პრეზენტაცია

პატარასტუდიოს შეუძლებელია დასაბამის გარეშე ...

დასაბამისთვის კი ჩვენი ფრესკები შეიტანეთ!

R-Biopharm AG

ფერმენტაციული ბიოანალიზი

ფერმენტული ანალიზი ეს არის შუალედური კატაბოლური პროდუქტების ანალიზი ფერმენტების საშუალებით.

⇓

შაქრები

მჟავები

სპირტები

და სხვა...

- 1954წ. - დაიწყო ფერმენტების გამოყენება კლინიკო-ქიმიურ ლაბორატორიებში.
- 1970წ. - დაიწყო ფერმენტების გამოყენება კვებით დიაგნოსტიკაში.
- 1975წ. - პირველად გამოჩნდა Boehringer Mannheim-ის ტესტ კომპლექტები საკვები პროდუქტებისა და ცხოველთა საკვების ანალიზისათვის.

ფერმენტული მეთოდები კანონმდებლებობით:

- A Codex Alimentarius Austriacus
- B Moniteur Belge-Belgisch Staatsblad
- CH Schweizer. Lebensmittelbuch
- D Lebensmittel-Gesetz
- E Boletin Oficial del Estado
- EU Commission Regulation
- I Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana
- NL Warenwet
- S Statens Livsmedelsverk
- SF Methods Register of the State Technical Centre in Finland
- USA AOAC approval

ნორმირებული ეტალონ-მეთოდები

- B Norme Belge – Belgische Norm NBN
- D Deutsches Institut für Normung DIN
- F Norme Française NF
- NL Nederlandse Norm NEN
- GB British Pharmacopoeia BP
- GUS Russian Standard GOST
- EU European standards EN
- ISO International Standards Organization

საერთაშორისო ორგანიზაციების რეკომენდაციები

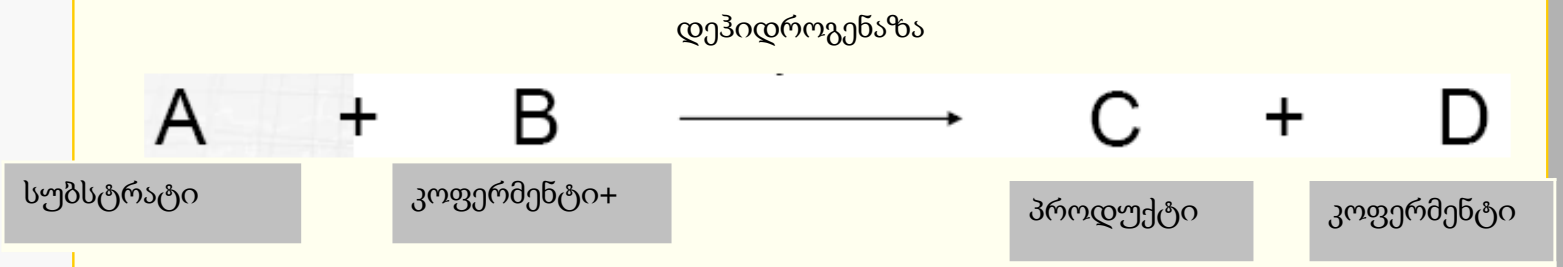
A.I.J.N.	Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community
ASBC	American Society of Brewing Chemists
EBC	European Brewery Convention
ICUMSA	International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis
IDF/FIL	International Dairy Federation
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysen-Kommission
NMKL	Nordisk Metodikkommittée
OICCC	Office International du Cacao, du Chocolat et de la Confiserie
OIV	Office International de la Vigne et du Vin

ძირითადი პრინციპები

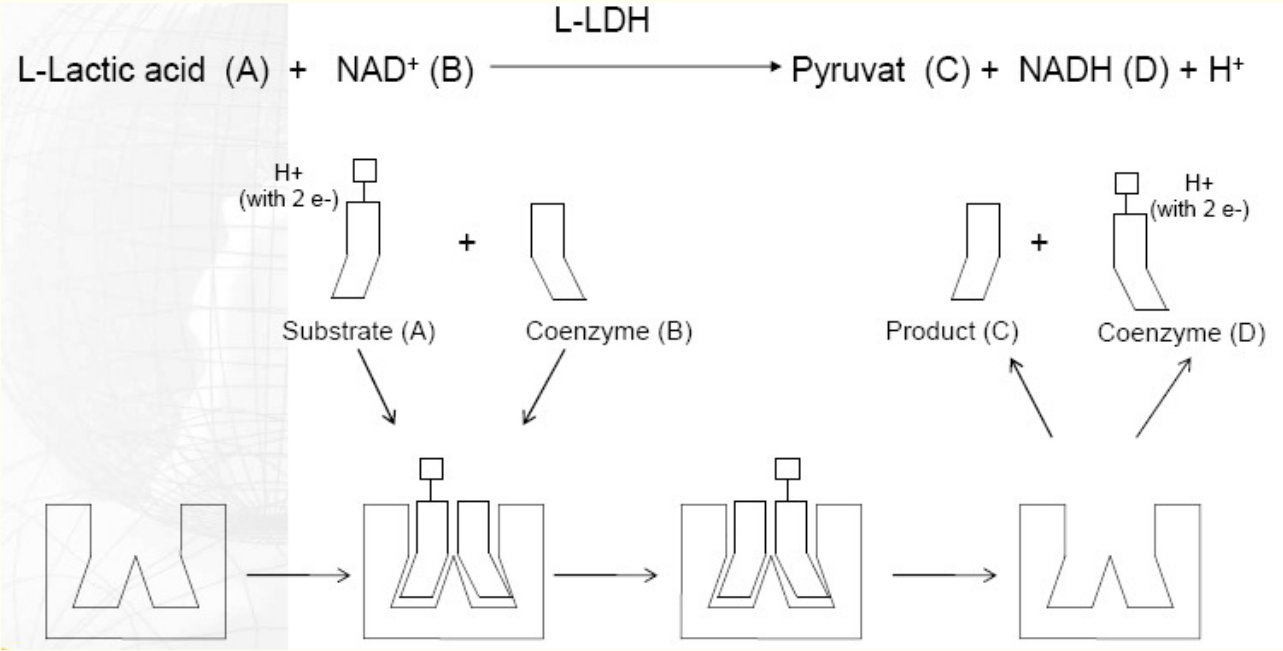
- ფერმენტები წარმოადგენენ ადამიანის ყველაზე მნიშვნელოვან ცილებს
- 10^8-10^{11}-ჯერ აკატალიზებს რეაქციებს
- ხარჯის გარეშე აკატალიზებს რეაქციებს.
- მკაცრად სპეციფიურებია

ტესტირების პრინციპი

- ფერმენტები აკატალიზებს გარკვეული სუბსტრატის გარდაქმნის სპეციფიურ რეაქციას
- კოფერმენტი ძირითადად NAD (P) და მოქმედებს როგორც H^+ აქცეპტორი
- წარმოქმნილი NADH რაოდენობა სინჯში სუბსტრატის რაოდენობის ექვივალენტურია



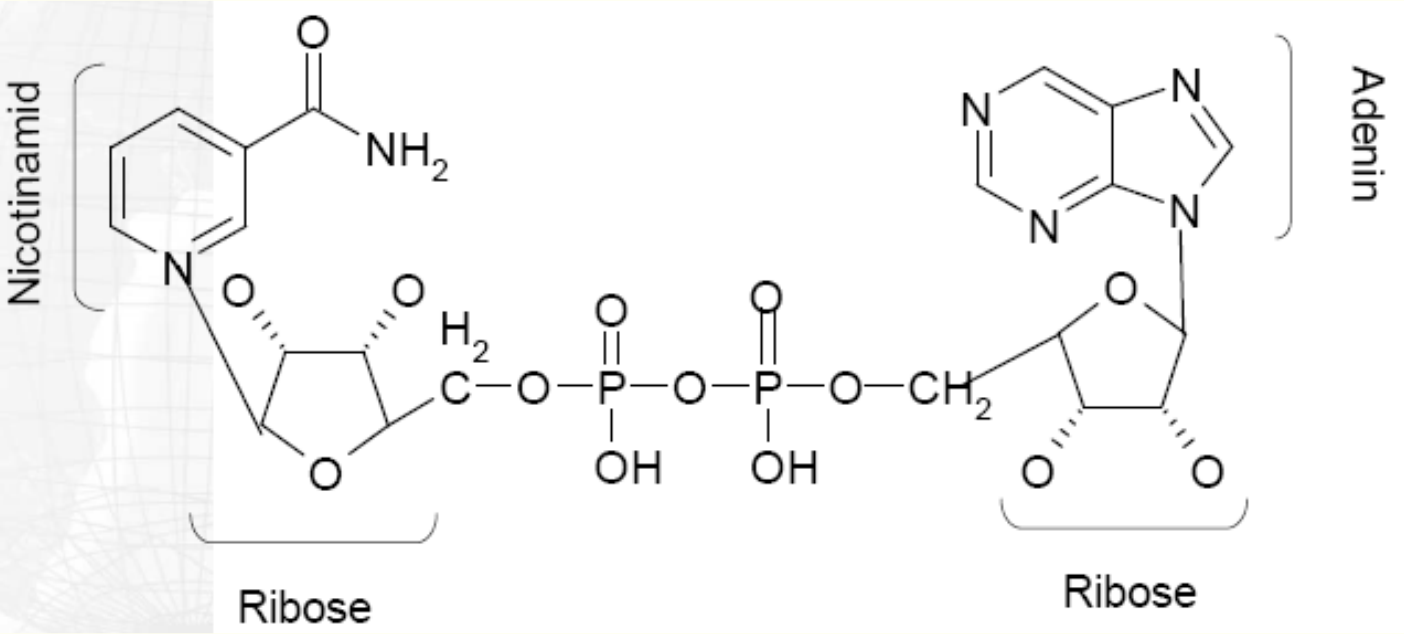
ფერმენტი და კოფერმენტი



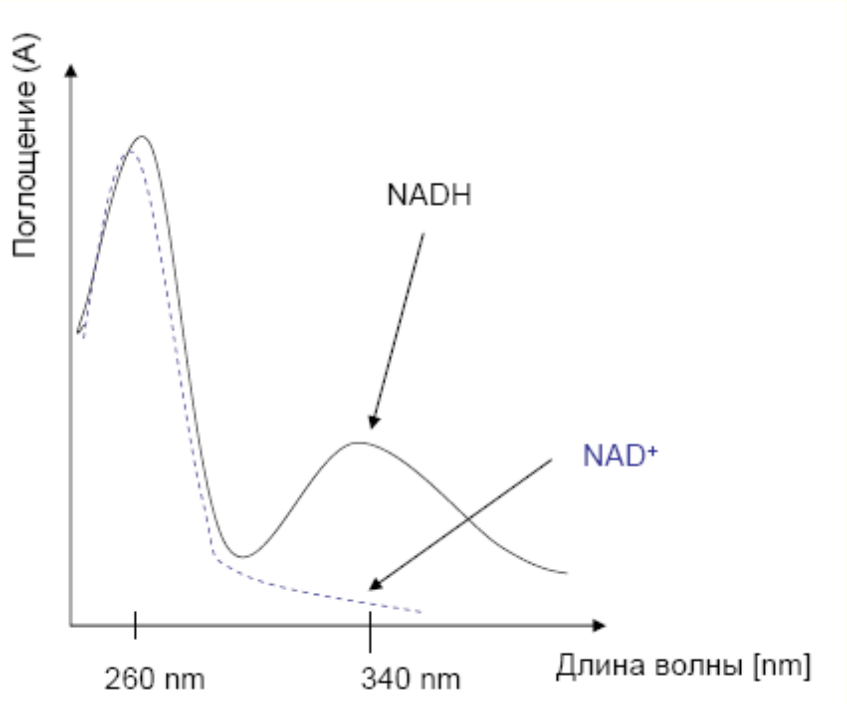
- ოთახის ტემპერატურის 10^0-ით მატება ზრდის რეაქციის სიჩქარეს ორჯერ
- ოთახის ტემპერატურის 10^0-ით კლება ამცირებს რეაქციის სიჩქარეს ორჯერ
- რეაქციის სიჩქარის ტემპერატურული ოპტიმუმი -37^0C (ამის ზევით სიჩქარე კვლავ მცირდება)

კოფერმენტი NAD ან NADP -

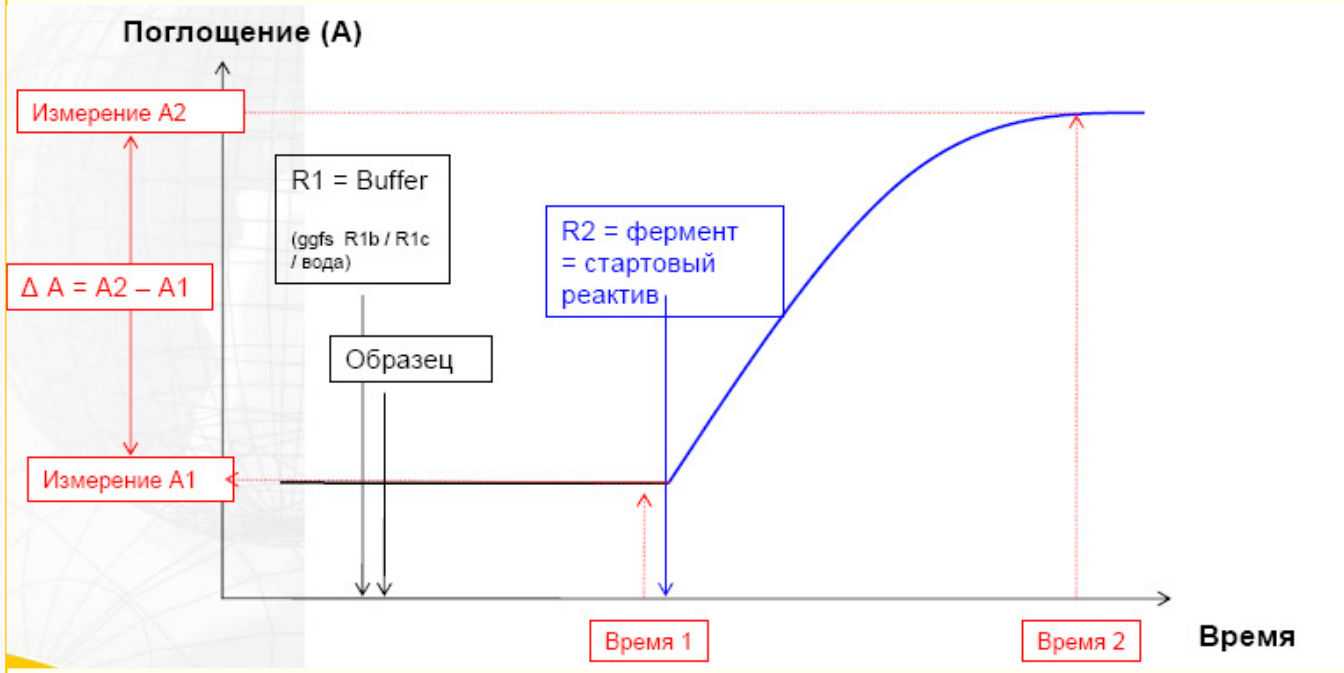
ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეოტიდი (ფოსფატი)



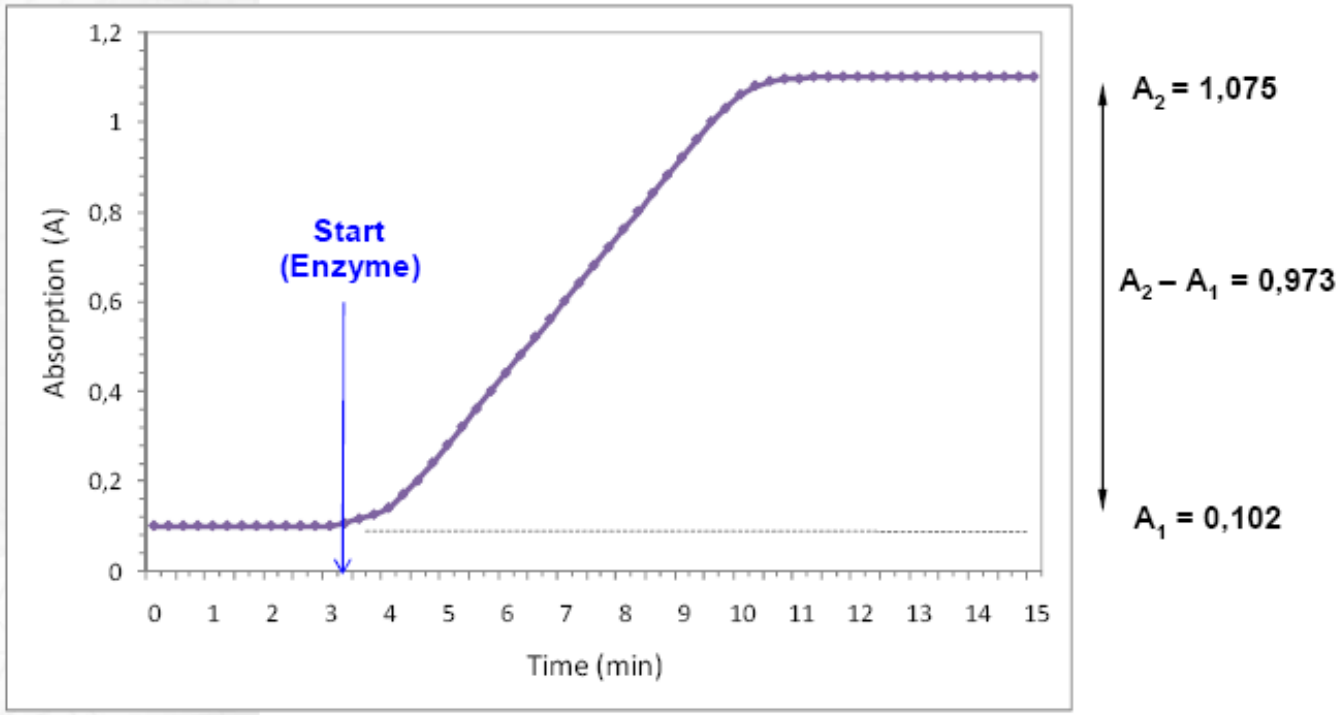
NADH და NAD+-ის შთანთქმა



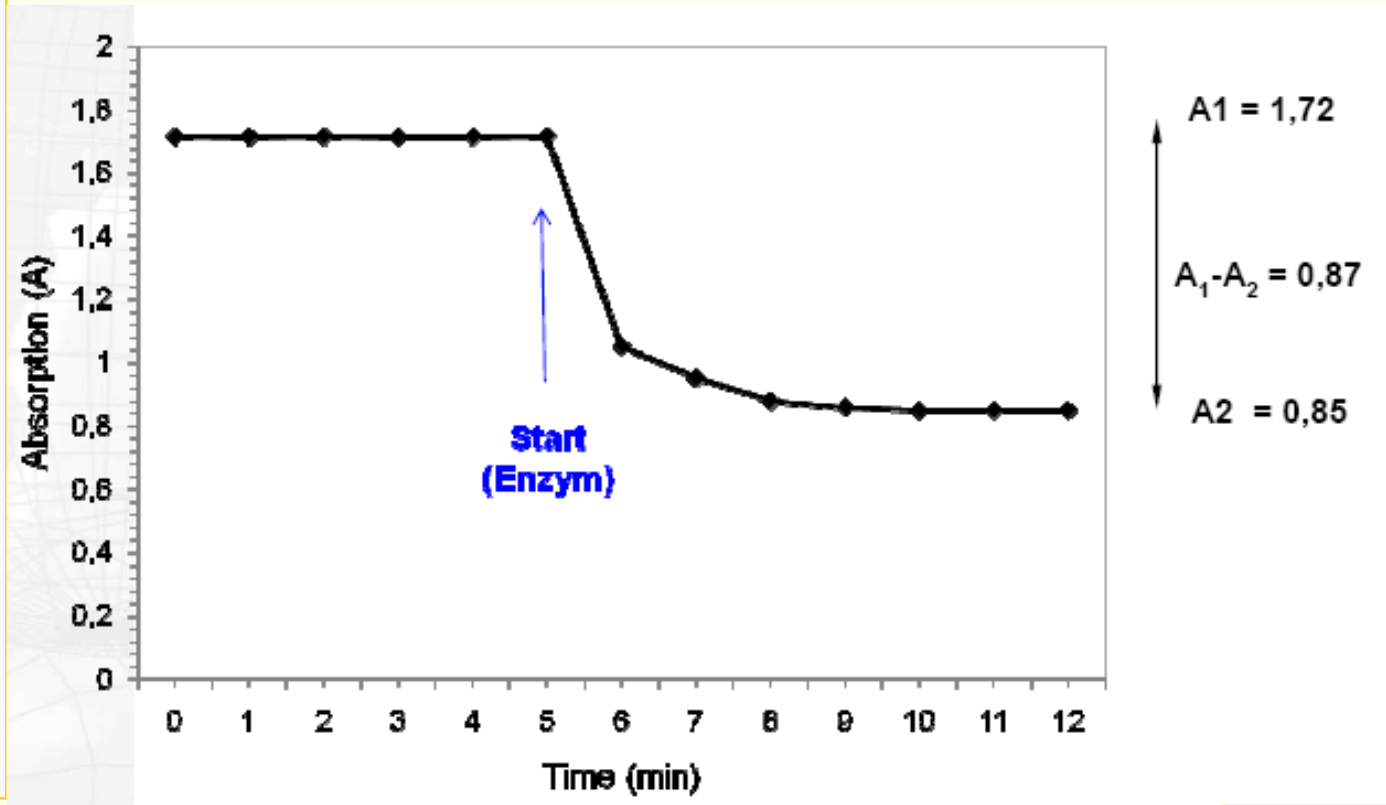
გაზომვის პრინციპი



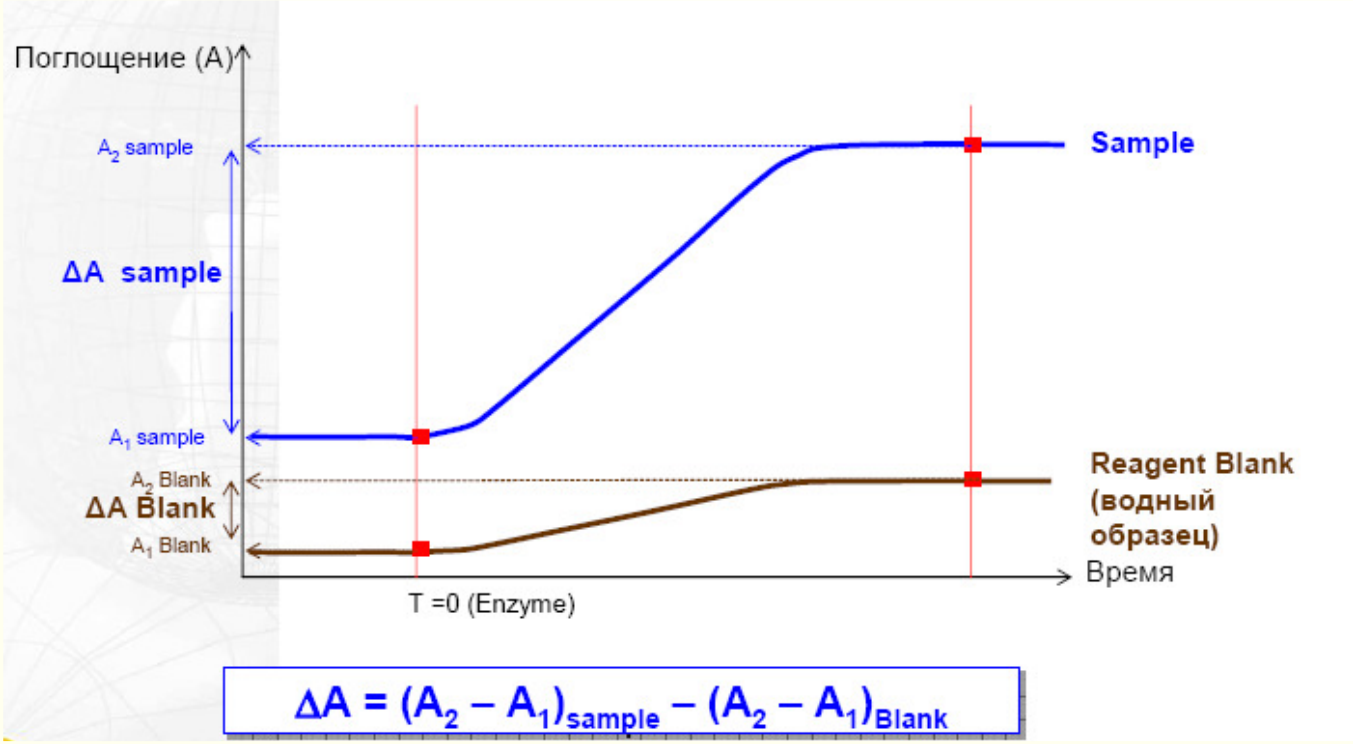
სარეაქციო მრუდი NAD→ NADH



სარეაქციო მრუდი NADH → NAD



სარეაქციო ბლანკი (სუფთა)



$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{sample} - (A_2 - A_1)_{Blank}$$

ლამბერტ-ბერის კანონი

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

სადაც:

c - კონცენტრაციაა g/l
V - საბოლოო მოცულობა ml
v - სინჯის მოცულობა ml
M - საკვლევი ნიმუშის მოლეკულური მასა g/mol
d - ოპტიკური გზა cm
ε - NADH-ის შთანთქმის კოეფიციენტი, 6.3 (l x mmol $^{-1}$ x cm $^{-1}$) 340nm-ზე
სინჯის დიდი მოცულობის შემთხვევაში შეცვალეთ ფორმულა!

სინჯის განზავება ან მოცულობის გაზრდა

- უნდა შესრულდეს ლამბერტ-ბერის კანონი
$\Delta A<1.0$ (A)

•სიგნალი უნდა იყოს ძლიერი, რომ გამოირიცხოს შეცდომები გაზომვისას
$\Delta A>0.1$ (A)

$\Delta A>1$	$\longrightarrow$	განაზავეთ სინჯი
$\Delta A<0.1$	$\longrightarrow$	გაზრდეთ სინჯის მოცულობა

ქრომოგენური ტესტები

შემდეგ ტესტებში კოფერმენტის **NAD(P)** ნაცვლად გამოყენებულია ქრომოგენი

- L-Ascorbic acid (MTT-Formazan, 578 nm)
- Cholesterol (Lutidine, 405 nm)
- L-Glutamic acid (Formazan, 492 nm)
- D-3-Hydroxybuttyic acid (Formazan, 492 nm)
- D-Sorbitol/Xylitol (Formazan, 492 nm)

ყურადღება! ქრომოგენი ძალიან მგრძნობიარეა, ამიტომ რეაქცია უნდა მიმდინარეობდეს სიბნელეში!

ტესტ კომპლექტის შემადგენლობა

კომპლექტის შეიცავს ყველა საჭირო რეაგენტებს

- ფერმენტებს და კოფერმენტებს (გაწმენდილი)
- ბუფერულ ხსნარებს
- მარილებს (ხანდახან საჭიროა როგორც აქტივატორები)
- უმეტესობა შეიცავს საკონტროლო ნიმუშს

არ არის აუცილებელი ხსნარის მომზადებისას ძლიერი შენჯღრევა, საკმარისია ფრთხილად არევა და ცოტა ხნით დაყოვნება!

ხარისხის კონტროლი

- ყოველი ცდის გაშვებისას უნდა ტესტირდეს მინიმუმ ერთი კონტროლი
- ძირითადად კონტროლები თან ახლავს კომპლექტს, მხოლოდ აცეტალდეჰიდისა და ასკორბინის მჟავას და სულფიტის შემთხვევაში მათი არასტაბილურობის გამო კონტროლები ცალკეა შესაკვეთი.
- კონტროლის აღდგენა - 100±5%
- თუ აღნიშნული შედეგი არ მიიღწევა შეამოწმეთ ტესტირების პროცედურა.
- იკრძალება შედეგების გადათვლა კონტროლის მაჩვენებლის მაგ. 14%-იანი გადახვევისას.

მოწყობილობა

- ფერმენტული ტესტების კომპლექტი
- ფოტომეტრი
- განცალკევებადი უჯრედები და ჩარჩო ჩასამაგრებლად
- შპატელები
- პიპეტები
- დისტ. წყალი

მნიშვნელოვანია რეგულარულად შეამოწმოთ თქვენი პარატურის გამართული მუშაობა.

სინჯების მომზადება

ზოგადი მითითებანი:

- დაქუცმაცება და ჰომოგენიზაცია
- წყლით ან სხვა რამით ექსტრაქცია
- განზავება (შეიძლება გამორიცხოს სხვა საფეხურები)
- ფილტრაცია ან ცენტრიფუგირება
- დეპროტეინიზაცია (მაგ. $HClO_4$)
- Carrez რეაქცია (რძე)
- ცხიმების მოცილება
- ნეიტრალიზაცია
- გაუფერულება (ინტენსიური შეფერვისთვის E1>0.5)

არსებობს სხვა მეთოდებიც, მაგრამ გამოიყენეთ მხოლოდ შესაფერი !
რაც შეიძლება ნაკლები საფეხურები!

გადატვირთვა და შიდა კონტროლი

- გადატვირთვა

  რეაქციის დამთავრებისას სინჯარაში ემატება კონტროლი და რეაქცია ხელახლა გაიშვება

  იზომება A3 და A2, ხოლო კონტროლი უნდა აღდგეს (g/l±5%).
- შიდა კონტროლი

  საკონტროლი სინჯი ტესტირდება იგივე სინჯარაში, რომელშიც საკვლევი.

  გამოიყვანება და გადამოწმდება OD-ს აღდგენა.
- ეს ორი მეთოდი განსხვავდება არსებული ტრადიციული კონტროლის მეთოდისგან

  კონტროლი ერევა იმ ცალკეულ სინჯებს, რომელიც საეჭვოა ან სადაც არსებობს ჯვარედინი რეაქცია.

  ეს იძლევა ინჰიბიტორების არსებობის დადგენის საშუალებას ცალკეულ სინჯებში.

ზოგადი პროცედურა

1. რეაქტივების წარმოება
   R-Biopharm წარმოადგენს Enzytec-ის ფერმენტული ხაზის ტესტების მწარმოებელს.

2. ტრანსპორტირება და შენახვა
   ტესტები შესაძლებელია გზაში იყოს ოთახის ტემპერატურაზე.
   ინახება 2-8^{0}C.
   განზავებული ბიდისტ. წყლით ინახება 2-8^{0}C.

3. ხარისხის კონტროლი
   კონტროლის აღდგენა უნდა მოხდეს ±5%. წინააღმდეგ შემთხვევაში შეამოწმეთ აპარატურა და ცდის მსვლელობა.

4. სინჯის ტიპი, ცდის მომზადება და სამუშაო

სინჯის მომზადება

ტესტების უმრავლესობისთვის ტესტირების პროცედურა ძალიან მარტივია, მაგრამ გარკვეულ სირთულეს წარმოადგენს სინჯების სწორი მომზადება.

სინჯთა მომზადების მეთოდები ძალიან სპეციფიურია ინდუსტრიული სექტორისთვის (რძე, ღვინო, ხილის წვენები, ხორცი, კვერცხი და ა.შ.). აღნიშნული მეთოდიკები მუშავდება და გროვდება თვით მწარმოებლებისა და ლაბორატორიების მიერ და შემდეგ პოულობს საერთაშორისო აღიარებას.

ტესტირების პროცედურა

1. ინახება 2-8^{0}C
2. მნიშვნელოვანი ფაქტორია წყლის ხარისხი
3. ტესტირების წინ რეაგენტები დააყოვნეთ ოთახის ტემპერეტურაზე.
4. სინჯთა განზავებისას ზუსტად მისდიეთ ინსტრუქციებს.
5. დაიცავით დატანის პრინციპი (ზევიდან ქვევით)
5. გამოიყენეთ საკონტროლო რეაგენტები (სტანდარტები)
6. ზუსტად დაიცავით ინკუბაციის დროითი ინტერვალები.
7. თუ შესაძლებელია გადატვირთეთ ანალიზი.

ყველაზე ხშირად დაშვებადი შეცდომები:

• ტესტ კომპლექტთან და მის შენახვასთან დაკავშირებული მანიპულაციები (მაგ. განზავების შეცდომა, წყლის ხარისხი და ა.შ.)
• საკონტროლო ხსნარის დამზადება (მაგ. თუ ხელით მზადდება ხსნარები მაგ.- pH, სისუფთავე და ა.შ.)
•გაანგარიშების შეცდომები
•სპექტროფოტომეტრის გაუმართაობა
•პიპეტების სიზუსტე

საკონტროლო ხსნარების აღდგენა = 100±5%

გმადლობთ ყურადღებისთვის!