dynal.Inc. firmasi (AQSh) (Isroil, 1994) tomonidan immun komponentlarga, temir oksididan iborat bo'lgan va ular qobig'ini qoplovchi polistirol, Esherichia coli 0157 yoki Salmonellaga asoslangan, spesifik antitanalarga sezgirlashtirilgan standart monodispersion supermagnitli immunologik businalar (nozik munchoqlar ko'rinishidagi) ishlab chiqilgan.

Businalar patogenlarni, b'zi komponentlarni geterogen sistemalardan tez ajratib olishga mo'ljallangan. Ishlab chiqilgan ushbu metod yuqori yuqori sezuvchanlik va tezlikka ega (metod amalga oshirish 1 soatdan kamroq vaqtni talab etadi, standart metodlarga esa 18 – 24 soat vaqt talab etiladi) va shu bilan birga 1 ml hajmda 100 tagacha patogen hujayralar bo'lgan mikroflorani yuqori sezgirlikda aniqlash imkonini beradi. Bundan tashqari

spesifik antitanalalar mavjud bo'lgan sharoitda boshqa turdagi har qanday mikroorganizmlarni ajratib olish imkonini beradi.

IETni suv va qishloq xo'jaligi mahsulotlarida xlortalonilni yuqori sezgirlikda va spesifiklikda aniqlash mumkin bo'lgan usullari ham ishlab chiqilgan (Lawruk et al., 1995). Mualliflar tomonidan taklif etilgan ushbu usul 1 mkm diametrdagi supermagnitli zarrachalarga immobillangan spesifik antitanalar (quyonning xlortaloniliga qarshi poliklonal antizardobi) ning aniqlanayotgan xlortalonil va N –(pentaxlorfenoksiasetil)-glitsin bilan raqobatli bog'lanishiga asoslangandir. Bunda substrat sifatida 2,3-5,5 – tetrametilbenzidin qo'llanilgan bo'lib, natijalarni aniqlash spektrofotometrik usulda 459 nm da qayd etiladi.

Amaliyotda keng qo'llanilayotgan IET usularidan biri bu getergen tahlil bo'lib, ushbu usul tashuvchi ya'ni immunosorbent ishtirokida amalga oshiriladi (ELISA, inglizchada Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Bu usul o'z ichiga 2 bosqichni oladi. Ularning birinchisida erimaydigan tashuvchida adsorbsiyalangan yoki u bilan kovalent bog'langan antitela antigen bilan yoki boshqa biror aniqlanayotgan modda bilan bog'lanadi. Bog'langmagan komponentlar yuvib tashlanadi va keyin antitela tutuvchi ferment (ya'ni kon'yugat) bilan bog'langan eritma qo'shiladi. Bu ayni shu antigen uchun olingan antitelaning o'zi yoki analiz qilinayotgan oqsilga spesifik bo'lgan har qanday antitela bo'lishi mumkin.

Jarayonning ikkinchi bosqichi ham bog'lanmagan komponentlarni reaksiyon aralashma bilan yuvish orqali tugatiladi, shundan so'ng sistemaga indikatorli fermentativ reaksiyani aniqlashga mos keluvchi substrat kiritiladi. Oxirgi vaqtlarda Elisa usuli qon oqimidagi bakterial va (elder et al. 1983; Hill et al., 1983; Sarafian et al., 1982), virusli antigenlar (Sada et al., 1983; Isozaki et al., 1982; Franco et al., 1983) shuningdek, autoimmun kasalliklarida paydo bo'ladigan antitelalarni (Shimoniya et al., 1982; Ishaq, Ali, 1983; Roman et al., 1984) aniqlash maqsadida qo'llanilib kelinmoqda. De Oliveira va hammualliflari (1994) oziqa mahsulotlarida qattiq fazali immunoenzim analizi metodi

yordamida to'g'ridan – to'g'ri raqobatsiz variant ko'rinishida stafilokokli enterotoksin A ni aniqlashning o'ta sezgir, spetsifik, tezkor va juda ham oddiy bo'lgan usulini ishlab chiqishdi. Analizning umumiy vaqti 40 minutni tashkil etadi, toksinni aniqlashning minimal miqdori – 0,5 ng tashkil etadi.

ELISA usulining prinsiplarini qo'llash orqali (Wong et al., 1994) imidazolinli gaptelar (IG) tarkibini spetsifik aniqlashni amalga oshirish uchun reagentlar, antigenlar (AG), antitelalar (AT) va kon'yugatlarining fermentlar bilan birgalikdagi diagnostik to'plamlarini (naborlarini) yaratish bo'yicha ma'lumotlar keltirilgan. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki ushbu to'plamlar bir qator reagentlarni o'z ichiga oladi. Qattiq fazali IETda eng muhimi tashuvchi xisoblanadi. IGning tashuvchisi sifatida esa, ya'ni uning uchun transport vazifasini o'tovchi modda bu-qora mol zardobidagi albumin (BSA) hisoblanadi. Tashuvchi vazifasini o'tovchi moddalar yana shuningdek, odam qoni zardobidagi albumin (ChSA), fibrinogen va boshqalar bo'lishi mumkin va ushbu moddalarni qo'llash mumkin. IETda ikkinchi muhim reagent bu kon'yugatlar hisoblanadi. IG bilan nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlarning kon'yugatlarini olish uchun masalan, xren o'simligidan ajratib olinadigan peroksidaza fermentini, fosfatazalar va ureaza fermentlarini sintez uchun qo'llash mumkinligi ko'rsatilgan va shu bilan birga bu moddalar yuqorida qayd etilgan to'plamlar tarkibiga kiradi. AT lar immobilizatsiyalangan va IG bilan inkubatsiya o'tkazilgan mikroyacheykali polistiroplatalarda ELISA usulining amalga oshirilish shartlari keltirilgan.

Ushbu jarayon immobilangan ATlar, IG bilan va unga spetsifik bo'lgan antitana kon'yugatlarini (ferment nishoni sifatida peroksidaza fermenti qo'llanilgan) bilan inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiyadan so'ng, tashuvchi yuvilib, peroksidaza substrati qo'shiladi va hosil bo'lgan reaksiya mahsuloti rangi o'zgarishiga qarab, aniqlanayotgan moddani sifat jihatidan, shuningdek miqdoriy tahlil qilish mumkin bo'ladi. Mualliflar tomonidan aynan shu usul asosida IG ni tuproq tarkidagi miqdorini va

eritmalaridagi miqdorini aniqlashgan va tahlil natijalari ilmiy maqolalarda ko'rsatilgan.

ELISA metodi haqida so'z borganda shuni qayd etish lozimki, ushbu usul yordamida shuningdek boshqa, jumladan, ferritin (Anaokar et al., 1979), galaktoziltransferaza (Verdon et al., 1982), C5a antigen (Kunkel et al., 1983), retinol-bog'lanuvchi oqsil (Lucertini et al., 1984), DNK ga qarshi antitela (Myers et al., 1984), prolaktin (Sun et al., 1983), lyutropin (Ratham, Saxena, 1984) va digoksin (Freytag et al., 1984) kabi komponentlarni ham aniqlash imkoniyati mavjud. A.O.Phillips hammualliflar (1995) transformatsiyalovchi "beta" o'sish omilini aniqlash immuno taxlil usulini yaratishdi. Bunda bog'langan antitelalar yordamida kon'yugat sintezida, nishon sifatida ishqoriy fosfataza fermentini qo'llashdi. Kon'yugatlarni raqobatli metodlar asosida odamning xorigonadotropini (Yorde et al., 1976), gentamitsin (Standefer, Saunders, 1978) va digoksin (Fu et al., 1983) ni aniqlanishda qo'llab, yuqori samaradorlikka erishish mumkinligini ko'rsatib berdilar.

ELISA usullarini mukammal variantlarni ishlab chiqishda, metodda ishlatiladigan tashuvchining tabiati va uning tayyorlanish usuli, kon'yugatlarni sintezida qo'llaniladigan fermentlarning xususiyatlari, faolliklari, spesifikligi, reaksiyalarning ketma - ketligi, har bir bosqichdagi inkubatsiya vaqti kabi omillarni bir hil darajada hisobga olish lozim.

Raqobatli geterogen tahlilda reaksiyon muhitda ishtirok etuvchi ferment kon'yugati bilan bir vaqtda bog'langan yoki bog'lanma an gaptenlar (yoki antigenlar) qattiq tashuvchilarga immobillangan antitelalar bilan raqobatli bog'lanishga kirishadi. Qisqa vaqtli inkubatsiyadan so'ng, bog'lanmagan qoldiq qismlari ajratiladi va sistemaga mos keluvchi substrat qo'shiladi. Raqobatli analiz ancha oddiy sxema asosida kechadi, lekin qoidaga binoan ELISA usuliga nisbatan olinganda sezgirligi ancha past hisoblanadi (Rongen et al., 1997). Suyuq nazorat eritmada ishtirok etuvchi aniqlanayotgan moddaning retseptor bilan bog'lanish reaksiyalariga ("sendvich" variantida ikki va undan ortiq retseptor

qo'llaniladi, raqobatida esa – bitta) va universal bog'lovchi qattiq sistemalarni (LaMotte, 1994) qo'llashga asoslangan ko'priki immunotahlilning yangi metodlari ishlab chiqilgan va ushbu tahlillarga mualliflik guvohnomasi olingan. Raqobatli tahlil quyi molekular (gapten) va yuqori molekular moddalarning analizi uchun ham qo'llanilishi mumkin.

Immun tahlilning klassifikatsiyasida keltirilgan barcha usullarda tahlil uchun umumiy hisoblangan birinchi bosqich "tanish" bosqichi geterogen usullarda muhim hisoblanadi. Birinchi bosqichda immobillangan antigen yoki antitela ishlatilib, spesifik immunokompleks hosil bo'ladi va ushbu jarayon qattiq fazada kechadi. Shu sababli, bu usul qattiq fazali hisoblanadi (ingl. solid phase assay). Agar analizning birinchi bosqichida spesifik immunokomplekslarning hosil bo'lishi eritmada kechsa va shundan so'ng ajratish maqsadida immobillangan reagent bilan qattiq faza ishlatilsa, bunday usul maqsadga muvofiq ravishda gomogen usul hisoblanadi.

Aniqlashning qattiq fazali sxemalarini tanlashda shuni hisobga olish kerakki, immobillangan reagent – tahlil qilinayotgan birikma sistemadagi muvozanatga erishish tezligi faqatgina komponentlarning konsentratsiyalariga bog'liq bo'lmasdan, balki mikrodifuzion effektlarning hisobiga pasayishi mumkin (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988). Bunday sistemalar tahlilida qoidaga ko'ra, bir necha soatlardan kam bo'lmagan vaqt sarflanadi. Birlamchi spesifik immunokomplekslarning hosil bo'lishi eritmalarda kechadigan ba'zi reaksiyalarda gomogen – geterogen usulga o'tishda, birinchi bosqichda muvozanatga erishish vaqtini sezilarli darajada pasaytiradi. Bunda umumiy holda tahlil vaqti qisqaradi, komponentlarni ajratish uchun esa immobillangan ikkilamchi antitelalarning ortiqcha qismi qo'llaniladi. Gomogen fazadagi "tanish" bosqichining amalga oshirilishi tahlilning sezgirlik darajasini oshiradi. Tahlil qilinayotgan muhitda endogen ferment, kofaktor yoki effektor mavjud bo'lgan hollarda qattiq fazali raqobatsiz usullar yanada samarali hisoblanadi.

## Gomogen immunoenzim tahlili

1970 -illarning boshida Rubenshteyn R. O'z shogirdlari bilan ilmiy tadqiqotlar olib bordi. Bunda ular antigen-ferment kon'yugatini spesifik antitanalar bilan bog'lanishi nishon sifatida qo'llanilayotgan fermentning katalitik faolligini (ko'payishi yoki kamayishi) o'zgarishiga olib kelishini aniqladilar. Bu holatni ferment molekulasini konformatsion o'zgarishlarini keltirib chiqaruvchi antitanalarni bevosita ta'siri bilan bog'lab tushuntirdilar. Ushbu kashfiyot IETning gomogen usuliga asos soldi. Ushbu usulda ferment bilan nishonlangan antigenlar, antitanalar shuningdek, barcha komponentlar o'rtasidi boradigan immun jarayonlar suyuq fazada olib boriladi. Kon'yugatni antitanalar bilan bog'lanishi ferment faolligini o'zgartirgani uchun, bog'lanmagan antitanalarni yuvish va spesifik antitanalarni qattiq fazaga immobillash zaruriyati qolmadi.

IET gomogen metodlari odatda past molekularli moddalar (dori moddalari, narkotiklar, gormonlar va boshqalar) va antigenlarni aniqlash uchun ishlatiladi, chunki ularni molekular strukturalari nisbatan katta bo'lmagan o'lchamlarga ega. Bu holat antitanalarni, antigen-ferment kon'yugati tarkibida bo'lgan fermentning katalitik faolligiga ma'lum darajada o'z ta'sirini ko'rsatadi.

70-80-yillarda gomogen immunoenzim tahlilining bir qancha original modifikatsiyalangan usullari ishlab chiqildi. Ushbu usullarda fermentlardan tashqari nishon sifatida quyidagi komponentlardan foydalanildi:

- ferment modulyatorlari;
- prostetik guruhlar;
- fluorogen substratlar;
- liposomalarga kiritilgan fermentlar;
- apofermentlar

Bundan tashqari quyidagi sistemalar asosida gomogen usullarni o'tkazish taklif qilindi:

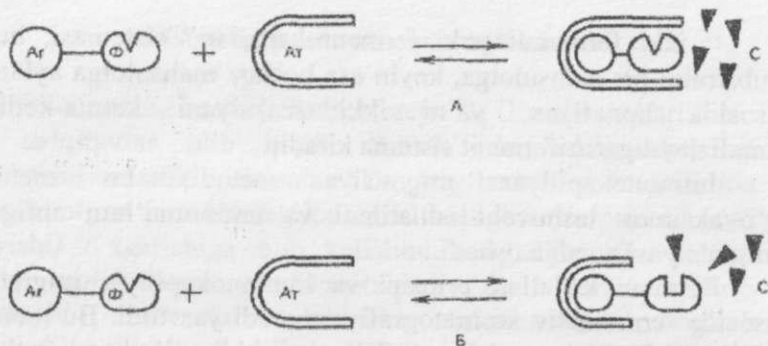
-“ ikki fermentli yoki ferment kanallari” sistemasi; bunda substratni bir mahsulotga, keyin esa boshqa mahsulotga aylanishi asosida boradigan, ya’ni ikki reaksiyani ketma-ketligini katalizlaydigan biferment sistema kiradi;

-Immunokapillyar migratsiya metodi; bu metodda g’ovaksimon tashuvchi ishlatiladi va unda ma’lum antigenni migratsiyasi amalga oshadi.

Ferment kanallari prinsipi va immunokapillyar migratsiya asosida fermentativ xromatografiya metodi yaratildi. Bu metodni qo’llanilishi maxsus laboratoriya sharoitida asbob-uskunalarsiz ekspress-analizni o’tkazish (indikator chiziqlari yordamida) imkonini berdi.

Gomogen immunoenzim tahlili (GIET) – immunoenzim tahlilining sodda usuli hisoblanadi. Ushbu usulda immun reaksiyaning komponentlaridan biri (odatda bu pastmolekular antigen) ferment bilan nishonlanadi. Shundan so’ng, antigen-antitana kompleksi shakllanadi. Jarayon bosqichlarida ferment faolligini o’zgarishi kuzatiladi. Fermentativ faolligini o’zgarishi ferment va substratni fazoviy konformatsion o’zgarishi hisobiga, shuningdek, immun komplekslarni shakllanishi hisobiga yuz berishi mumkin. Gomogen immunoenzim tahlili, boshqa immunokimyoviy metodlardan ko’ra, bir qancha ustunliklarga ega. Birinchidan, jarayon o’ta yuqori ekspressiyaga ega (gomogen immunoenzim tahlilini o’tkazish jarayoni bir daqiqa va hatto undan ham kam bo’lgan vaqtni egallaydi) (2-rasm).

Ikkinchidan, metod bir bosqichdan iborat, bshlib, qiyinchilik tug’dirmaydi va vaqt talab qiluvchi yuvishi bosqichlari amalga oshirilmaydi. Nihoyat, uchinchidan, metodni biologik yoki klinik namunaning minimal (8-50 mkl) miqdorida olib borish mumkin. Biroq, gomogen immunoenzim tahlilida bitta kamchilik mavjud bo’lib, ushbu metod asosida faqat pastmolekulali antigenlarni, ya’ni ba’zi gaptenlarni aniqlash mumkin. Shu sababli, aynan ushbu usul yordamida, gormonlar, peptidlar, dori va narkotik moddalar, hamda ba’zi pastmolekular oqsillarni aniqlash uchun diagnostikumlar yaratilgan.

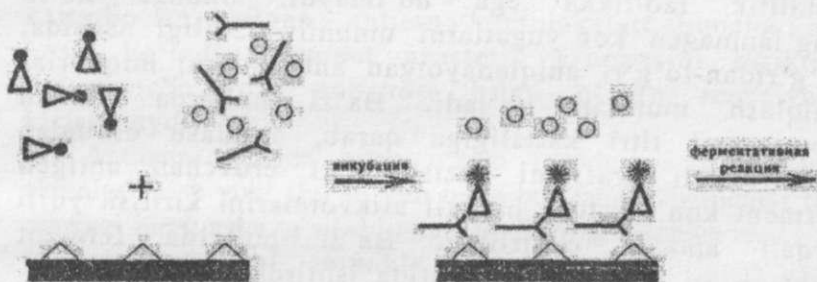


**2-rasm.** Gomogen immunoenzim tahliliini o'tkazish sxemasi  
 A- antigen (AG) va antitana (AT)ni o'zaro ta'sirida ferment (F) va substrat (S)ni fazoviy to'siqlar hisobiga ajralish effekti;  
 B- antigen-antitana kompleksini shakllanishida ferment konformatsiyasini o'zgarish effekti.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, IETning qattiq-suyuq( ya'ni geterogen-gomogen ) usuli ham mavjud bo'lib, usul qattiq tashuvchi yordamida olib borilib, bunda suyuq muhitdaga immun kompleks ham bir vaqtning o'zida, qattiq tashuvchidagi antigen yoki antitana bilan immunreaksiyaga kirishadi. Bunda, qattiq fazaga immobillangan antigen mavjud reaksiyon muhitga, shu antigenni ferment bilan kon'yugati, tekshirilayotgan zardob kiritiladi. Tajriba namunasida spesifik antitanalar bo'lsa, ular murakkab kompleks hosil qiladi va bir vaqtda qattiq va suyuq (eritmada) fazalardagi antigenlar bilan bog'lanish sodir bo'ladi. Antitanalarni kon'yugat bilan bog'lanishida ferment faolligi o'zgaradi (3-rasm).







Immuntahlilning gomogen immunoenzim metodlari tibbiyot amaliyotida keng tarqalgan. Zamonaviy tibbiyotning barcha sohalarida immuntahlil, diagnostik va analitik maqsadda ishlatiladi. Bunda ular juda past konsentratsiyadagi biologik komponentlarni (gormonlar, fermentlar, neuropeptidlar, immun sistema mahsulotlari, antigenlar va boshqalar)ni aniqlash imkonini beradi.

Immuntahlilda antigen (AG) yoki antitana (AT) faqat ferment molekulasi bilan nishonlanmay, ba'zi boshqa immun komponentlar bilan ham (ferment, radioizotop moddalar, fluoressent bo'yoq va boshqalar) nishonlash nishonlash mumkin bo'ladi. Reaksiya maxsus asbob yordamida avtomatik ravishda amalga oshiriladi.



3-rasm. Antitanalarni aniqlashning gomogen- geterogan metodi.

Belgilar:

-  -qattiq fazaga immobillangan antigen
-  -aniqlanayotgan zardobni spesifik antitanasi;
-  -aniqlanayotgan zardobni ballast moddalari;
-  -ferment bilan nishonlangan antigen;
-  -fermentni yuqori faolligi;
-  -fermentning past faolligi

Ishlatilayotgan nishonga qarab immuntahlil turlicha omlanadi; masalan, (IET), radioimmun (RIA), immunofluoressent usullarga. Reaksiyalarni bitta yoki bir necha bosqichlarda to'g'ri va to'g'ri bo'lmagan reaksiyalar asosida olib borish mumkin. Reaksiya o'tkazilayotgan muhit ham ushbu jarayonda muhim ahamiyatga ega. Agar reaksiya yuzada fiksatsiyalangan reagentlar bilan o'tkazilsa, u holda test qattiq fazali, masalan ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) deb nomlanadi.

Bu usulni quyidagi guruhlariga bo'lish mumkin. I. Ligand-ferment tipidagi kon'yugatlarini olish va qo'llash.

Bunda to'g'ri keladigan ferment bilan tegishli antigen kon'yuganti kovalent bog'lash yuli bilan sintez qilinadi.

Ferment bilan nishonlangan antigen, suvli eritmada aniklanadigan antigen bilan antitanani bog'lanishi uchun rakobatlashadi. Ko'pincha sterik xarakterdagi kiyinchiliklar yoki fermentni ingibirleydigan allosterik o'zaro ta'sir natijasida xosil bo'lgan immun kompleks, katalitik faollikka ega bo'lmaydi. Shunga ko'ra bog'lanmagan kon'yugatlarini umumiy faolligi asosida, to'g'ridan-to'g'ri aniqlanayotgan antigenlarni miqdorini aniqlash mumkin bo'ladi. Ba'zi hollarda immun komponent titri kattaligiga qarab, aniklash oldindan kolibrovkali grafigini tuzish yoki eruvchan antigen ferment kon'yugatini har xil alikvotalarini kiritish yo'li orqali amalga oshiriladi. Ba'zi hollarda ferment substratlari ham nishon sifatida ishtirok etishi mumkin. Agar fermentning substrati antigen bilan bog'lanishga qodir gruppalar tutgan bo'lsa va bunday bog'lanishlardan keyin, ferment substrat o'zaro ta'sirlanishi muqarrarligi saqlansa, unda substrat - antigen tipidagi kon'yugatlarini ham gomogen immunoenzim tahlilida qo'llasa bo'ladi. Antigen bilan bog'langan substrat o'ziga xos antitana bilan bog'lansa, immun reaksiya o'tgandan keyin esa, antitana nishonlangan substrat - antigen kompleksilarida ferment o'z faolligini o'zgartiradi. Ushbu jarayonda ferment faolligini o'zgarishiga qarab, aniqlanayotgan moddaning miqdorini aniqlash mumkin

Metodning ba'zi usullarida, oldindan ma'lum mikdorda ferment olib, so'ng faolligi - antitanalar ishtirokisiz o'lchanadi. Namunada fermentativ reaksiya o'tkaziladi va oldindan tanlangan antitana mikdori ishtirokida, reaksiya tezligi o'lchanadi. Bunda reaksiya tezligi, aniqlanayotgan namunadagi nishonlanmagan antigenlar mikdoriga to'g'ri proporsional bo'lishi zarur.

Antigen yoki antitana kon'yugatlarini sintez qilishda fakatgina ferment yoki ularning substratlari nishon sifatida qo'llanilmaydi. Nishon sifatida bir qator fermentlarning prostetik gruppalari (yoki kofaktori) ham qo'llaniladi. Olingan kompleks eritmada, o'sha eritmadagi antigenlar bilan va ularning bog'lanishga loyiq antigen molekulalari rakobatlashadi. Reaksion muhitda aniqlanayotgan antigenni konsentratsiyasi kancha katta bo'lsa, antigen - antitana komplekslari shuncha ko'p hosil bo'ladi. Ferment prostetik gruppasini biriktirib olmaguncha, o'z substrati bilan o'zaro reaksiyaga kirishmaydi.

Antitana- antigen bilan o'zaro ta'sirlashganda samarali ekranlashtirish yoki shu antigen bilan bog'langan fermentni faol markazi birmuncha to'silishi mumkin. Buning hisobiga reaksiya tezligi pasayishi mumkin. Eritmada aniklanayotgan antigen miqdori qancha ko'p bo'lsa, antitana ham ko'p miqdorda talab etiladi. Shunga ko'ra immun komplekslar ham shuncha, ko'p bo'ladi (antigen bilan boglangan holatda) va fermentativ faollik ham, shuncha yukori bo'ladi. Antigenni determinant uchastkasi bilan antitana bog'lanib, immun reaksiya amalga oshadi. Eritmada aniklanayotgan antigen ishtirok etmasa, bunday holatda fermentativ faollik umuman kuzatilmaydi.

### **Liposomal immuntahlil**

IET usullari rivojlanishida liposomalarning qo'llanilishi sezilarli darajadagi ahamiyat kasb etadi. Liposomalalar lipidlarning suvdagi eritmalarda suspenziyalanishi yoki ajratilishi natijasida hosil bo'ladigan sferik membrana vezikulalar ko'rinishida bo'ladi. Vezikulalarni ichki qismlarida suv tutuvchi yirik bo'laklar yoki bitta ichki sathga ega bo'lgan kichik o'lchamdagi strukturalar, guruhlar mavjudligi ma'lum (Bangham, 1993; Bangham et al., 1965, 1974, 1985; Hope et al., 1986;

Huang, 1969; Rongen et al., 1997). Qo'shqavatli lipid membranalari bilan o'ralgan suvli qismlarga moddalarni – markerlar, masalan, eruvchan oqsillarni, ionlar yoki fluoroforlar kabi nishon sifatida qo'llash mumkin bo'lgan moddalarni kiritish mumkin. Bundan tashqari, liposomal membranalarga antigen yoki antitelalarni kovalent bog'lash va bir qator agentlar yordamida ularni lizis qilish orqali tarkibidagi faol moddalarni liposomadan tashqi muhitga chiqarish mumkindir.

Liposomalarni lizis qilishda qo'laniladigan birikmalarga komplement sistemalari kirib, ular lizis jaryonida keng qo'llanilib kelinmoqda (Gosling., 1990; Rongen et al., 1997; Tausk., Robinson 1999).

Liposomalarning komplement – indutsirlangan lizisi jarayoni haqida so'z borganda, antitelalarga bog'liq "komplement sistemalar" asosida boradigan sitotoksiklik jarayoni haqida aytib o'tish kerak bo'ladi. Ushbu jarayon bir qator endogen oqsillar va immunoglobulinlar bilan amalga oshadi. Komplement sistemaning faollashuvi ikki xil tarzda, ya'ni mikroorganizmlar ishtirokida boradigan "alternativ" usulda va antitanalar ishtirokida bo'lib o'tadigan "klassik" usul asosida boradi. Antitana organizmga yot modda bilan ya'ni o'zining nishoni bilan bog'langanidan keyin (xo'jayi organizmiga mos bo'lmagan antigen), ular komplement sistemalarning faollanishi bilan boradigan konformatsion qayta o'zgarishga kirishadi. Bu esa o'z navbatida yot modda substansiyasida yoki hujayraning sirtida "membranaga hujum qiluvchi kompleks" MXKning hosil bo'lishiga olib keladi.

## 4.OB' EKT VA TADQIQOT USULLARI

Ushbu ishda ob'ekt sifatida difteriya anatoksini va unga spesifik ravishda olingan tozalangan antitanalar NPO «Biomed» (Perm shahri, Rossiya) ilmiy ishlab chiqarish birlashmasi tomonidan olingan preparati qo'llanildi. Kon'yugat sintezida fosfolipaza fermenti va nishon sifatida amilaza fermentlari ishlatilgan.

Fosfolipaza  $A_2$  fermenti (fosfatid-atsil-gidrolaza) gidrolazalarga mansub bo'lib, karbon kislotalardagi efir bog'lariga ta'sir etadi. Fosfolipaza  $A_2$  – lizolesitin reaksiyasining mahsuloti, lesitinga ta'sir etuvchi va fermentning katalitik faolligini stimullovchi, kuchli detergent hisoblanadi. Fosfolipaza  $A_2$  ilon, ari, chayonlar zaharida ko'p bo'ladi va shuningdek, bakteriyalarda, ko'plab biomembranalarning tarkibida ham mavjuddir. Fosfolipaza  $A_2$  fermenti o'z substratlariga ya'ni, fosfatidiletanolamin (FEA), xolin-plazmogen va fosfatidilxolinlarga ta'sir ko'rsatib gidrolizlayli.

### Amilaza texnik ferment preparatini tozalash

Amilazalar IET maqsadlari uchun eng qulay ferment hisoblanadi. Bu ferment kraxmalni gidrolizlaydi va buning natijasida reaksiya mahsuloti hosil bo'ladi. Yod-kraxmal reaksiyasi asosida bo'ladigan bu jarayon natijasida mahsulot rangi o'zgaradi va uni xech qanday asbobsiz, oddiy ko'z bilan ko'rish mumkin. Shu sababli, tahlil qilish uchun amilolitik fermentlarni nishon sifatida ishlatish, har tomonlama aniq va qoniqarli natija olish uchun qulay hisoblanadi va shu bilan birga, qisqa vaqt ichida, tahlil qilinayotgan moddaning tarkibini baholash mumkin bo'ladi. Amilolitik ferment manbaalariga arpa suvi, qon zardobi, oshqozon osti bezi ekstrakti, turli o'simliklar va mikroorganizmlar asosida olinadigan texnik preparatlarni kirgizish mumkin. Ushbu ishda mikrobl, amilorizin P10x va amilosubtilin G3x texnik preparatlardan amilaza fermentini, proteazalardan butkul tozalash

ishlari olib borildi. Sababi, ferment preparatlari tarkibida proteazalar mavjud bo'lib, bu proteazalar oqsillarni gidrolizlashi, ya'ni parchalashi natijasida, turli oqibatlariga olib keladi. Proteoliz natijasida, preparatlarning amilolitik faolligi va barqarorligi sezilarli kamayadi. Bundan tashqari, proteinazalar IETni o'tkazilishi vaqtida antitanalarga ham, salbiy ta'sir ko'rsatadi. Shuning uchun eng muhim masalalardan biri, proteolitik fermentlarni yo'qotish yoki ularni ingibirlash yo'llarini ishlab chiqishdan iborat. Hozirgi vaqtdagi amilazani tozalash bo'yicha mavjud usullar, proteolizni butunlay yo'qotish nuqtai nazaridan samarasiz. Olingan adabiyotlarda, bu savolga ma'lumotlar yetarli emas. Shu sababli, amilazani tozalashda, taqqoslash uchun ikki xil usul qo'llanildi:

a) proteolitik fermentlarni oldindan yo'qotmay tozalash, b) proteinazalarni biomaxsus sorbent yordamida tozalab, so'ng boshqa usul qo'llash.

Buning uchun maxsus sorbent sintez qilindi. Ushbu sorbent amaliyotda barcha proteolitik fermentlarni affinlik prinsipi bo'yicha bog'lash qobiliyatiga ega, negaki, uning tarkibida, impregnirlangan (sorbsiya qilingan) albumin mavjud.

**a) proteinazani yo'qotmay amilazani tozalash.** Amilolitik ferment preparatlarini (amilorizin P10x va amilosubtilin G3xlarni) tozalash uchun ma'lum miqdorda ulardan tortib olib, ammoniy sulfat tuzi yordamida cho'ktirdik (2-jadval). Jadvaldan ko'rinib turibdiki, bunda ferment faolligi 2,8 marta oshadi. Bunda proteaza faolligi saqlanib, 63,1 b/g ni tashkil qiladi. Ferment preparatining faolligi ion almashinuv xromatografiyasidan so'ng yanada oshib, 70100 b/g, tozalanish darajasi esa 29 marta ko'tariladi. Biroq, bunda proteinaza faolligi 16,3 b/g ni tashkil qiladi. Shunday qilib, tozalangan amilaza, tadbiiq etilgan jarayonlar natijasida proteolitik fermentlardan holi bo'lmaganligini olingan natijalar ko'rsatib turibdi.

**b) nordon proteinazalarni yo'qotish orqali amilazani tozalash.** Yuqorida ko'rsatilgan usulda tozalash natijasida, tozalangan amilazalar geterogen va gomogen variantdagi IETni

o'tkazishda va konyugatlarni olish uchun qo'yilgan talablarga javob bermaydi. Shuning uchun amilolitik ferment preparatlarini tozalashda, o'zgacha usul qo'llashga to'g'ri keldi. Negaki, tozalash jarayonida ham, proteolitik fermentlar asosiy oqsillarga salbiy ta'sir qiladi. Shunga ko'ra, samarali usul yordamida nordon proteinazalarni yo'qotish maqsadga muvofiqdir. Shu sababli, amilolitik fermentlarni proteinazalardan tozalash uchun, albumin oqsili bilan impregnirlangan polimer (sorsilen) qo'llanildi. Bu o'tkazilgan tajribalar ijobiy natijalar berdi.

1-jadval

Amilorizin (*Aspergillus oryzae*) va amilosubtilindan (*B. subtilius*)  $\alpha$ -amilazani tozalashnatijalari

№	Tozalash bosqichi	Oqsil konsentratsiyasi mg/ml	Umumiy oqsil, Mg	Amilaz faollik, Tb/g	Proteaz faollik Tb/g	Amilaz faollik bo'yicha tozalash,
1	Dastlabki preparat:					
	I	43,5	870	2400	195	1,0
	II	40,2	780	2143,0	182,6	1,0
2	Cho'ktirish NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>					
	I	14,5	290	6800	53,1	2,8
	II	15,3	275	5780	48,2	2,7
3	ion almashinuv xromatografiya					
	:	0,6	16,3	70100	16,3	29
	I	0,65	15,7	68000	15,42	31,7
	II					

I - amilorizin, II – amilosubtilin

Sorbent, qoramol zardobi albumini bilan impregnirlangan bo'lib, sorbsiyaga juda xos va eritmadagi proteazalarni samarali bog'lash xususiyatiga ega. Shu sababli, proteazalardan amilorizin va amilosubtilin preparatlarini tozalashda, sorsilen ishlatildi. Oqsil substratining, gidrolizini oldini olish uchun, shunday sharoitlar tanlandiki, bunda jarayon davomida bog'lanish ( $K_s \sim K_m$ ) sodir

bo'lib, kataliz esa kechmaydi. ( $K_2 \approx 0$ ). Tajriba yo'li bilan shu narsa aniqlandiki, bunda muhitga etanolning 20% eritmasini kiritilishi, nordon proteazalarni polimerga sorbsiyasini kuchaytirdi. 3-jadvalda keltirilgan ma'lumotlar tozalash samaradorligi oshib borayotganligini ko'rsatadi.

Jadvaldan ko'rinib turibdiki, biomaxsus sorbent tomonidan qayta ishlangandan so'ng, amilorizin ferment preparatining faolligi oshgan. Proteaza faolligi esa 2,8 martaga pasayishi kuzatilgan. Amilaza faolligi esa 7,4 barobarga oshgan. Ferment faolligi IOXda esa yanada oshib, (2 a,b -rasm) 120 marotabaga yetgan. Bunda tabiiyki, proteaza faolligi pasayadi. Nihoyat, ultragel AsA-54da o'tkazilgan gel-xromatografiyada, yuqori darajada tozalangan amilaza ferment preparati olingan.

Toza holda ajratib olingan amilaza 700 000 b/g faollikka ega. Bu preparatning proteaza faolligi, o'ta oz miqdordaligi aniqlandi (0.03 b/g) Amilaza faolligi bo'yicha, tozalik darajasi 290 martani tashkil qildi.

## 2-jadval

*Aspergillus oryzae* va *B. subtilis* ni proteinazalarini dastlabki yo'q otish yordamida tozalash natijalari

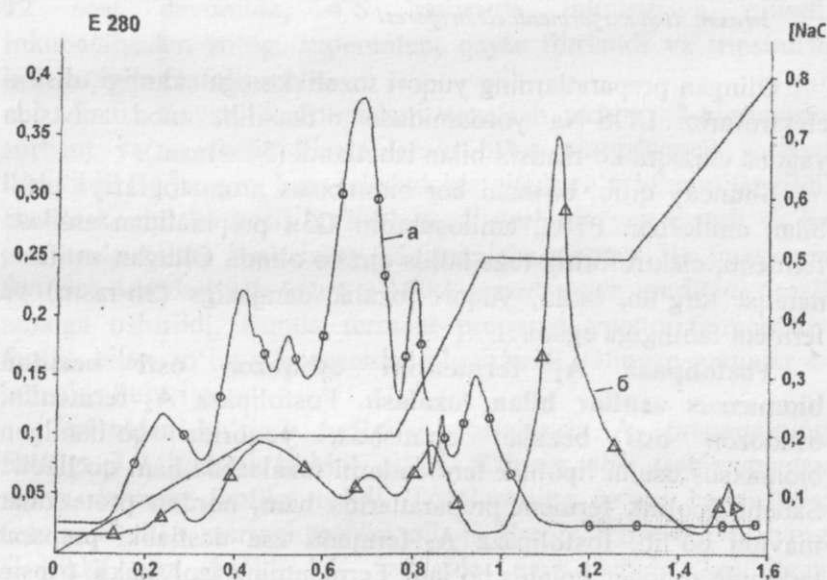
№	Tozalash bosqichlari	Oqsil konsentratsiyasi mg/ml	Umu-miy oqsil, Mg	Amilaza faolligi, b/g	Proteaza faolligi b/g	Amilazani faollik bo'yicha tozalash darajasi
1	Dastlabki preparat:					
	I	43,5	870	<u>2400</u>	195	1,0
	II	40,2	780	<u>2143</u>	182,6	1,0
2	Sorbent bilan qayta ishlash:					
	I	22,0	440,0	<u>8300</u>	62,3	3,5
	II	19,8	420,0	<u>7500</u>	56,9	3,5
3	Cho'ktirish $NH_4(SO_4)_2$ :					
	I	7,0	140,0	<u>17800</u>	7,9	7,4
	II	6,8	135,0	<u>18400</u>	8,3	8,5

4	ion almashinuv xromatografiya:					
	I	0,9	8,4	<u>289000</u>	0,065	120
	II	0,86	8,0	<u>310000</u>	0,72	144,6
5	Gel-xromatografiya:					
	I	0,80	4,0	<u>700000</u>	0,03	290
	II	0,75	4,5	<u>610000</u>	0,03	285

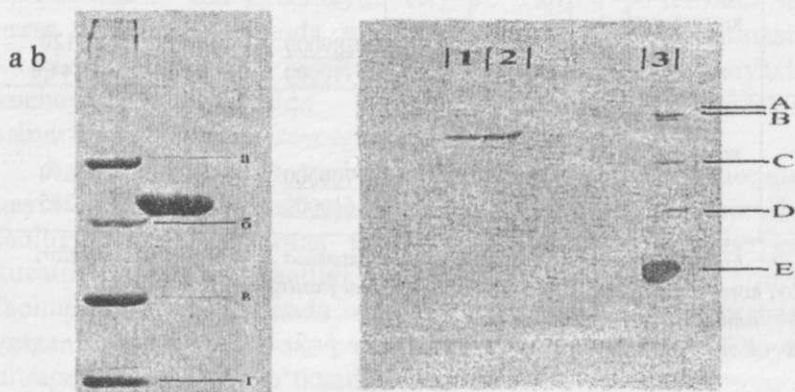
Izoh: Jadvalda tagiga chizilgan raqamlar asosida keltirilgan ma'lumotlar, dastlabki kontrol sifatida olingan amilaza fermenti faolligidan farqlanadi.

I- amilorizin, II – amilosubtilin

II- Kolonka o'lchami 2,5x20 sm, 0,05M-tris buferda, a - amilorizin, b - amilosubtilin



2-rasm. Amilorizin P10x va amilosubtilin G3x ferment preparatlarini DEAE-sellyulozadagi ion almashinuv xromatografiyasi.



*a - amilorizin, b - amilosubtilin.*

*3-rasm. Amilaza fermenti elektroforezi*

Olingan preparatlarning yuqori tozalikka ega ekanligi, disk – elektroforez DDS-Na yordamida o‘tkazilib, anod sohasida yagona chiziqni ko‘rsatishi bilan isbotlandi (3a – rasm).

Shunday qilib, birinchi bor biomaxsus xromatografiya usuli bilan amilorizin P10x, amilosubtilin G3x preparatidan amilaza fermenti, elektroforitik toza holda ajratib olindi. Olingan amilaza, nafaqat turg‘un, balki, yuqori tozalik darajasiga (3b-rasm) va ferment faolligiga egadir.

**Fosfolipaza A<sub>2</sub> fermentini oshqozon osti bezidan biomaxsus usullar bilan tozalash.** Fosfolipaza A<sub>2</sub> fermentini oshqozon osti bezidan ajratishda, yuqorida qo‘llanilgan biomaxsus usulni lipolitik fermentlarni tozalashda ham qo‘lladik. Sababi lipolitik ferment preparatlarida ham, nordon proteazalar mavjud bo‘lib, fosfolipaza A<sub>2</sub> fermenti esa dastlabki preparat tarkibida zimogen holatda bo‘ladi. Fermentning faol shakli, tripsin molekulari ta’siri ishtirokida hosil bo‘ladi. Ya’ni proteazalar fermentning nofaol holdan, faol holga aylanishi uchun kerak.

Shu sababli proteolitik ferment molekularini, fosfolipaza ferment molekulari bilan hosil qilgan kompleksni, ajratish juda qiyin. Yana shuni ta’kidlash joizki, tripsin fosfolipazani faollab bo‘lgandan so‘ng ham, proteolizni davom ettiradi, natijada

fosfolipaza faolligi pasayadi. Shuning uchun fosfolipaza  $A_2$  fermentini proteazalardan tozalash, maqsadga muvofiq hisoblanadi. Bu o'rinda shuni aytib o'tish lozimki, bifermentli liposomal tahlilda fosfolipaza  $A_2$  muhim ahamiyatga ega. Biz fosfolipaza fermentini immun tahlilda qo'llash uchun, uni proteolitik fermentlardan tozalashni maqsad qilib qo'ydik. Shu maqsadda 2 xil sorbent sintezladik. Ularning birida ligand sifatida tripsin inhibitorini, ikkinchisida fosfaditiletanolaminni (kefalin) ishlatdik.

Bu ikki sorbentlarni navbat bilan qo'llash, tripsinni olib tashlash va toza fosfolipaza  $A_2$  fermentini olish imkonini yaratadi. Birinchi bosqichda, sintezlangan birinchi biosorbent qo'llanilib, oshqozon osti bezi supernatantida tripsin yo'qotildi.

Bunda sorbent, supernatant bilan to'xtovsiz aralashtirish bilan 12 soat davomida,  $4^{\circ}S$  haroratda inkubatsiya qilindi. Inkubatsiyadan so'ng, supernatant qayta filtrlandi va tripsindan holi bo'lgan fosfolipaza  $A_2$

olindi. Keyin, fosfolipazani tozalash uchun, 2-biomaxsus sorbent ya'ni, fosfatidiletanolamin bilan sintezlangan sorbent ishlatildi. Bu jarayon ham inkubatsiya qilish yo'li bilan o'tkazildi. Bunda kompleks hosil bo'lishi, suvli muhitda yuz beradi va bu jarayonda kalsiy ionlarining ishtiroki shart emas. Bu jarayonda ferment desorbsiyasi, triton x-100 konsentratsiya gradienti orqali amalga oshirildi. Bunda ferment preparati yuqori fermentativ faollik bilan, to'liq adsorbentdan elyuirlandi. Olingan natijalar 4-jadvalda keltirilgan.

Jadvaldan ko'rinib turibdiki, fosfolipaza  $A_2$  preparatining faolligi 3,0 b/mg ni tashkil qiladi. Tripsin olib tashlangandan so'ng, ferment faolligi oshdi. Tozalashning so'ngi bosqichida, tozalanish 213 martani tashkil qiladi. Bunda ferment 640 b/mg faollikka ega bo'ldi. 4- jadvalda qavs ichida keltirilgan ma'lumotlar, tripsinni olib tashlamasdan o'tkazilgan ma'lumotlar. Bunda ferment 380mg/b faollikka ega

## **a-amilaza fermentini fosfolipidli liposomalarga inkapsullash**

Hozirgi kunda liposomalar turli sohalarda keng qo'llanilib, ularga bo'lgan talab tabora oshmoqda. Adabiyotlarda liposomalarning o'lchami, membrana strukturasi, sirt zaryadi va boshqa tavsiflari bo'yicha farq qiluvchi yog' tomchilari shaklidagi vezikular ekanligi keltirilgan (Gregoriadis, 1983; Bangham et al., 1974; Rongen et al., 1997, Tashmuxeamedova, 2008). Liposoma membrana sirtini barqarorlashda xolesterol, dodesilsulfat, sterilamin moddalar qo'llab, fosfat guruhlari bilan farqlanuvchi shuningdek, o'lchami va zaryadiga ko'ra farqlanuvchi turli fosfolipidlardan sintezlangan liposomalarni olish mumkin. Liposomalarning o'lchami bir necha nanometrdan bir necha mikrometrlargacha bo'lishi mumkin.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, birgina, immunoanalizning bir qator metodlari uchun o'ziga birlashtirilgan ko'plab markerlarni bo'shata olish xususiyatiga ega bo'lgan bir xil kattalikka va ichki sathga ega yirik vezikulalarni qo'llash talab etiladi. 0,1-1 mkm diametrlilik bitta sathga ega yirik vezikulalarni bir necha usullar bilan, masalan, efridagi fosfolipidlar eritmasini suv hammomiga qo'yish orqali (Deamer, Bangham, 1976) so'ng esa organik moddalarni parlatgichda bug'latish (Szoka, Papahadjopoulos, 1978) vositasi asosida olish mumkin.

Yuqorida qayd etilgan metodga asosan, liposomalar sintezlanayotgan jarayonda fosfolipidlar oldin organik erituvchilarda eritiladi, keyin suvli bufer bilan aralashtiriladi va emulsiya hosil qilinadi. Keyinchalik vaakuum ostida organik erituvchi olib tashlanadi va natijada liposomalar hosil bo'ladi. Bir qator ilmiy tadqiqotlarda yuqorida qayd etilgan usulda olingan liposomalar qo'llanilgan. Yana shuni aytib o'tish lozimki, liposomalar sintezida eng muxim rol o'ynaydigan komponent bu fosfolipidlar hisoblanadi. Fosfolipidlar ancha qimmatli moddalar hisoblanadi. Shu sababli ularni olishni oddiy va arzon man'balarni va shuningdek, usularini topish muximdir.

Ko'p qavatli liposomalarni tuxum sarig'idan Dauson metodi bo'yicha ajratilgan fosfolipidlar yig'indisidan olish mumkin. Ushbu tadqiqotda fosfolipidlarni tuxum sarig'idan ajratish texnologiyasi ishlab chiqilgan.

### **Fosfolipidlarni tuxum sarig'idan ajratish usuli**

Bunda 10 tuxum sarig'i oqsil qismidan ajratilib, 300 ml toza asetonda 10 daqiqa davomida gomogenizatsiya qilinadi. Hosil qilingan gomogenat ekstraksiya qilish uchun 5 S haroratda 2 soat inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng, gomogenatning erimagan qismini ajratish uchun 3000 ob/minda 30 minut davomida sentrifuga qilinadi. Ajratilgan cho'kma ustiga yana 100 ml miqdorla toza aseton eritmasi quyilib 2 soat davomida ekstraksiya qilish davom ettiriladi. Ekstraksiyadan so'ng gomogenat qaytadan sentrifugalanadi va cho'kma vakuumda quritiladi. Quritilgan cho'kma 96% etil spirtida ekstraksiyalanadi. Ushbu jarayon 2 marotaba qaytariladi.

Tadqiqot natijasida olingan ekstraktlarni bir-biriga qo'shib, tarkibidagi etil spirti esa rotor parlatgich yordamida parlatiladi. Uo'bu jarayon natijasida hosil qilingan cho'kma 50 ml petrolin efirida eritiladi. So'ngra fosfolipidlar absolyut aseton eritmasi yordamida (0S gacha sovutilib) -4 S haroratda 1 soat davomida inkubatsiya qilish orqali cho'ktiriladi. Shundan so'ng cho'kma sovutilib, shisha varonka yordamida filtrlanadi. Ushbu jarayon ikki marotaba qaytarilib, so'ngra 40 S haroratda rotor parlatgichda quritiladi. Yuqorida qayd etilgan jarayon yordamida 10 ta tuxum donasidan ajratilgan fosfolipidlarlarning umumiy miqdori 8,4 grammni tashkil etadi. Hosil qilingan fosfolipidlar ymg'indisini 40 ml xloroformda eritib, -10 S, -15 S haroratda saqlash tavsiya etiladi. Hosil qilingan fosfolipidlarning faolligini Vaskovskiy usulida aniqlash mumkin. Ushbu jarayonni amalga oshirish bosqichlari 1- sxemada ko'rsatilgan.

Yuqorida qayd etilgan asosda olingan tuxum sarig'i fosfolipidlarinidan liposomalalar olish uchun, 40 mg fosfolipid

yig'indisi 2 ml xloroformda eritiladi rotor parlatgichda plyonkalar hosil bo'lguniga qadar quritiladi. 3 mg a-amilaza 1 ml 0.05M li borat buferida 0.145 M NaCl, rN 8 da eritildi. Keyin ushbu eritma fosfolipid plyonkasi hosil qilingan kolbaga quyiladi va 10-15 minut davomida chayqatiladi. Keyin esa 4 ml borat buferi qo'shib va 50 minut davomida mikrokapsullanmagan a-amilazani yuvib tozalash uchun sentrifugalanadi. Bu jarayon liposomalarning tashqi qismida amilaza faolligining to'la holatda yo'qolguniga qadar 5 marta takrorlanadi.

### **Poliamid membranalariga difteriya toksiniga qarshi olingan antitanalarni kovalent immobillash**

Poliamid membranalariga difteriya toksiniga qarshi olingan antitanalarni kovalent immobillash uchun poliamid tashuvchi yuzasida antitana bilan kimyoviy bog' hosil qiluvchi faol guruh faollashtiriladi. Aynan poliamid tashuvchida amino guruhlar mavjud bo'lib, ularni faollash NSI yordamida amalga oshiriladi. Buning uchun 2,5n HCl li byuksga poliamid solinadi va 45<sup>0</sup>S da magnit aralashtirgichda 2 soat davomida inkubatsiya qilinadi. Kislota qoldiqlarini distillangan suv bilan(2 marta), so'ngra 0.05 M li borat buferi, rN 8,0 (4 marta) bilan yuviladi. Faollashtirilgan poliamid 2,5% li glutar aldegidni eritmasi, ya'ni tikuvchi modda bilan 2 soat davomida modifikatsiya qilinadi Ushbu jarayon albatta magnit aylantirgichda xona haroratida olib borilishi zarur. Aldegidning qoldig'i 0.05 M li borat buferi bilan tashuvchi yuzasini yuvish (6 marta) orqali olib boriladi.

Tashuvchini faollash jarayoni tugatilgandan so'ng, poliamidga antitanalar solinadi. Buning uchun 0.1 M li borat buferida 50 mkg difteriya toksiniga olingan antitana solinib eritiladi va tashuvchi yuzasiga solinib, 48 soat davomida 4<sup>0</sup>S haroratda magnit aralashtirgichda inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiyadan so'ng, tashuvchi yuzasiga qancha miqdor antitana immobillanganini bilish uchun, tashuvchi yuviladi va yuvilgan eritmalar tarkibidagi, tashuvchiga bog'lanmay qolgan antitanalar

miqdori aniqlanadi. Poliamid bilan bog'lanmagan antitanalarning miqdorini aniqlash Louri usuli yordamida yoki spektrofotometr yordamida amalga oshirish mumkin (Lowry et al., 1951).

### **Liposomalarga antitanalarni immobillash**

Liposomalarga antitanalarni immobillash uchun, liposomalarning 2 ml suspenziyasi olinib, ularga 20 mkl hajmda 1% li glutar aldegid bilan 20 min davomida ishlov beriladi. Shundan so'ng, suspenziya xona sharoitida 1 soat davomida almashtirib turish orqali 0.145 M NaCl ga qarshi va 1 soat davomida esa 0.01 M li boart buferiga rN 8.0 qarshi dializ qilinadi. Shundan so'ng 0,145 M li NaCl asosida tayyorlangan 1 ml 0.01 M li borat buferi rN 8,0 bo'lgan eritmada 1.2 mg antitana eritiladi va glutar aldegid bilan ishlov berilgan liposomal suspenziyasiga qo'shiladi. Aralashmani 4<sup>o</sup>S haroratda 2 sutka davomida inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng liposomal bilan bog'lanmagan antitanalar 45 minut davomida 6 ming ayl/min tezlikda sentrifugalash orqali yuvib tashlanadi. Yuqorida qayd etilganidek, bog'lanmagan antitanalarning miqdorini aniqlash Louri usuli yordamida yoki spektrofotometr yordamida amalga oshiriladi.

### **Fosfolipaza A<sub>2</sub> fermenti asosida kon'yugat sintez qilish**

Difteriya toksiniga qarshi olingan antitanaga fosfolipaza A<sub>2</sub> fermentini kimyoviy bog'lab, kon'yugat sintez qilish uchun, avval nishon sifatida qo'llanilayotgan ferment tayyorlab olinadi. Buning uchun ari zahari yoki kobra zaharidan olingan 0.5 mg fosfolipaza A<sub>2</sub> fermenti olinib, 3 ml 0.1 M li borat buferida eritildi. Ushbu eritmaga 1.5 mg miqdorda difteriya toksiniga qarshi olingan antitana solinadi va aralashma asta – sekinlik bilan aralashiriladi. Aralashmaga 0.1 ml 0.1 % li glutar aldegid qo'shib, yaxshilab 15 minut davomida silkitiladi va 12 soat davomida muzlatgichda inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng, sintez qilingan kon'yugatni,

distillangan suvga qarshi 24 soat davomida diaiz qilinadi. Dializ uchun ishlatilgan suvni tajriba davomida 4 marta almashtirish zarurdir.

### **$\alpha$ – amilaza fermenti faolligini aniqlash**

$\alpha$  – amilazaning faolligini aniqlash uchun 1 % li kraxmal zritmasi tayyorlanadi (rN 4,7 bo'lgan 0.1 M li natriy asetat bufer eritmasida) va probirkaga 0,2 ml solinib, uning ustiga 0.1ml ferment eritmasi qo'shiladi. Ushbu eritma solingan probirka 10 minut davomida 37<sup>0</sup>S da inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng substratni gidrolizlanish darajasi, ya'ni ferment faolligi yodometrik usulda aniqlanadi (Ferment preparatlari, 1975; Tashmuxeamedova va boshqalar., 1993). Buning uchun inkubatsiya qilingan ferment eritmasidan 0,1 ml olib, uni 10 ml ishchi yod eritmasiga ( oldindan ushbu nisbatda tayyorlangan: 5.0 mg yod va 100ml 0,1 n li HCl eritmasi va 50 mg yodli kaliy ) solinadi. Nazorat eritmalarda ferment o'rniga distillangan suv ishlatiladi. Reaksiya natijasida hosil bo'lgan mahsulot rangini o'zgarish intensivligi fotokolorimetrdan N9 yorug'lik filtrida (maksimum o'tkazilishi 670 nm) aniqlanadi. Faollikning birligi sifatida 10 minut davomida 37<sup>0</sup>S da 10 ml 1 % li substrat (kraxmal) eritmasi gidrolizini 30 % gacha katalizlovchi ferment miqdori qabul qilingan. Gidrolizlanish darajasini, aniqrog'i ferment faolligini A ni foizlarda ifodalash va aniq hisoblash quyidagi formula asosida olib boriladi:

Bu yerda  $D_1$  – nazorat eritmaning optik zichligi

$D_2$  – namunaning optik zichligi

Gidroliz bo'lgan kraxmalning miqdori(S) ko'ra fermentativ faollikni hisoblash

$$A = \frac{D_1 - D_2}{D_1} * n$$

formula asosida hisoblanadi, bu yerda n –tahlil uchun substrat sifatida olingan kraxmalning miqdori, g.

Amilolitik fallik quyidagi formula asosida aniqlanadi:

$$A=(7,264*C-0,03766*1000)\n*5$$

C – gidrolizlangan kraxmalning miqdori, mg; n – sinov uchun olingan fermentning miqdori, mg; 1000 – milligramlardan grammlarga o'tkazish koeffitsienti; 7,264 va 0,03766 – tenglamani hisoblashga doir koeffitsientlar.

### **$\alpha$ -amilaza ferment preparatini fosfolipidli liposomalarga mikrokapsullash**

Ushbu metod difteriya toksinini “sendvich” usuli misolida, IET ning liposomal gomogen va qattiq fazali metodlarini ishlab chiqishga qaratilgan. Ushbu usulda signalni registratsiya qilish uchun ikki fermentli sistemadan foydalaniladi, bu esa tahlil sezgirlikini sezilarli darajada kuchaytiradi. Buning sababi shundaki, bunda kon'yugatning tarkibiga kiruvchi birinchi fermentni masalan, – fosfolipaza A<sub>2</sub> ning ta'siri, liposomalarga kapsullangan ikkinchi ferment  $\alpha$ -amilaza orqali kuchayadi.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, enzimologiya muhandisligi biotexnologiyaning ancha rivojlangan bo'limlaridan biri hisoblanadi. Bu sohaga qiziqishning ortishi fermentlarning katalizatorlar singari katalitik faollikka va substratli spesifiklikka ega ekanligi, biotexnologiya sohasidagi ko'plab turli – tuman amaliy masalalarni yecha olishi bilan xarakterlanadi. Biotexnologiyaning hozirgi kundagi ko'zga ko'ringan ajoyib yutuqlari sezilarli darajada ajratib tozalangan va immobillangan fermentlarning qo'llanilishi bilan bog'liq (Sasson, 1987). Birgina, tabiiy sharoitlarda fermentlar bo'lajak murakkab ansambllarning tarkibiga birikadigan membranaga bog'langan ko'rinishda harakat qiladi. Boshqacha aytganda, zamonaviy enzimologiyada *in vitro* sharoitlari gomogen suvli eritmalarda fermentlarni tadqiq qilishdan *in vivo* dagi fermentlarning biomembranaviy o'ralishini imitatsiyalovchi geterogen eritmalarga o'tish masalalari qo'yilgan.

Bunday sistemalardan biri – yopiq ko‘rinishdagi qo‘sh qavatli lipid strukturalari – liposomalar yoki mikrokapsulalar hisoblanadi (Bangham, 1993; Bangham et al., 1965, 1974; Ullman et al., 1987). Mikrokapsulalarga biriktirilgan fermentlar tibbiyotda, farmasevtikada, kimyoviy analizda va sanoatdagi ilmiy tadqiqotlarda keng qo‘llanilish doirasiga egadir.

### **Bir necha qavatli liposomalarni olish**

Liposomalarning olish uchun dastlabki hom ashyo sifatida tuxum sarig‘idagi fosfolipidlar yig‘indisidan foydalanish mumkin. Buning uchun xloroformli eritmasi olinib, unga 40 mg miqdordagi fosfolipidlar eritiladi. Shundan so‘ng fosfolipidlarning xloroformli eritmasi tubi dumaloq kolbaga solinadi va xloroform rotorli parlatgichda parlatiladi. Keyin esa, kolbaga 1 mg amilaza 5 ml borat buferida rN 5,6 da eritilib, ferment eritmasi qo‘shiladi, silkitiladi va muzlatgichga 2 marta 30 sekunddan qo‘yiladi. Shundan so‘ng, liposomalar 3 marta borat buferi bilan amilaza faolligi yo‘qolgunicha yuviladi. Liposomalarga inkapsullanmay qolgan ferment miqdori ma’x’lum usullar yordamida aniqlanadi.

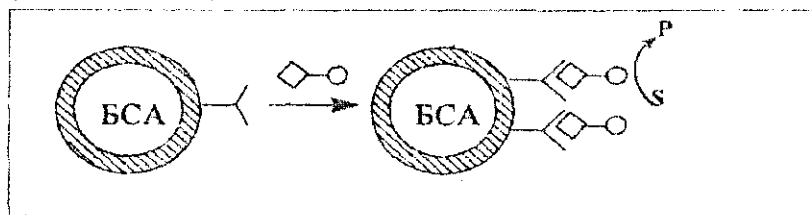
Ko‘p qavatli liposomalarni olish uchun adabiyotlarda keltirilgan standart metodlaridan foydalanish mumkin (Gregoriadis, 1983; Bangham, 1965, 1993; Bangham et al., 1974) Bunda ya’ni ko‘p qavatli liposomalarni olish uchun tuxum sarig‘i fosfolipidlari yig‘indisidan 40 mg olinib, u 2 ml xloroformda eritiladi va rotorli parlatgichda plyonka hosil bo‘lguniga qadar quritiladi. Keyin esa, 3 mg amilaza 1 ml 0.05 M li borat buferida ( tarkibida 0.145 M NaCl bo‘lgan, rN 8,0) eritilib, ushbu eritma fosfolipid plyonka hosil qilingan kolbaga quyiladi va 10-15 minut davomida chayqatiladi. So‘ngra 4 ml borat buferi qo‘shiladi va tashqi eritmadan amilazalarni olib tashlash uchun 50 minut davomida 6 ming ayl/min tezlikda sentrifugalanadi. Yuvish jarayonlarini supernatantdagi a-amilazaning faolligi to‘la ravishda yo‘qolguniga qadar 5 marta takrorlanadi. Keyin esa, liposomalar

cho'kmasiga 4 ml borat buferi qo'shiladi va ushbu eritma suspenziya holatida saqlanadi.

Olingan mikrokapsulalarning ichida  $\alpha$ -amilazaning mavjudligiga ishonch hosil qilish uchun liposomalar membranalari lizis qilinadi. Lizis uchun *Apis mellifera* arisi yoki O'rta Osiyo kobrasi *Naja oxiana* ning zaharidan olingan fosfolipaza A<sub>2</sub> fermentidan foydalanish mumkin. Buning uchun 0.5 ml liposomalar eritmasi 1,35 ml tris – HCl buferi va 0.15 ml 0.1 M li CaCl<sub>2</sub> da eritilgan 0.1mg fosfolipaza A<sub>2</sub> fermenti mavjud eritma bilan inkubatsiya qilinadi. Shundan so'ng, liposoma lizisi amalga oshadi va inkapsullangan amilaza fermenti tashqi muhitga chiqa boshlaydi. Tashqariga chiqqan ferment molekulasini tekshirish orqali, liposomaga ipkapsullangan ferment faolligini va uning miqdorini aniqlash mumkin bo'ladi. Shunday qilib, ushbu usul yordamida liposomalarning fosfolipaza A<sub>2</sub> yordamidagi lizisida ajralib chiqadigan inkapsullangan amilazali liposoma preparatlarini olish mumkin.

### Liposomalarga antitanalarni immobillash

Liposomalar membranalariga antitanalarni immobillash, antitanadagi (lizin aminokislotalari) faol guruhlar va liposoma membranalaridagi fosfatidiletanol-amin aminoguruhlarini o'zaro kovalent tikish orqali amalga oshiriladi. Albatta ushbu jarayonda tikuvchi reagent sifatida glutar aldegididan foydalaniladi (Torchilin, 1978).



Antitanalarni immobillash jarayonini amalga oshirishda, avvalo ichki qismida buqa zardobi albuminini (BZA) tutgan liposomalar tayyorlanadi va ularning sirtiga standart usul asosida

antitanalar immobillanadi. Immobillash uchun antitanalarning turli miqdori olinadi va oldindan tikuvchi bilan modifikatsiyalangan liposomalarga antitanalar solinali. Shundan so'ng, liposomalalar 18 soat davomida, 4 °S haroratda inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiyadan so'ng liposomalalar borat buferi bilan yuvib tashlanadi. Liposoma sirtiga immobillangan antitanalarni aniqlash uchun immun reaksiyani amalga oshirish kerak bo'ladi. Buning uchun oldindan sintezlangan antigen – amilaza kon'yugatidan foydalanish mumkin (kon'yugat sintez qilish jarayoni yuqorida keltirilgan). Bunda BZA tutuvchi immunoliposomalarga amilaza kon'yugati solinadi va ma'lum muddat inkubatsiya qilinadi.

Inkubatsiya davomida antigen asosida olingan kon'yugat liposoma sirtidagi antitanalar bilan immun reaksiyaga kirishadi va natijada kon'yugat liposomalalar sirtki qismidagi antitanalarga bog'lanib qoladi. Jarayon davomida liposomalarga bog'lanmagan kon'yugat sentrifugalash orqali liposoma sirtidan yuvib tozalanadi. Shundan so'ng, immunoliposomalalar cho'kmasi bufer eritmasi yordamida suspenziya holatiga keltiriladi. Suspenziyada liposomalarning sirtidagi antitanalar bilan bog'langan va ularni mavjudligini tasdiqlovchi, ferment kon'yugatining faolligi o'lchanadi. Aniqlangan fermentativ faollik liposomalarga immobillangan antitanalar miqdoriga proporsional bo'lganligi uchun, ushbu jarayonda liposomalalar sirtida antitanalar mavjud deb, - aniq aytish mumkin bo'ladi.

Yuqorida keltirilgan antitanalarni immobillash jarayonlarini optimallashtirishda nishon sifatida ishlatilayotgan ferment miqdori, shuningdek, o'z substrati bilan reaksiyaga kirishishi, liposomalarni lizis qiluvchi ferment va immobillash uchun olingan antitanalar miqdori muhim rol o'ynaydi. Yana shuni aytib o'tish joizki, yuqorida BZA ni liposomalarga kiritish mumkinligini ko'rsatish orqali liposomalarga faqat ferment molekularini emas balki, turli biologik faol moddalarni ham inkapsullash mumkin ekanligi misol orqali ko'rsatib berildi.

## 5. DIFTERIYA TOKSININI LIPOSOMA ASOSIDAGI IMMUNOENZIM TAHLILI USULI YORDAMIDA ANIQLASH

Yuqorida qayd etilganidek, immunoenzim tahlili ilmiy tadqiqotlarda, shuningdek turli antigenlar diagnostikasida (Hage, 1999) tabiiy, kimyoviy birikmalarni aniqlashda keng qo'llaniladigan, yuqori sezuvchanlikka ega bo'lgan metodlardan biridir. IETni gomogen va geterogen usullari mavjud bo'lib, geterogen usuli qattiq faza ishtirokida olib borilib, ushbu jarayon bir necha bosqichlarni o'z ichiga oladi.

Buning uchun spesifik komponentlardan biri qattiq fazaga immobillanadi. So'ngra navbat bilan boshqa komponentlar qo'shiladi. Inkubatsiyadan so'ng, ularning har biri bog'lanmagan komponentlardan tozalash maqsadida yuviladi. Jarayonda muhim rol o'ynaydigan kon'yugat miqdor jihatidan immobillangan va aniqlanayotgan komponent konsentratsiyasiga proporsional bo'lishi lozim (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988).

IET ning turli variantlari qattiq fazaning tipi va unga birinchi spesifik reagentning bog'lanish usuli bilan, qolgan spesifik reagentlarning qo'shilish ketma – ketligi va soni bilan, kon'yugatni olish usuli, kon'yugatdagi fermentning tabiati, foydalaniladigan substratning tipi, analiz natijalarini ifodalash usuli bilan farqlanadi (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988; Rongen et al., 1997).

IET ning har bir variantida quyidagi umumiy bosqichlarni ajratish mumkin:

- immunosorbentni olish;
- spesifik reaksiyalarni qattiq fazada o'tkazish;
- bog'lanmagan nospesifik komponentlarni yo'qotish;
- ferment kon'yugatini olish;
- qattiq fazadagi spesifik kompleksning fermentativ faolligini o'lchash;
- tahlil natijalarini sharhlash

Immunosorbentlarni sintez qilish jarayoni turli usullar orqali amalga oshiriladi. Qoidaga ko'ra, suspenziyalangan qattiq fazalar reaksiya qobiliyatiga ega gidroksil, amid yoki karboksil guruhlarni tutadi. Ularga aminoguruhlarini tutuvchi spesifik reagentlarning kovalent bog'lanishi glutar aldegid, bromsian, gidrazin, 1,4 - diepoksipentan, divinilsulfon, epixlorogidrin, gidroxinon, natriy periodat, suvda eriydigan karbodiimid kabi reagentlar yordamida amalga oshiriladi (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988; Rongen et al., 1997).

Immunosorbent sintez qilib olingandan so'ng, unga spesifik reagentlar qo'shiladi, buning natijasida qattiq fazada ko'p qavatli kompleks shakllanadi. IET ning o'tkaziladigan bosqichlari aniqlanayotgan komponentlar bog'lanish konstantalariga va reaksiya jarayoni kinetikasiga va ularni xarakterlovchi spesifik reaksiya turiga bog'liq bo'ladi (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988; Rongen et al., 1997). Spesifik komponent qattiq fazada inkubatsiya qilingandan keyin va shu bilan birga, tahlilning har bir bosqichidan so'ng yuvish jarayoni amalga oshiriladi. Har bir bosqichda yuvish jarayonini amalga oshirishdan maqsad immunosorbent yuzasida faqat spesifik bog'langan komponentlarni olib tashlashdan iboratdir. Immunosorbentni yuvish bosqichidan so'ng, hosil bo'lgan faol erkin markazlarni to'ldirish uchun turli oqsillar (buqa eardobi albumini, ovalbumin va boshq.), kazein singari nospesifik reagentlar yordamida bo'sh qolgan komponentlarni blokirlash bosqichi o'tkaziladi. Buning uchun yuqorida qayd etilgan oqsil moddalarning 1-2% li eritmasi tayyorlanib, tahlilning oxirgi bosqichlarida immunosorbent ushbu eritma bilan inkubatsiya qilinadi, so'ngra sorbent yuvib tashlanadi. Immunosorbentga nospesifik ravishda bog'langan immunkomponentlarni ko'p hollarda tarkibida detergent moddalar tutgan (masalan, 0.05 %li tvn, EDTA) bufer eritmalari bilan yuvish talab etiladi. (Ambrozius, 1987; Yegorov va boshq., 1991; Tashmuxamedova, 1996; Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988).

Geterogen IET ni o'tkazishda, uning sezgirlik darajasini belgilovchi komponent bu kon'yugatlar hisoblanadi. Shu sababli

ularni sintez qilish jarayoni muhim ahamiyatga egadir. Kon'yugatlarni sintez qilish, ya'ni spesifik immun komponent bilan ferment komplekslarini bog'lash usullarini uch guruhga ajratish mumkin.

Birinchi guruhga kimyoviy bog' hosil qilish orqali sintez qilish usuli kiradi. Ikkinchi guruh usullari ferment va fermentga spesifik antitela orasidagi immunokimyoviy kompleksning hosil bo'lishiga asoslangan. Uchinchi guruh usuli esa ikki bosqichning ketma – ket o'tkazilishiga asoslangan. Birinchi bosqichda bir tarafdin ferment, boshqa tomondan esa spesifik komponent o'zaro bog'lanishida, bo'lanish konstantasi yuqori qiymatga ega reagentlar, masalan, avidin-biotin, yoki gaptin-antitela kabi reagentlar yordamida amalga oshiriladi. Ikkinchi bosqichda antigen va unga spesifik komponent orasida reaksiya o'tkaziladi (Ngo, Lenxoff, 1988; Steynis, 1988).

IET natijalarini sharhlashda kon'yugatning spesifik kompleks hosil qilgandan keyin, o'z substrati bilan reaksiyaga kirishi, oldindan tayyorlangan grafik ko'rinishida tasvirlangan kalibrovka chizig'i orqali aniqlanadi. Bunda ordinatalar o'qida  $t_1$  vaqt davomida o'lgangan fermentni o'z substrati bilan hosil qilgan signal intensivligi, absissalar o'qiga esa, aniqlanayotgan reagentning nazorat konsentratsiyasi qo'yiladi. Tahlilning sezgirligi deyilganda, aniqlanayotgan antigenning minimal konsentratsiyasi tushuniladi.

Hozirgi vaqtda qattiq fazali IET ning imkoniyatlarini kengaytirish maqsadida yangi metodlarni izlashga qaratilgan ishlar olib borilmoqda va ulardan biri yuqorida keltirilgan liposoma asosidagi immunoanaliz hisoblanadi (Rongen, 1997; Howanitz, 1988). Liposomalarning qo'llanilishi tahlilning gomogen (Tashmuxamedova, 1996; Hosoda, Yasuda, 1989; Ullman, 1987 hamda geterogen metodlarining sezgirlik darajasini va uning ba'zi xususiyatlarini yaxshilanishiga imkon yaratib berdi (Tretyakov va boshq., 1992). Bunda yuqorida aytib o'tilgan metodlar asosan, antigen – antitela kompleksining (Umeda, Yasuda, 1994; Akots et al., 1984) hosil bo'lishida faollanuvchi

komplementning litik xususiyatlariga yoki melittin kon'yugati (Freitag, Litchfield, 1984) bilan bog'lanishda paydo bo'luvchi antitelalarning ingibitorli faolligiga asoslangandir. LILA ga asoslangan metodlarning bu variantlarida ferment molekulasi odatda liposomalarning ichki qismiga inkapsullangan bo'ladi (Kubotsu et al., 1992). Hozirgi kunda ilmiy tadqiqotchilar tamonidan (2008y. Sh.S.Tashmuxeimedova) mikroporali poliamid membranalaridagi liposomal qattiq fazali tahlil tizimi ishlab chiqilgan. LILA ning bu varianti uchun IET da signalni registratsiyasi uchun yuqorida aytib o'tilganidek, tahlil sezgirligini sezilarli darajada oshishiga sabab bo'lgan ikki fermentli sistema qo'llanilgan. Ushbu usulda kon'yugatning tarkibiga kiruvchi bir ferment – fosfolipaza A<sub>2</sub> ning ta'siri liposomalarga mikrokapsullangan ikkinchi ferment -  $\alpha$ -amilaza orqali kuchaytiriladi.

Immun reaksiya ikki bosqichda amalga oshiriladi. Birinchi bosqichda immobillangan antitanalar ma'lum antigen molekulari bilan reaksiyaga kirishadi. Reaksiya o'tkazilgandan keyin, fattiq faza sirtidagi antigen – antitela komplekslariga ferment bilan nishonlangan antitelalar, ya'ni kon'yugat qo'shiladi. Kon'yugatlar antitelalar bilan antigen molekulari bog'langan komplekslarga birikadi. Ushbu jarayonda aniqlanayotgan antigenlar qanchalik ko'p bo'lsa, ular bilan shunchalik ko'p kon'yugatlar bilan bog'lanadi. Tahlilning so'ngi bosqichi fermentning substrat bilan indikatorli reaksiyalari o'tkaziladi va tashuvchi ikkinchi marta yuvilib, fermentativ faollik aniqlanadi.

Immobillangan antitana va ferment bilan bog'langan antitana orasidagi antigen “sendvich” kompleksini namoyon etadi. Aynan ikki spesifik ferment – substrat reaksiyalarni amalga oshishi LILA ning sezgirlik darajasini oshiradi.

### **Geterojen immunoenzim tahlilining “Sendvich” metodi**

“Sendvich” metodi immobillangan va nishonlangan spesifik antitanalardan foydalanishga asoslangan. Bunda ma'lum antigen

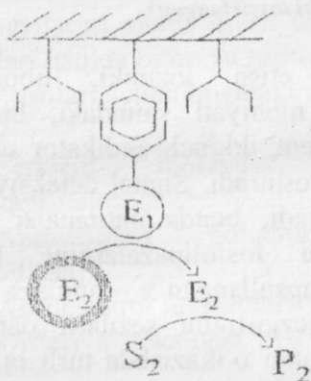
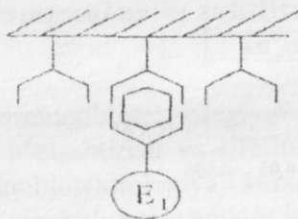
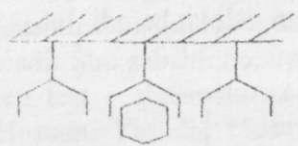
tashuvchilarda immobillangan antitanalar bilan hamda nishonlangan antitanalar bilan (antitelaning ferment bilan kon'yugatleri) bog'lanadi. Immun reaksiya ikki bosqichda amalga oshiriladi. Birinchi bosqichda immobillangan antitanalar ma'lum antigen molekulalari bilan bog'lanadi. Tashuvchi yuzasi yuvilgandan so'ng, antigen – antitela komplekslariga ferment bilan nishonlangan antitanalar qo'shiladi. Fermentlarning antitanalar asosidagi kon'yugatining antigen bilan bog'lanishi, faqatgina antigen molekulalari mavjud bo'lgan joylarda yuz beradi. Bunda tekshirilayotgan namunada antigen qancha ko'p bo'lsa, shuncha antitanalar nishonlangan fermentlar bilan bog'lanadi, natijada fermentning substrat bilan indikatorli reaksiyasini o'tkazish bosqichida uning faolligi yuqori bo'ladi. Reaksiya jarayonida tashuvchi ikkinchi marta yuvilgandan so'ng, substrat qo'shiladi va immunosorbent bilan bog'langan kon'yugatning fermentativ faolligi o'lchanadi. Imobillangan antitana va ferment bilan bog'langan antitana molekulalari orasida joylashgan antigen, "sendvich" kompleksni namoyon qiladi.

4 – rasmda liposomal IET ni o'tkazish sxemasi keltirilgan. Tahlil o'tkazish tartibi oddiy, maxsus qurilmalarni talab etmaydi. Jarayon poliamid membranalarga immobillangan antitanalarga aniqlanayotgan antigenni qo'shish bilan olib boriladi. Tahlilni boshlashdan oldin membrana ya'ni tashuvchi 30 mM  $\text{CaCl}_2$  va 5 % li etilenglikol ( sorbsiya qiluvchi bufer) ni tutuvchi 0.05 M tris – HCl, rN 6, buferi bilan muvozanatga keltiriladi. Keyin konsentratsiyasi 5ng/ml bo'lgan difteriya anatoksini qo'shiladi va 30 min. davomida inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiya qilish vaqtida namuna doimiy aralashtirilib turiladi. Ushbu jarayonda antigenlar membranalardagi immobillangan antitanalar bilan bog'lanadi. Inkubatsiyadan so'ng, membrana bog'lanmagan antigenlardan yuvib tozalanadi va 35 mkg fosfolipaza  $\text{A}_2$  li antitela kon'yugatini tutuvchi 1 ml 0.05 M tris – HCl rN 5,6 buferi quyiladi va 30 minut davomida magnit aralashtirgichda inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiya jarayonida antitanalar membranalarda antigen bilan spesifik bog'lanadi.

IET ning sezuvchanligiga ta'sir qiluvchi asosiy omillardan biri antitanalarning kon'yugatlar bilan nospesifik bog'lanishi hisoblanadi. Nospesifik bog'lanishlarni bartaraf etish uchun tashuvchi 30 mM CaCl<sub>2</sub> va 5 % li etilenglikol tutuvchi bufer eritmasi bilan yuviladi.

Ishlab chiqilgan ushbu usulning keyingi bosqichlarida liposomalarning qo'shilishi va ularning 37<sup>0</sup>S haroratda 5 minut davomida aralastirilish lozim. Bu vaqt momaynida kon'yugatning tarkibiga kiruvchi fosfolipaza A<sub>2</sub> α-amilaza fermenti inkapsullangan liposomalar qobig'ini deyarli to'liq parchalaydi. Keyingi bosqichda membranaga 0.2 ml 0.5 % li kraxmal eritmasi quyiladi va 37<sup>0</sup>S haroratda 10 min davomida gidroliz qilinadi. So'ngra gidroliz mahsulotlaridan 0,1ml olib, 10 ml ishchi yod eritmasi mavjud bo'lgan probirkaga solinadi. Kraxmal gidrolizining chuqurligi fotokalorimetrda №9 yorug'lik filtrida olingan namunaning optik zichligi aniqlanadi.

Tekshirilayotgan namunada antigenning miqdori kalibrovka egri chiziq bo'yicha aniqlanadi. Kalibrlovchi egri chiziqni tuzish uchun (5 - rasm) 0.005 dan 5000 ng/ml konsentratsiyalarga ega toza difteriyali anatoksidan foydalanish mumkin. Olingan ma'lumotlardan shu narsani kuzatish mumkinki, bunda kalibrlovchi grafikda membranada antigenlar bilan spesifik bog'langan kon'yugatning fermentativ faolligi namunada aniqlanayotgan antigen konsentratsiyasiga to'g'ri proporsional bo'ladi. Aniqrog'i aniqlash davomida, namunada fermentativ faollik qancha katta bo'lsa, aniqlanayotgan antigen miqdori ham shuncha ko'p bo'ladi.



Yuvish

Ikkinchi immun reaksiya

Yuvish

Birinchi fermentativ reaksiyasi

Antigen

Antitela

Fosfolipazali kon'yugat  
va amilaza fermenti  
inkapsullangang

liposomalar  $S_1$  – substrat  
(liposoma qobig'i)  $S_2$  –  
substrat (kraxmal)

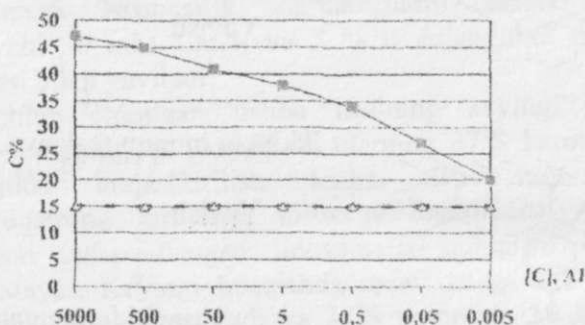
R – mahsulot

4- rasm. Qattiq fazali  
liposomal immunoenzim  
tahlilini o'tkazish sxemasi.

### Birinchi immun reaksiya

Antigen konsentratsiyasini kamayishi esa, o'z navbatida ferment faolligini kamayishiga olib keladi. Grafikdan ko'rinib turibdiki, ushbu usulda aniqlash mumkin bo'lgan antigenning konsentratsiyasining minimal qiymati 0.005 ng/ml ni tashkil etadi.

Ushbu ko'rsatgich LILAning qattiq fazali geterogen usulini yuqori sezuvchanlikka ega ekanligidan dalolat beradi.



5 - rasm. LILA metodining qattiq fazali usuli yordamida difteriya toksinini aniqlash mumkin bo'lgan kalibrlovchi egri chizig'i. (nuqtali chiziq bilan antigensiz variantdagi faollik bosqichi tasvirlangan).

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, liposomal immunoenzim tahlilining asosiy mohiyati shundaki, birinchi nishon sifatida ishlatilayotgan ferment, ikkinchi indikator sifatida qo'llanilayotgan ferment faolligini oshiradi. Signal deteksiyasida ikki fermentli sistema ishtirok etadi, bunda antitanalar bilan kon'yugatning tarkibiga kiruvchi fosfolipazalarning ta'siri multilammellyar liposomalarda inkapsullangan a - amilaza bilan kuchaytiriladi va bu esa tahlil sezgirligini sezilarli darajada oshishiga olib keladi. Ushbu jarayonni o'tkazishda turli optimal parametrlarni aniqlash muhimdir.

Yuqorida keltirilgan ma'lumotlardan kelib chiqqan holda, e'tiborni shunga qaratish lozimki, LILA metodlari IETlining umumiy geterogen usullari kabi qattiq faza ishtirokida olib borilib, yuqori sezuvchanlikka esa, bog'langan va bog'lanmagan komponentlarni ajratish jarayonlarini amalga oshirish orqali erishiladi. Yuqorida ko'p marotaba ta'kidlab o'tilganidek, zamon talabiga javob beruvchi, tibbiyotning turli sohalarida, atrof-muhit, mahsulotlar sifatining monitoringida qo'llash mumkin bo'lgan

liposoma asosidagi immuntahlilni yetarli darajada tez va avtomatlashtirilgan metodlarini ishlab chiqish dolzarb muammo hisoblanadi. Shu sababli hozirgi kunda asosiy e'tibor gomogen va geterogen test – sistemalariga qaratilgan (Hage, 1999; Gosling, 1990; Hosoda, Yasuda, 1989; Kato et al., 1996; Rongen et al., 1997).

### **Immunoenzim tahlilining o'tkazish bo'yicha metodik ko'rsatmalar**

“Immunobiotexnologiya” amaliy kursi olinayotgan bilimlarni yaxshi o'zlashtirish va sifatini oshirish maqsadida olib boriladi. “Immunobiotexnologiya” kursidagi immunoenzim tahlili bo'yicha amaliy mashg'ulotlar amaliy ishlarga qo'yilgan tartib asosida olib boriladi. Laboratoriya va amaliy mashg'ulotlarini bajarish paytida bakalavr va magistrlar ferment preparatlari va ularning kon'yugatlarini sintez qilish usullari va ularni ajratish, tozalash metodlari haqida bilim va tushunchaga, ma'lum darajada tajribaga ega bo'lishlari uchun quyidagi vazifalarni bajarishlari lozim:

1. Ferment molekulasini fosfolipidli liposomalarga mikrokapsulalash;
2. Antitelalarni poliamidli membranalariga kovalent immobillash;
3. Antitelalarni liposomalarga immobillash;
4. Difteriya toksiniga qarshi olingan antitela kon'yugatini olish.
5.  $\alpha$  – amilaza faolligini aniqlash;
6.  $\alpha$  –amilazani tozalash va fosfolipidli liposomalarga mikrokapsulalash;
7. Immun komponentlarni qattiq tashuvchiga adsorbsiyalash;
8. Ko'p qavatli liposomalarni olish;
9. Antigen va antitanalarni serologik faolligini aniqlash;
10. Difteriyali toksini aniqlash uchun qattiq fazali IET bosqichlarini bilish va unga ta'sir etuvchi omillarni o'rganish.

## ADABIYOTLAR RO'YXATI

1. Bulter, J E, (Ed), *Immunochemistry of Solid phase Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991
2. Durst R.A., Siebert S.T.A., Reeves S.G. *Immunosensor for extra-lab measurements based on liposome amplification and capillary migration.*// *Biosens. Bioelectrjn.*-1993.-V.8.-R13
3. Gosling, J.P., 1990 A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* 36, 1408.
4. Gosling, J.P., (1990). A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* 36, 1408-1427.
5. Gosling, J.P., 1990 A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.*-1990.-V. 36.-P. 1408-1420.
6. Haga M., Hoshino S., Okada H., Hazemoto N., Kato Y., Suzuki Y. An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme.// *Chem Pharm. Bull.*-1990.-V.38.-P.252-256.
7. Haga M., Itagaki H., Sugawara S., Okano T. Liposome immunosensor for theophylline.// *Biochem. Biophys Res. Comm.*-1980.-V.95.-P.187-191.
8. Haga M., Hoshino S., Okada H., Hazemoto N., Kato, M. Y., and Suzuki Y. (1990) An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme.// *Chem Pharmacol. Bull.*38 (1),252-254.
9. Israel H.A. Immunomagnetic separation: A tool microbiology.// *Amer. Biotechnol. Lab.*-1994.-12, N6.-P.50=52.
10. Kubotsu K., Goto S., Fujita M. et al. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonulsant drugs.// *Clin. Chem.*-1992.-V.38.-P.808
11. Kubotsu K., Goto S., Fujita M., Tucluya H., Kiada M., Takano S., Matsuura S., Sakurabayashi I. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonulsant drugs.// *Clin. Chem.*-1992.-V.38.-P.808-812..

12.Kung V.T., Canova-Danvis E. Liposome immunoassay reagent and method.// Pat. 4622294 SShA, - N 699860; Zfyavl.8.02.85; Opubl. 11.11.86; NKI 435/7

13.Pashkov V.N., Tsurupa G.P., Griko N.B., Skopinskaya S.N., Yarkov S.P. The use of streptavidin-biotin interaction for preparation of reagents for compliment-dependent liposome immunoassay of proteins: detection of latrotoxin.// Anal Biochem 1992.-V.207.-p.341-347.

14.Poul A., Madan S., Vasandani V.M. Ghosh P.C. Bachhawat B.K. Liposome immune lysis assay (LILA) for gelonin.// J Immunol Methods.-1992.-v.148.-P.151-158.

15.Umeda M., Yasuda T. A novel liposome immune lysis assay (LILA) for determination of GRP antigen using two monoclonal antibodies recognizing different antigenic determinants.// Acta Med Okayama.-1994.-V.48.-P.299.

16.Vingerhoeds, M.H., Storm, G., and Crommelin, D.J.A.(1994) Immunoliposomes in vivo. Immunomethods. 4,259-272.

17.Watarai S., Sugimoto C., Onuma M., Kobayashi K., Yasuba T. Analisis of neutral glycosphingolipids of Theileria serganti piroplasmis.// J Vet Med Sci.-1996.-v.58.-P.165-168.

18.Wijesuriya D.C., Charlis P., Ligler F., Ezzell J. Anovel approach for the monitoring of biological warfare agent bacillus anthracis using fiber-optic based immunosensors.//Sci. Conf. Chem. Def. Res., Aberdeen, Md, 16-19 Nov., 1993: Abstr. Dig. / US Army Edgewood Res., Dev. and Eng. Cent..-[Aberdeen(Md)].-1993.-C.14.

19.Yegorova A.M, Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza. M.: Vysshaya shkola, 1991.-176 s.

20.Meshandin A.G., Shmakova S.V. Xemosorbciya v sinteze tverdofaznykh bioligandov dlya geterogenного immunofermentnogo analiza.//Biotexnologiya .-1994, N 4.- C.31-36.

21.Ngo T.T., Lenxoff G. *Immunofermentnyy analiz*. M.: «Mir», 1988.

22.Preparaty fermentnye./ Metody opredeleniya amilolicheskoy aktivnosti. M., 1975.

23.Gosling, J.P., (1990). A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* 36, 1408-1427.

24.Gosling, J.P., 1990 A decade of development in immunoassay methodology.// *Clin. Chem.*- 1990.- V.36.- P.1408-1420.

25.Haga M., Hoshino S., Okada H., Hazemoto N., Kato Y., Suzuki Y. An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme.// *Chem Pharm. Bull.*- 2010.- V.38.- P.252-256.

26.Haga M., Itagaki H., Sugawara S., Okano T. Liposome immunosensor for theophylline.// *Biochem. Biophys Res. Comm.*- 1980.- V.95.- P.187-191.

27.Haga, M., Hoshino, S., Okada, H., Hazemoto, N., Kato, M. Y.,and Suzuki, Y. (1990) An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme. *Chem. Pharmacol. Bull.* 38(1), 252-254.

28.Israel H.A. Immunomagnetic separation: A tool microbiology.// *Amer. Biotechnol. Lab.*. - 1999. - 12, N 6. - R. 50 - 52.

29.Kubotsu K., Goto S., Fujita M. et al. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonvulsant drugs.// *Clin. Chem.*-2001.- V.38.- P.808

30.Kubotsu K., Goto S., Fujita M., Tucluya H., Kida M., Takano S., Matsuura S., Sakurabayashi I. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonvulsant drugs.// *Clin. Chem.*- 2000- V.38.- P.808-812..

## MUNDARIJA

KIRISH.....	3
1. ANTIGENLAR, ANTITANALAR VA ULARNING XUSUSIYATI, FUNKLIYALARI.....	6
1.1. Gibridom texnologiya asosida monoklonal antitanalar olish.....	10
1.2. Turli antigenlarni va viruslarni diagnostika qilishda qo'llaniladigan immunologik testlar.....	15
1.3. Diffuzion testlar.....	18
1.4. Agglyutinatsiya reaksiyalari.....	20
1.5. Immunoenzim tahlilining mohiyati.....	24
1.6. Immunoenzim tahlilini amalga oshirish qoidalar.....	27
1.7. Immunoenzim tahlilida ferment effektorlarini qo'llash.....	28
2. IMMUNOENZIM TAHLILNING USULLARI.....	31
2.1. Immunoenzim tahlilining titrometrik usuli.....	31
2.2. Raqobatlashish prinsipi.....	32
2.3. "Səndvich" prinsipi.....	33
2.4. Əkranlashtirish / to'sish / prinsipi.....	33
3. IMMUNOENZIM TAHLILINI O'TKAZISHDA QO'LLANILADIGAN TURLI ĖNDASHUVLAR.....	35
3.1. Immunoenzim tahlili metodlarining klassifikatsiyasi.....	38
3.2. Gomogen immunoenzim tahlili.....	46
3.3. Liposomal immuntahlil.....	51
4. OB'JEKT VA TADQIQOT USULLARI.....	53
4.1. Amilaza texnik ferment preparatini tozalash.....	53
4.2. $\alpha$ -amilaza fermentini fosfolipidli liposomalarga inkapsullash.....	63
4.3. Fosfolipidlarni tuxum sarig'idan ajratish usuli.....	61
4.4. Poliamid membranalariga difteriya toksiniga qarshi olingan antitanalarni kovalent immobillash.....	62
4.5. Liposomalarga antitanalarni immobillash.....	63
4.6. Fosfolipaza A <sub>2</sub> fermenti asosida kon'yugat sintez qilish.....	63
4.7. $\alpha$ -amilaza fermenti faolligini aniqlash.....	64
4.8. $\alpha$ -amilaza ferment preparatini fosfolipidli liposomalarga mikrokapsullash.....	65
4.9. Bir necha qavatli liposomalarni olish.....	66
4.10. Liposomalarga antitanalarni immobillash.....	67
5. DIFTERIYA TOKSININI LIPOSOMA ASOSIDAGI IMMUNOENZIM TAHLILI USULI ĖRDAMIDA ANIQLASH.....	69
5.1. Geterogen immunoenzim tahlilining "Səndvich" metodi.....	72
5.2. Immunoenzim tahlilini o'tkazish bo'yicha metodik ko'rsatmalar.....	77
Adabietlar ro'yxati.....	78



SH. S. TASHMUHAMEDOVA

# IMMUNOBIOTEKNOLOGIYA

*O'quv qo'llanma*

**Toshkent - "Innovatsiya-Ziyo" - 2020**

*Muharrir: F. Xolsaidov*

*Texnik muhaarrir: Q. Mamiraliyev*

*Nashriyot litsenziyasi AI №023, 27.10.2018.*

*Bosishga 30.11.2020. da ruxsat etildi. Bichimi 60x84.*

*"Times New Roman" garniturası.*

*Ofset bosma usulida bosildi.*

*Shartli bosma tabog'i 6. Nashr bosma tabog'i 5.12.*

*Adadi 100 nusxa.*

*"Innovatsiya-Ziyo" MCHJ matbaa bo'limida chop etildi.*

*Manzil: Toshkent shahri, Farhod ko'chasi, 6-uy.*

ISBN 978-9943-6791-3-9



9 789943 679139