# Jaunojo tyrėjo
# VADOVAS

a b c d

# JAUNOJO TYRĖJO VADOVAS

©

Projekto
*Mokinių jaunųjų tyrėjų atskleidimo ir ugdymo sistemos sukūrimas*
leidinys

Lietuvos mokinių informavimo ir techninės kūrybos centras

Mokslinis redaktorius
Vladas Vansevičius

Leidinio sudarytoja
Rima Stonkutė

Leidinį rengė
Aldona Krutinienė
Dalia Ignatjeva
Ieva Šablevičiūtė
Saulė Markevičiūtė

© Lietuvos mokinių informavimo ir techninės kūrybos centras, 2011
© Dizainas Gitana Vaskelienė

Projekto *Mokinių jaunųjų tyrėjų atskleidimo ir ugdymo sistemos sukūrimas* leidinys
Projektą bendrai finansuoja Lietuvos Respublika ir Europos Sąjunga

ISBN 978-9955-899-07-5
internete
ISBN 978-9955-899-08-2

„Bralei, seseris, imkiet mani ir skaitikiet
Ir tatai skaitidami permanikiet“

Martynas Mažvydas, „Katekizmas“

# Pratarmė

Mieli mokiniai, gerbiami mokytojai, „Jaunojo tyrėjo vadovas“ skirtas jums, jau mokykloje bandantiems pažinti pasaulį moksliniais metodais. Čia rasite įvairių patarimų ir rekomendacijų, kaip rinktis įdomią mokslinio darbo temą, kaip planuoti mokslinį tyrimą, kaip ugdyti kūrybingumą, ir daug kitos naudingos informacijos. Leidinyje aptarti metodiniai mokslinio darbo pagrindai ir pateikti įvairių mokslo krypčių darbų, tinkamų jauniesiems tyrėjams, pavyzdžiai.

„Jaunojo tyrėjo vadovas“ sudarytas iš keturių tomų, kurių kiekvienas suskirstytas į atskirus didesnius ar mažesnius tarpusavyje nesusietus skyrius. Todėl vadovą galima pradėti nagrinėti nuo bet kurio tomo ir nuo bet kurio skyriaus ar pasinaudoti tik vienu iš jų. Tikriausiai nė vienam jaunajam tyrėjui ar jo vadovui nebus aktualu aprėpti visą čia atspindėtą mokslo įvairovę. Tačiau skyriai, aprašantys bendras įvairioms mokslo kryptims metodikas, bus naudingi daugumai.

Atskirų vadovo skyrių autoriai – įžymūs Lietuvos mokslininkai, turintys pedagoginio darbo patirties. Tikimės, jų įžvalgos jums bus naudingos.

Tokiais skambiais epigrafo žodžiais, kadaise žmones žadinusiais ir mąstyti kvietusiais, kviečiame ir mes skaitytojus į mokslo šviesą: skaitykite, bandykite, tobulėkite!

Vladas Vansevičius

# Turinys

**Analitikos uždavinys ir statistiniai metodai laboratorijoje . . . . . 5**
Valdas Laurinavičius

**Baltymų tyrimas . . . . . 35**
Vida Časaitė, Rolandas Meškys

**Šešiakojo roboto judėjimo tyrimas . . . . . 123**
Tomas Luneckas

# Analitikos uždavinys ir statistiniai metodai laboratorijoje

Valdas Laurinavičius

# Turinys

1. Analitikos uždavinys . . . . . 9

2. Laboratorinė statistika . . . . . 14
2.1. Paklaidos . . . . . 14
2.2. Sistemingosios paklaidos . . . . . 15
2.3. Atsitiktinės paklaidos . . . . . 17
2.4. Šiurkščių klaidų įvertinimas . . . . . 21
2.5. Regresinė analizė . . . . . 22
2.6. Netiesioginių matavimų metrologinis vertinimas . . . . . 26
2.7. Ryšio tarp dviejų duomenų masyvų vertinimas . . . . . 27

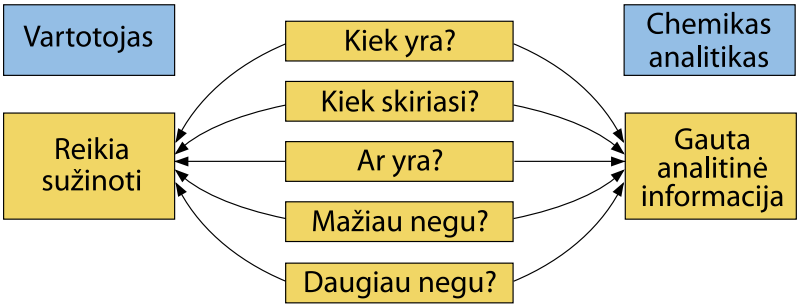
3. Uždaviniai . . . . . 29

# 1. Analitikos uždavinys

Analitikos uždavinys yra informacijos apie kokią nors sistemą ar cheminį junginį gavimas. Dažniausia šios informacijos reikia vartotojui, kuris kreipiasi į analitiką prašydamas ištirti jo pateiktą medžiagos mėginį. Vartotoją gali dominti labai įvairūs klausimai. Pavyzdžiui, kiek šiame cukriniame runkelyje yra cukraus? Ar tikrai šis vynas pagamintas Bordo (Bordeaux) regione, kaip nurodyta etiketėje? Ar yra šiuose žemės riešutuose aflatoksinų? Ar tikrai šiame kraujo mėginyje yra mažiau nei 0,4 promilės alkoholio? Ar šiose daržovėse sunkiųjų metalų koncentracija neviršija leidžiamos? Tai klausimai, kurie svarbūs vartotojui. Nuo cukraus kiekio cukriniuose runkeliuose priklauso jų kaina. Vyno, sulčių ir kitų gėrimų autentiškumo identifikavimas būtinas kovojant su falsifikatais. Jei aflatoksinų rasta maisto produktuose, jų negalima tiekti į parduotuves. Jei sunkiųjų metalų, trąšų ar kitų nepageidautinų chemikalų koncentracija maisto produktuose didesnė už leidžiamą, tokie produktai neturi patekti į rinką, ir t. t.

Chemikas analitikas vartotojo suformuluotą uždavinį turi transformuoti į analitinį uždavinį. Jei keliamas klausimas, koks šių vynuogių cukringumas, tai reiškia, kad vartotojas nori žinoti, kokia yra suminė visų 10 gliukozės izomerų, 8 fruktozės izomerų ir sacharozės koncentracija vynuogėse. Tam chemikas analitikas turi parinkti tinkamą analizės metodą, kuris leistų kiekybiškai nustatyti šių cukrų koncentracijas. Gautus rezultatus jis turi transformuoti į vartotojui suprantamą formą ir pateikti atsakymą. Analitinį uždavinį galima pavaizduoti schemiškai (1 pav.).

Nuo to, kaip vartotojas ir chemikas analitikas sugebės vienas kitą suprasti, iš esmės priklauso analitinio darbo sėkmė. Daug klaidų ir nesusipratimų įvyksta dėl to, kad vartotojas nesugeba suformuluoti užduoties analitikui, o analitikas nesugeba savo darbo rezultatų pateikti vartotojui




**1 pav.** Analitinio uždavinio principinė schema.

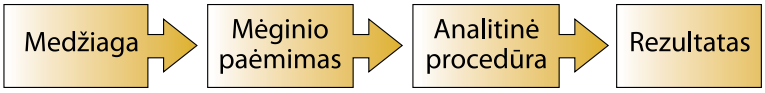
suprantama kalba. Pavyzdžiui, gydytoją domina cholesterolio koncentracija kraujyje. Jai nustatyti kraujo mėginį jis siunčia į laboratoriją. Tačiau laboratorijoje turima fotometrine analitine įranga negalima atlikti matavimų tokioje neskaidrioje terpėje kaip kraujas. Todėl laboratorijoje kraujas centrifuguojamas atskiriant kraujo ląsteles ir analizuojama jo skaidri skystoji dalis, vadinama plazma. Tačiau kraujo forminiai elementai gali užimti net apie pusę kraujo tūrio. Todėl plazmoje analitės[1] koncentracija bus atitinkamai didesnė. Gydytojas, gavęs informaciją apie analitės koncentraciją ne kraujyje, o kraujo plazmoje (arba serume), tik atsižvelgęs į kraujo hematokritą[2] gali priimti teisingą sprendimą. Tačiau yra klausimų, į kuriuos analitikas negali atsakyti. Pavyzdžiui, į klausimą, ar genetiškai modifikuoti augalai kenkia sveikatai, negali atsakyti nė vienas analitikas. Kita vertus, jei analitikas į vartotojo klausimą, ar šie sojų miltai yra pagaminti iš genetiškai modifikuotų sojų, pateiks jam chromatogramas, tai vargu ar bus vaisingas jų bendradarbiavimas.

Sprendžiant analitinį uždavinį, veiksmų eigą galima pavaizduoti schemiškai (2 pav.). Pirmiausia turime analizuojamą medžiagą. Tada iš jos paimame mėginį ir jį paruošiame analizei. Po to atliekame analitinę procedūrą ir gauname rezultatą. Kiekvienas šių etapų turi atitikti specifinius reikalavimus ir savo protokolą. Mėginio paėmimo protokolas labai svarbus ir gali nulemti analizės kokybę. Pavyzdžiui, dauguma kraujo mėginių biocheminiams tyrimams turi būti paimti iš paciento rytą jam nevalgius, ir pan.

Analitinius metodus galima suskirstyti į dvi dideles grupes. Tai **kokybinės analizės metodai** ir **kiekybinės analizės metodai.** Kokybinės analizės metodai turi atsakyti į klausimą „ar yra?“ Ar yra šiame mėginyje švino? Ar yra šiame mėginyje patologinių mikroorganizmų? Šiais laikais visuomenė nori kontroliuoti maisto produktus, kurie patenka ant stalo. Profilaktinė medicina tampa kasdieniu reiškiniu. Atlikti visų produktų siuntų kiekybinę analizę ir visų pacientų išsamią patikrą būtų labai brangus ir ilgas procesas. Šiam uždaviniui supaprastinti naudojami kokybinės analizės metodai. Jie turi būti paprasti, greiti ir patikimi. Kokybinės analizės metodai paprastai naudojami tiriamų objektų masyvui suskirstyti į dvi dalis: įtariamus ir neįtariamus. Užkrėstų, vartojimui netinkamų produktų paprastai būna labai maža dalis. Tačiau jei tokių galimai užsikrėtusių objektų atsiranda, išsamiai jų analizei naudojami brangūs kiekybiniai metodai.

[1] Analitė – mėginio komponentas, kurio kiekį reikia nustatyti.

[2] Hematokritas – eritrocitų užimamo tūrio dalis kraujyje, išreikšta procentais.




**2 pav.** Analitinės procedūros etapai.

Kiekybiniai metodai turi atsakyti į klausimą „kiek yra?“ Kiekybinės analizės metodus galime skirstyti į dvi dideles grupes. Viena grupė – **konkretaus cheminio junginio nustatymo kiekybiniai metodai** (pvz., cholesterolio ar kalio jonų kiekio nustatymo analitiniai metodai), kita grupė – **kiekybiniai grupiniai metodai** (nustatoma, pvz., bendra rūgščių koncentracija vyne).

Vyne yra skruzdžių rūgšties, acto rūgšties ir kitų karboksirūgščių, oksalo rūgšties, kitų dikarboksirūgščių bei trikarboksirūgščių, pavyzdžiui, obuolių rūgšties ir pan. Mus domina tik bendra jų koncentracija, o jei tiksliau, tai integruotas rodiklis, atspindintis disocijavusių karboksigrupių koncentraciją. Kitas grupinės analizės uždavinys yra vyno (brendžio, viskio ar kitų gėrimų) autentiškumo nustatymas. Kiekvienas vynas apibūdinamas tik jam būdingu rūgštingumu, cukringumu, alkoholių-aldehidų-acetalių-rūgščių santykiu ir aromatinių junginių kombinacija. Tai savotiškas vyno pasas arba „pirštų atspaudai“. Paprastai autentiškumą nustato degustatoriai, tačiau tai labai brangus, lėtas ir ne visada patikimas metodas. Todėl bandoma degustatorius pakeisti analitiniais metodais, tačiau kol kas naujo produkto vertę geriau nustato degustatoriai, nes tik jie gali pasakyti, skanu ar neskanu ir kiek tai gali kainuoti. Autentiškumas analitiškai nustatomas kiekybiškai įvertinant daug rodiklių ir lyginant gautus duomenis su tam vynui būdingais duomenimis, saugomais duomenų bazėse. Kitų gėrimų ir maisto produktų kokybė taip pat įvertinama pagal atitinkamų rodiklių grupes. Pašarų maistingumas įvertinamas pagal bendrą baltymų ir angliavandenių koncentraciją pašaruose, grūdų tinkamumas sėjai – pagal grūdų daigumą. Tai taip pat analitinis uždavinys, kaip ir mielių gyvybingumo ar vaistų fiziologinio aktyvumo nustatymas.

Kiekvieno analitinio metodo esmė – sugebėti atpažinti tiriamąją analitę, po to jos koncentracijos rodiklį paversti išmatuojamu signalu. Taigi galima sakyti, kad analitinio metodo kūrėjo uždavinys yra rasti sąryšį tarp analitės koncentracijos *c* ir matuojamo signalo *A* (atsako):

$$A = f(c). \qquad (1)$$

Pagal tai, kokio tipo sąryšis yra tarp analitės ir atsako, analitinius metodus galime skirstyti į tiesioginius ir netiesioginius. Tiesioginiais metodais analitės koncentracija matuojama tiesiogiai. Pavyzdžiui, analitė yra spalvota. Tada pagal jos spalvos pokytį, o tiksliau – sugeriamos šviesos kiekį, galime spręsti apie analitės koncentraciją. Tokių metodų yra palyginti nedaug. Gerokai daugiau yra netiesioginių metodų. Analizės procedūros metu analitę transformuojame į kokį nors matuojamą junginį. Pavyzdžiui, specifinis reagentas su analite sudaro spalvotą junginį, kurio koncentraciją galime pamatuoti. Kitas pavyzdys: fermentas urezė katalizuoja karbamido hidrolizę į amoniaką ir $CO_2$, kurie reaguodami su vandeniu sudaro jonus, o dėl to keičiasi terpės elektrinis laidumas. Elektrinio laidumo pokytis proporcingas karbamido koncentracijai mėginyje. Dauguma analitinių metodų yra netiesioginiai metodai.

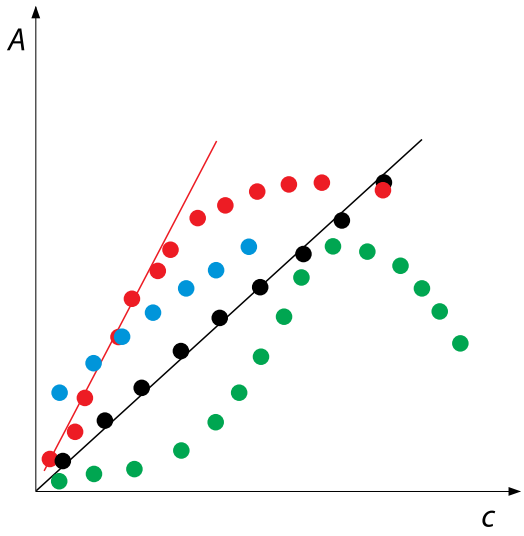
Matuodami galime gauti daug įvairių rodiklių. Pavyzdžiui, užregistravę kokio nors mėginio šviesos sugerties spektrą, galime gauti daug sugerties smailių, kurių ne visas galima priskirti analitei. Todėl turime atrinkti tą matavimo parametrą, kuris būdingas tik analitei, ir nustatyti matavimo konkrečiu analitiniu metodu neapibrėžtį.

**Matavimo neapibrėžtis** (angl. *uncertainty*) – su matavimo rezultatu susijęs parametras, apibūdinantis sklaidą verčių, kurias pagrįstai galima būtų priskirti matuojamam dydžiui. Šis parametras apibūdina matavimo metodo tikslumą. Metodo patikimumas vertinamas pagal tai, kiek tiksliai galima nustatyti matavimo neapibrėžtį. Kiekvieną metodą privalu patikrinti kitais nepriklausomais metodais naudojant prietaisus, sukalibruotus visiems priimtinais etalonais.

**Sietis** (angl. *traceability*) – matavimo rezultato savybė, pagal kurią jį galima susieti su tinkamais etalonais, dažniausiai valstybiniais ar tarptautiniais, taikant nenutrūkstamą palyginimų seką. Sieties užtikrinimas – tai įrodymas, kad skirtingose laboratorijose gauti matavimų rezultatai yra palyginami.

Atsako *A* sąryšio su analitės koncentracija pobūdis gali būti labai įvairus (3 pav.). Geriausia būtų, jei analitės koncentracijos ir atsako sąryšio funkcija būtų tiesinė. Kol analitės nėra, atsakas $A = 0$. Tolygiai didėjant analitės koncentracijai, atsakas tolygiai didėja. Tai rodo juodi taškai ir per juos išvesta juoda tiesė. Tačiau analitės koncentracijos ir atsako funkcija paprastai yra sudėtingesnė. Pavyzdžiui, atsakas gali būti tiesinis, tačiau turėti didelį foninį signalą, kurį lemia su analite nesusiję veiksniai, – tai rodo mėlyni taškai. Kartais sąryšį galima aprašyti tik sudėtingesnėmis priklausomybėmis (3 pav., raudoni ir žali taškai).

Atsako priklausomybė nuo analitės koncentracijos vadinama **gradavimo kreive**, o jos tiesinė dalis – **gradavimo tiese**. Nors iš principo galima rasti matematinį modelį, gerai apibūdinantį visą




**3 pav.** Sąryšio pobūdis tarp analitės koncentracijos ir matuojamo atsako.

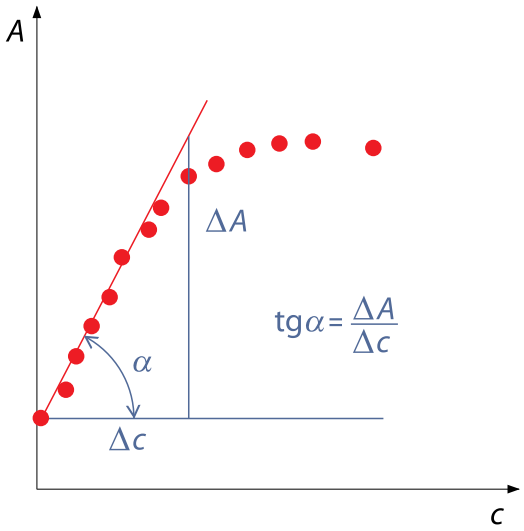
gradavimo kreivę, tačiau paprastai analitiniam uždaviniui spręsti naudojama tik gradavimo tiesė. Kartais atsakas *A* transformuojamas (pvz., logaritmuojamas) tam, kad gautume tiesinę jo priklausomybę nuo analitės koncentracijos. Gradavimo tiesė apibūdinama keliais parametrais.

**Matavimo viršutinė riba** – maksimalų matuojamą atsaką atitinkantis gradavimo tiesės taškas, kurio nuokrypis nuo gradavimo kreivės mažesnis už leistiną. Cheminiuose ir biocheminiuose matavimuose leistinas nuokrypis paprastai sudaro 5 % matuojamo atsako.

**Matavimo apatinė riba** – mažiausias matuojamas atsakas, kurį galima išmatuoti pasirinktu metodu neviršijant leistino nuokrypio nuo gradavimo tiesės. Kai analizės metodui būdingas foninis signalas (4 pav.), matavimo apatinę ribą galima skaičiuoti ties $c = 0$, jeigu čia gradavimo tiesės nuokrypis nuo gradavimo kreivės mažesnis už leistiną nuokrypį. Tačiau jei gradavimo kreivė yra sudėtingesnė (pvz., 3 pav. parodyta žalia kreivė), iš kurios matyti, kad analitinėje sistemoje tam tikras analitės kiekis suvartojamas pašalinėje reakcijoje, tai apatinė matavimo riba nustatoma pagal tuos pačius kriterijus kaip ir viršutinė.

**Aptikimo riba** – mažiausia analitės koncentracija, kurią galima kokybiškai aptikti konkrečiu analitiniu metodu. Daugumą kiekybinių analitinių metodų naudojami ir kokybinės analitikos tikslams.

**Jautris** (angl. *sensitivity*) – atsako vienetų skaičius, tenkantis vienam analitės matavimo vienetui. Jautris apibūdinamas gradavimo tiesės posvyriu ($\Delta A / \Delta c$, 4 pav.).




**4 pav.** Analitinio metodo gradavimo tiesės ir jautrio nustatymas.

# 2. Laboratorinė statistika

Informaciją apie aplinką gauname ją stebėdami ir eksperimentuodami. Kiekybinę informaciją – atlikdami matavimus. Kartais domina objektų dydis, pvz., medžio aukštis ar upės plotis, o kartais aplinkos ar tiriamo objekto savybės, kurių tiesiogiai nesimato, pvz., cholesterolio koncentracija svieste, ežero dumblėjimo greitis. Visais šiais atvejais, išmatavę medžio aukštį ar upės plotį ar atlikę atitinkamas analizės procedūras, gauname matavimų rezultatus, kuriuose slypi atsakymas į mus dominantį klausimą. Tačiau viskas tuo nesibaigia, nes pakartoję matavimą (ar analizės procedūrą) vargu ar gausime tiksliai tą patį rezultatą. Taip yra todėl, kad mūsų matavimo instrumentai ir analizės metodai nėra absoliučiai tikslūs. Tą patį dydį išmatavę daug kartų gauname vertes, kurias nagrinėdami turime nustatyti tikimiausią. Ši problema sprendžiama statistiniais metodais. Jie netaikomi uždaviniams, kurie turi vienintelį teisingą sprendinį. Pavyzdžiui, kiek aš turiu rankos pirštų? Arba – kiek pinigų yra mano piniginėje? Kiek kartų juos skaičiuosi, tiek kartų gausi tą pačią reikšmę. Tačiau jei klausimas bus formuluojamas „kiek sveria šis nuostabus briliantas?“, tada atsakymų gali būti daug. Kiek kartų sversite, tiek kartų gausite skirtingas reikšmes. Tačiau jei apsiribosite konkrečiu tikslumu, pavyzdžiui, „kiek sveria briliantas gramais vieno ženklo po kablelio tikslumu“, o jūsų svarstyklės tikslesnės už šią ribą, tai kiek kartų besvertumėte, suapvalinę gausite vis tą pačią reikšmę. Tokiais atvejais statistinių metodų nereikia.

## 2.1. Paklaidos

Absoliučiai tikslių matavimo metodų nebūna. Kiekvienas matavimas, kiekviena analitinė procedūra atliekami su mažesnėmis ar didesnėmis paklaidomis. Mes negalime absoliučiai tiksliai pasverti reagento. Liniuotės padalos vertė paprastai nebūna mažesnė už 1 mm, matavimo indai nėra absoliučiai tikslūs. Visi matavimo prietaisai turi savo paklaidas.

Kaip konstruojama analitinė sistema? Ji paprastai susideda iš dviejų dalių. Pirmiausia žinomais matais, kontrolinėmis medžiagomis ar standartais graduojame savo analitinę sistemą. Tai reiškia, kad ieškome atsakymo į klausimą, kiek analitinės sistemos atsako vienetų atitinka analitės vienetą. Po to sprendžiamas atvirkščias uždavinys – kiek gautų (išmatavus tiriamą mėginį) analitinės sistemos atsako vienetų atitinka analitės vienetų. Pavyzdžiui, norėdami išmatuoti stalo plotį, turime naudoti ilgio vienetais graduotą liniuotę ir ja išmatuoti stalo plotį. Jei norime išmatuoti gyvsidabrio koncentraciją ore, turime, naudodamiesi žinomos gyvsidabrio koncentracijos oro mėginiais, sugraduoti matavimo sistemą ir tada išmatuoti tiriamą mėginį.

Mes niekada nežinome tikrosios analitės reikšmės ($X$) nei kontroliniuose, nei tiriamuose mėginiuose. Paprastai analitinė sistema graduojama naudojant kontrolinius mėginius, kuriuose analitės koncentracija jau išmatuota kitais metodais. Tačiau laboratorija, gamindama kontrolinius mėginius, taip pat klysta. Kartais naudoja-

mi grynos analitės mėginiai – standartai, tačiau absoliučiai grynų analičių nebūna. Naudodami kontrolines medžiagas arba standartus, savo metodu juos išmatuojame ir teigiame, kad gautas atsakas atitinka tam tikrą analitės koncentraciją. Tai **sutartinė tikroji reikšmė,** žymima *X'*, kad atskirtume ją nuo tikrosios reikšmės *X*.

Jei žinome matuojamo dydžio reikšmę (*X* arba *X'*), o išmatavę šį dydį savo priemonėmis gavome reikšmę $x_i$, kuri skiriasi nuo *X* ar *X'*, tai tas skirtumas vadinamas paklaida:

$$\Delta x_i = x_i - X'. \qquad (2)$$

**Paklaida** yra matuojamo dydžio matavimo rezultato ir tikrosios (sutartinės) matuojamo dydžio vertės skirtumas. Išmatuotas dydis gali būti didesnis (paklaida teigiama) ar mažesnis (paklaida neigiama) už *X'*.

Bet kuriuo atveju, paklaidų buvimas nepageidautinas dalykas, todėl stengiamasi jas sumažinti. Tačiau tam reikia žinoti paklaidų atsiradimo priežastis. Tik tada galima imtis priemonių joms mažinti.

## 2.2. Sistemingosios paklaidos

Paklaidos pagal savo prigimtį gali būti skirstomos į **atsitiktines** ir **sistemingąsias.** Sistemingosios paklaidos atsiranda, kai matavimo metodas taikomas neteisingai. Pavyzdžiui, upės plotis matuojamas ne skersai upės, metalinė matavimo juosta dėl karštos dienos pailgėjo, reagente yra priemaišų ar pan. Kol sistemingosios paklaidos neidentifikuosime ir nepašalinsime jos priežasčių, ji egzistuos nepriklausomai nuo to, kiek kartų bekartotume matavimą.

Sistemingosios paklaidos gali skirtis keliais aspektais. Jos matavimo rezultatus gali padidinti (sumažinti) kokia nors pastovia reikšme. Pavyzdžiui, laborantas kartais išpučia iš pipetės reagento likutį, kuris paprastai lieka pipetėje tirpalui iš jos ištekėjus. Tai paprastai sudaro apie 0,05 ml. Jei laborantas dozuodamas reagentą visą pipetės turinį išpūs į matavimo indą, tai jis sukurs sistemingąją paklaidą, lygią +0,05 ml. Kada tai svarbu? Jei iš pipetės išleidžiame 10 ml ir daugiau, tai tas skirtumas gali neturėti reikšmingos įtakos matavimo rezultatui. Tačiau jei išleidžiamas tūris yra mažas, šis skirtumas gali iškreipti matavimo rezultatus. Jei analitės koncentracija yra didelė, t. y. matuojamas signalas didelis, tai pastovioji reikšmė, kuri bus pridedama (atimama), palyginti su matuojamu signalu, gali būti maža. Tokiais atvejais sistemingoji paklaida matavimo rezultatui neturi esminės įtakos ir į ją galima nekreipti dėmesio. Tačiau jei matuojamas signalas yra mažas, palyginti su pridedamu (atimamu) foniniu signalu, tada sistemingoji paklaida labai iškreipia matavimo rezultatą.

Kartais sistemingosios paklaidos gali padidinti arba sumažinti matuojamą dydį proporcingai matuojamam signalui. Pvz., visus rezultatus sumažina (padidina) 5 %. Tyrėjas turi nuspręsti, ar jį tenkina tokios sistemingosios paklaidos įtaka matavimams. Jei netenkina, reikia ieškoti sistemingosios paklaidos priežasties ir ją pašalinti arba sumažinti iki tokio lygio, kuris būtų priimtinas.

Sistemingosios paklaidos gali būti ir subjektyvios, t. y. susijusios su žmogiškuoju faktoriumi. Jos atsiranda, kai tyrėjas ne-

teisingai supranta instrukcijas ar neteisingai jas vykdo.

Sistemingosios paklaidos gali būti objektyvios, t. y. susijusios su naudojamos įrangos ar reagentų ypatumais. Pavyzdžiui, jonams atrankūs elektrodai matuoja jonų koncentraciją. Ištirpinus vandenyje kalcio chlorido, kalcio jonų koncentracija bus apie 20 % mažesnė už kalcio atomų koncentraciją, nes ne visas kalcio chloridas vandenyje disocijuoja į jonus. Jei tyrimo tikslas yra nustatyti kalcio koncentraciją, tai naudojant jonams atrankius elektrodus, registruojančius tik jonus, kalcio koncentracija bus nustatyta mažesnė, nei iš tikrųjų yra. Matavimo prietaisai gali būti nesukalibruoti arba sugedę, pavyzdžiui, spektrofotometro lempos nusilpusios ar pasenę fotodiodai. Tai lemia objektyvias sistemingąsias metodo paklaidas.

Sistemingosios paklaidos gali būti ir periodinės, pasireiškiančios tik tam tikru metu, pavyzdžiui, naktį atvėsus orui. Chronometro rodyklė gali strigti kurioje nors vietoje dėl mechaninės kliūties. Spektrofotometrai turi kelis šviesos šaltinius ir jų perjungimo metu gali atsirasti matavimo trukdžių.

Sistemingąsias paklaidas galima ir reikia įvertinti kiekybiškai – apskaičiuoti, kiek jos iškreipia matavimo rezultatą. Tam mums reikia žinoti, kokia būtų matavimo reikšmė ($X'$), jei sistemingosios paklaidos nebūtų. Jei atlikome vieną matavimą, tada skirtumas tarp atlikto matavimo rezultato ir tikrosios sutartinės reikšmės (2) vadinamas **paklaida**, o tiksliau – **visumine paklaida** $\Delta x$. Šis skirtumas yra atsitiktinės ir sistemingosios paklaidų suma:

$$\Delta x = \Delta x_{\text{sist}} + \Delta x_{\text{atsit}}. \qquad (3)$$

Kaip atskirti sistemingosios ir atsitiktinės paklaidos dalis visuminėje paklaidoje? Ne visada tai galima padaryti, bet jei galima atlikti daug ($n$) to paties rodiklio matavimų, tada visuminės paklaidos vidurkis artėja prie vidutinės sistemingosios paklaidos, nes atsitiktinių paklaidų suma artėja prie 0 (jei paklaidų pasiskirstymas simetriškas; 8 formulė):

$$\Delta\overline{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n}\Delta x_i}{n} = \frac{\sum_{i=1}^{n}\Delta x_{\text{sist},i}}{n} + \frac{\sum_{i=1}^{n}\Delta x_{\text{atsit},i}}{n}. \qquad (4)$$

Paklaida nėra informatyvi, jei nežinome, kokio dydžio reikšmė matuojama. Pavyzdžiui, nustačius gliukozės koncentraciją gauta visuminė paklaida lygi 2 mM. Tai daug ar mažai? Ar šis matavimo metodas geras, ar blogas? Į šiuos klausimus galėsime atsakyti tik nustatę gliukozės koncentraciją tiriamame mėginyje. Jei tiriamas mėginys yra sveiko žmogaus kraujas, tai gliukozės koncentracija tokiame kraujyje yra 3,5–5,5 mM. Šiuo atveju paklaida 2 mM yra reikšminga ir tokio analitinio metodo naudoti negalima. Jei tiriamas mėginys yra vaisių sultys, kuriose gliukozės koncentracija gali siekti kelis M, tai 2 mM yra labai maža paklaida. Todėl informatyvesnė yra **santykinė visuminė paklaida** (*SP*), kuri yra visuminės paklaidos ir matuojamo dydžio reikšmės santykis:

$$SP = \frac{x_i - X'}{X'} = \frac{\Delta x}{X'}. \qquad (5)$$

Santykinė paklaida nusako, kokią matuojamo dydžio dalį sudaro paklaida. Tai nedimensinis dydis, paprastai išreiškiamas procentais (%) arba promilėmis (‰).

Žinodami, kokią matuojamo dydžio reikšmės dalį sudaro sistemingoji paklaida, galime įvertinti jos svarbą ir imtis atitinkamų veiksmų. Jei ji nereikšminga, analitinį metodą galime naudoti, o jei reikšminga, ieškome būdų, kaip šią paklaidą sumažinti, arba renkamės kitą matavimo metodą. Sistemingosios paklaidos apibūdina pasirinkto metodo teisingumą.

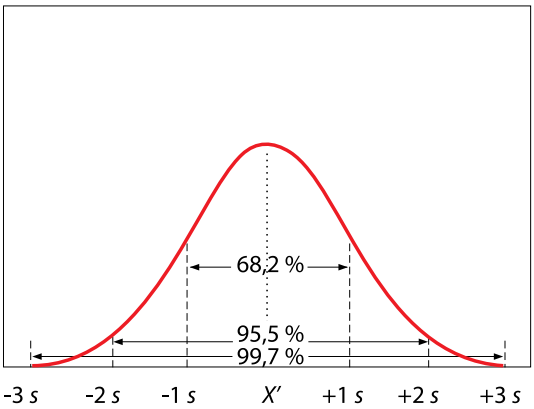
**Teisingumas** (angl. *correctness*) – matavimo charakteristika, kai sistemingoji matavimo rezultato paklaida artima nuliui. Kiekvienos laboratorijos darbo sėkmė tiesiogiai priklauso nuo to, kaip sugebama valdyti sistemingąsias paklaidas. Jei sistemingoji paklaida identifikuota ir jos dydis bei indėlis į matavimą įvertintas, tačiau jos pašalinti nepavyksta, galima ją įskaičiuoti į matavimo rezultatą. Tada tokia sistemingoji paklaida vadinama **pataisa**.

## 2.3. Atsitiktinės paklaidos

Atsitiktinės paklaidos yra susijusios su visuma atsitiktinių veiksnių, kurie kartojant matavimo procedūras gali pasireikšti arba nepasireikšti. Šių veiksnių gali būti daug, todėl kiekvienos analitinės procedūros metu kartojant matavimus gali pasireikšti skirtingas jų derinys. Todėl atsitiktinės paklaidos būna labai įvairaus dydžio. Jos gali padidinti arba sumažinti gautus rezultatus – vieną kartą matavimo rezultatą gausime didesnį už tikrąją reikšmę, kitą kartą – mažesnį.

**Tikslumas** (angl. *accuracy, precision*) – matavimo rezultato visuminės paklaidos artumas nuliui; matavimo rezultato ir sutartinės tikrosios matuojamo dydžio vertės artumas.

Jei *n* kartų išmatuosime tą patį parametrą, tai gausime *n* rezultatų: $x_1, x_2, x_3, \ldots x_n$. Jie gali būti vienodi. Tokiu atveju paklaidų skaičiuoti nereikia. Tačiau jei gausime skirtingus rezultatus, tada kils klausimas: kuris iš šių matavimų yra teisingas, o gal visi neteisingi? Ieškant atsakymo į šį klausimą pirmiausia reikia ištirti turimą matavimo duomenų masyvą. Tam reikia visą *x* duomenų masyvą surūšiuoti didėjimo (ar mažėjimo) tvarka ir nustatyti, kiek kokių matavimų sutampa. Informaciją apie duomenų masyvą galima pavaizduoti grafiškai *x* ašyje atidedant matavimų reikšmes (*x*), o *y* ašyje – sutampančių matavimų reikšmių skaičių (5 pav.).




**5 pav.** Pasikartojančių matavimų reikšmių skaičiaus priklausomybė nuo matuojamo dydžio reikšmės (*s* – standartinis nuokrypis; 11 formulė).

Jei gausime simetrišką varpo formos kreivę, tai analitinis metodas yra patikimas. Tokiu atveju tikrosios reikšmės nustatymas gerokai supaprastėja. Jei atlikta pakankamai daug parametro $x$ matavimų ($n > 30$), galima teigti, kad dažniausiai pasikartojantis matavimo duomuo ir bus tikroji parametro reikšmė. Tokiu atveju tikroji parametro $x$ reikšmė yra visų matavimo duomenų vidurkis:

$$\overline{x} = \frac{x_1 + x_2 + \ldots x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}. \qquad (6)$$

Jei duomenų pasiskirstymo kreivė nesimetriška, tai galima teigti, kad mūsų analitiniam metodui turi įtakos kažkokie neatsitiktiniai veiksniai, iškreipiantys matavimų duomenis. Dažniausiai tai būna kokia nors savita sistemingoji paklaida.

Atsitiktinės paklaidos įvertinamos po to, kai nustatoma sistemingoji paklaida, arba kai sistemingoji paklaida yra nereikšmingai maža. Jei sistemingoji paklaida yra pašalinta arba nereikšmingai maža, tada visuminė paklaida ($\Delta x$; 3 formulė) lygi atsitiktinei paklaidai ($\varepsilon$) ir yra eksperimentiškai gautos vertės $x_i$ bei sutartinės tikrosios vertės, kurią galime pakeisti visų matavimų duomenų vidurkiu ($\overline{x}$), skirtumas:

$$\varepsilon_i = x_i - \overline{x}. \qquad (7)$$

Todėl dažnai visuminė paklaida ($\Delta x$) vadinama tiesiog paklaida ($\varepsilon$). Jei atsitiktinės paklaidos pasiskirsčiusios simetriškai (5 pav.), visų jų suma artėja prie 0:

$$\sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i = 0. \qquad (8)$$

Jei atlikome tik vieną matavimą, tai spręsti apie paklaidas negalime, nes neturime su kuo lyginti. Jei atlikome du matavimus ir jie buvo skirtingi, tada galime pasirinkti vieną jų ir tarti, kad jis teisingas. Tokiu atveju skirtumas $x_1 - x_2$ bus paklaida. Atlikę tris matavimus turėsime du pasirinkimus paklaidoms nustatyti: $x_1 - x_2$ arba $x_1 - x_3$.

Pasirinkimų skaičius, dar vadinamas **laisvės laipsnių skaičiumi** ($v$), ir yra vienetu mažesnis už nepriklausomų matavimų skaičių. Jei paklaidas skaičiuosime naudodami tikrąją sutartinę reikšmę arba matavimo duomenų vidurkį, tai paklaidų skaičius bus lygus matavimų skaičiui. Tačiau tai nepakeis duomenų masyvo laisvės laipsnių skaičiaus: $v = n - 1$. Turėdami matavimo duomenų masyvą galime suformuoti paklaidų masyvą. Atlikę $n$ matavimų ir apskaičiavę vidutinę reikšmę turėsime $n$ paklaidų ir galėsime nustatyti vidutinę paklaidą:

$$\overline{\varepsilon} = \frac{\sum_{i=1}^{n} |\varepsilon_i|}{n}. \qquad (9)$$

Vidutinė paklaida nėra informatyvi, todėl ją verta naudoti tik tada, kai paklaidų tankis visame išmatuotų reikšmių diapazone yra vienodas (t. y. 5 pav. parodyta kreivė virs horizontalia tiese). Tačiau dažniausiai taip nebus, todėl matavimų reikšmių skirstinį geriausiai apibūdina dispersija:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \overline{x})^2}{n-1}, \qquad (10)$$

kurios kvadratinė šaknis yra **standartinis nuokrypis** (angl. *standard deviation*, SD):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}. \qquad (11)$$

Standartinis nuokrypis yra viena svarbiausių metrologinių charakteristikų. *n* matavimų serijos **standartinė paklaida** apskaičiuojama iš standartinio nuokrypio išraiškos:

$$S = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}. \qquad (12)$$

Standartinės paklaidos vertė yra susieta su matuojamo dydžio verte. Keičiantis matuojamo dydžio vertei, keičiasi ir standartinės paklaidos vertė, nors matavimų tikslumas gali ir nesikeisti. Todėl kartais informatyvesnis yra **santykinis standartinis nuokrypis** (angl. *relative standard deviation*, RSD):

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}. \qquad (13)$$

Dažniau naudojama santykinio standartinio nuokrypio procentinė išraiška, kuri vadinama **variacijos koeficientu**(*VK*):

$$VK = s_r \cdot 100\ \%\ . \qquad (14)$$

Dažniausiai matavimo duomenys, kurių variacijos koeficientas mažesnis nei 5 % (matavimo paklaida mažesnė nei 5 % matuojamo dydžio vertės), yra pakankami moksliniams tyrimams.

Jei atsitiktinių paklaidų skirstinys yra normalusis (5 pav.), intervalas $\bar{x} \pm s$ apima 68,2 % viso matavimo duomenų masyvo; intervalas $\bar{x} \pm 2s$ – 95,5 % viso matavimo duomenų masyvo, o intervalas $\bar{x} \pm 3s$ – 99,7 % matavimo duomenų masyvo.

Turėdami didelį matavimo duomenų masyvą ir įvertinę paklaidas, vis dėlto negalime atsakyti į svarbiausią klausimą: tai kokia gi yra tikroji analitės reikšmė? Tačiau galime pasakyti, kokiame reikšmių intervale ji bus:

$$X = \bar{x} \pm \Delta\bar{x}, \qquad (15)$$

$$\Delta\bar{x} = t\frac{s}{\sqrt{n}} = tS, \qquad (16)$$

čia *X* – tikroji analitės reikšmė mėginyje; $\Delta\bar{x}$– pasikliautinasis intervalas; *S* – standartinė paklaida, *t* – Stiudento koeficientas (1 lentelė).

**Stiudento koeficientas** parenkamas iš lentelių žinant matavimų skaičių (laisvės laipsnių skaičių *v*) ir norimą patikimumo lygį. Pasirinkus patikimumo lygį modeliuojamas atsitiktinės ir sistemingosios paklaidos santykis ir jų svorio koeficientai matavimo paklaidoje. Šį koeficientą 1908 m.

**1 lentelė.** Stiudento koeficentas 95 % patikimumui

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *v* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| *t* | 12,706 | 4,303 | 3,182 | 2,776 | 2,571 | 2,447 | 2,365 | 2,306 | 2,262 | 2,228 | 2,201 | 2,179 |
| *v* | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| *t* | 2,160 | 2,145 | 2,131 | 2,120 | 2,110 | 2,101 | 2,093 | 2,086 | 2,080 | 2,074 | 2,069 | 2,064 |
| *v* | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 36 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 |
| *t* | 2,060 | 2,056 | 2,052 | 2,048 | 2,045 | 2,042 | 2,030 | 2,021 | 2,014 | 2,008 | 2,004 | 2,000 |

pasiūlė anglų mokslininkas V. S. Gosetas (Gosset), kuris skelbė savo straipsnius pseudonimu *Student*.

Kuo griežtesni bus reikalavimai rezultato patikimumui, tuo pasikliautinasis intervalas bus platesnis. Cheminiuose, biocheminiuose matavimuose paprastai pakanka 95 % patikimumo.

Aprašytas tikrosios matavimo reikšmės (15 formulė) įvertinimo metodas yra teisingas tik tuomet, jei sistemingoji paklaida palyginti nedidelė ir neviršija pasikliautinojo intervalo: $|\overline{x} - X| < \Delta\overline{x}$.

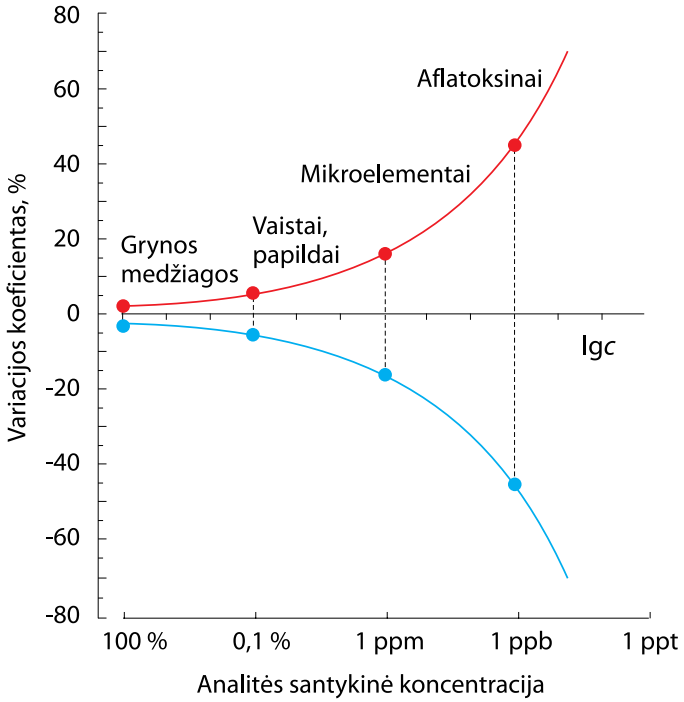
Didėjant matavimų skaičiui mažėja standartinė paklaida ir Stiudento koeficientas, taigi siaurėja matavimo reikšmių intervalas, kuriame yra tikroji reikšmė. Kita vertus, mažėjant analitės koncentracijai, didėja paklaidos ir plečiasi pasikliautinasis intervalas (6 pav.).

Suprantama, kad mažėjant analitės daliai mėginyje, likusi dalis (geriausiu atveju – balastas) tik trukdys analitinio signalo suformavimui. Todėl nieko stebėtino, kad labai mažos toksinų ar mikroelementų koncentracijos (ppm[3] arba ppb[4] lygio) nustatomos su palyginti didelėmis paklaidomis.

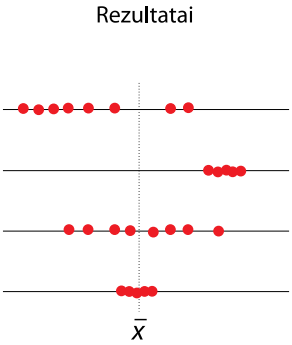
Mes norime, kad mūsų taikomas metodas būtų teisingas ir tikslus – kuo mažesnės sistemingosios ir atsitiktinės paklaidos. Tai rodo paskutinė 7 pav. eilutė.

[3] 1 ppm = 0,0001 %

[4] 1 ppb = 0,001 ppm




**6 pav.** Variacijos koeficiento priklausomybė nuo analitės santykinės koncentracijos *c*; 100 % = 1; variacijos koeficientas $VK = \mp 2^{(1 - 0{,}5\lg c)}$.




| Paklaidos | |
|---|---|
| Atsitiktinė | Sistemingoji |
| Didelė | Didelė (–) |
| Maža | Didelė (+) |
| Didelė | Maža |
| Maža | Maža |

| Metodas | |
|---|---|
| Teisingumas | Tikslumas |
| Žemas | Mažas |
| Žemas | Didelis |
| Aukštas | Mažas |
| Aukštas | Didelis |

**7 pav.** Atsitiktinių ir sistemingųjų paklaidų apibendrinimas; parodyta šių paklaidų įtaka matavimo rezultatui.

Pirma eilutė nusako neteisingą ir netikslų metodą, antra – tikslų, tačiau neteisingą metodą, o trečia eilutė – netikslų, tačiau teisingą metodą. Matydami tokį savo analitinio metodo įvertinimą galime imtis tikslingų veiksmų siekdami padidinti arba metodo tikslumą (sumažindami atsitiktines paklaidas), arba teisingumą (sumažindami sistemingąsias paklaidas).

## 2.4. Šiurkščių klaidų įvertinimas

Atliekant matavimus kartais pasitaiko šiurkščių klaidų, kurios gali labai iškreipti matavimų rezultatus. Aiškiai neteisingus duomenis iš duomenų masyvo būtina pašalinti. Kaip įvertinti, kuris duomuo yra klaidingas? Tam egzistuoja keli metodai. Vienas jų – **kvantilių metodas**. Visada įtartinos pačios mažiausios arba pačios didžiausios masyvo duomenų vertės. Jei įtartinas $x_i$ duomuo, galime apskaičiuoti jo kvantilį ($t_T$):

$$t_T = \frac{\max|x_i - \bar{x}|}{s}. \qquad (17)$$

Žinodami matavimų skaičių $n$ ir pasirinkę patikimumo lygį $P$ (sprendžiant mokslines problemas, paprastai pakanka $P = 0{,}95$), gautą kvantilio ($t_T$) reikšmę lyginame su ribinėmis kvantilių reikšmėmis (2 lentelė). Jei gauta kvantilio reikšmė yra didesnė, nei pateikta lentelėje, tokią matavimo reikšmę galime iš duomenų masyvo pašalinti. Tada apskaičiuojamas naujas duomenų vidurkis bei naujas standartinis nuokrypis ($s$) ir vėl patikrinamas didžiausias arba mažiausias duomenų masyvo narys. Taip procedūra kartojama, kol kvantilių reikšmės tampa mažesnės už pateiktas lentelėje.

**2 lentelė.** Ribinės kvantilių ($t_T$) reikšmės

| $n$ \ $P$ | 0,90 | 0,95 | 0,99 |
|---|---|---|---|
| 3 | 1,41 | 1,41 | 1,41 |
| 5 | 1,79 | 1,87 | 1,96 |
| 8 | 2,04 | 2,17 | 2,37 |
| 10 | 2,15 | 2,29 | 2,54 |
| 15 | 2,33 | 2,49 | 2,80 |
| 20 | 2,45 | 2,62 | 2,96 |
| 25 | 2,54 | 2,72 | 3,07 |

## 2.5. Regresinė analizė

Analizės procedūrą galima suskirstyti į dvi dalis. Pirma dalis yra analitinės sistemos gradavimas kontroliniais mėginiais. Tai yra sąryšio tarp žinomos analitės koncentracijos (*c*) ir atsako (*A*) radimas (1 formulė). Antroji dalis yra atvirkščia pirmajai – pasinaudojant rastu *c* ir *A* sąryšiu, išanalizuoti nežinomos koncentracijos mėginį.

Analitikoje naudojamos gradavimo kreivių tiesinės dalys. Todėl stengiamasi parinkti tokį analitės koncentracijos diapazoną, kuriame atsako ir analitės koncentracijos sąryšis yra tiesinis. Pavyzdžiui, optinėje spektroskopijoje optinis tankis (*A*) yra lygus foniniam optiniam tankiui ($A_0$) plius matuojamos medžiagos koncentracija (*c*), padauginta iš sugerties koeficiento (*α*) ir optinio kelio ilgio (*l*):

$$A = A_0 + \alpha l c. \qquad (18)$$

Elektrochemijoje difuzinės srovės tankis ($j_d$) yra lygus foninės srovės tankio ($j_0$) ir elektrochemiškai aktyvios medžiagos koncentracijos (*c*), padaugintos iš konstantos *k*, sumai:

$$j_d = j_0 + kc. \qquad (19)$$

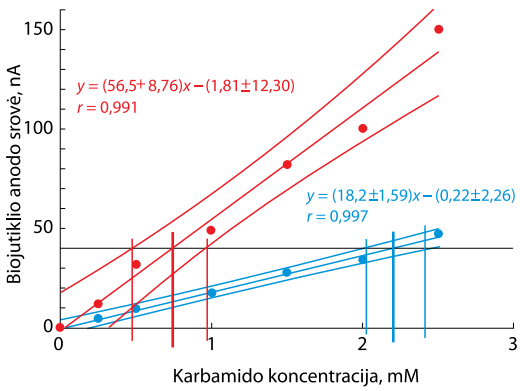
Šiais atvejais atsako priklausomybė nuo medžiagos koncentracijos yra tiesinė. Tačiau ne visada sąryšiai tarp matuojamo parametro ir analitės yra tiesiniai. Pavyzdžiui, liepsnos fotometrijoje dviejų tiriamos medžiagos mėginių analitės koncentracijos santykis yra susietas su išmatuotu šių mėginių sugerties spektro smailių intensyvumo (*I*) santykiu tokiu sąryšiu:

$$\frac{I_1}{I_2} = a\left(\frac{c_1}{c_2}\right)^b. \qquad (20)$$

Šią priklausomybę naudinga transformuoti į tiesinę. Tam lygtį logaritmuojame ir naudojame ne sugerties smailių intensyvumus, o jų logaritmus:

$$\lg\frac{I_1}{I_2} = \lg a + b\lg\frac{c_1}{c_2}. \qquad (21)$$

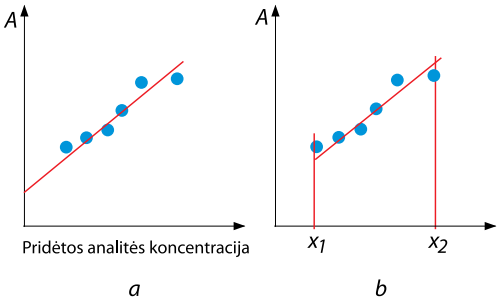
Analitinės sistemos gradavimo tiesei nustatyti pasirenkami žinomos koncentracijos analitės tirpalai. Tada atliekami šių tirpalų matavimai ir atvaizduojama išmatuoto atsako priklausomybė nuo analitės koncentracijos (8 pav.).




**8 pav.** Karbamido analitinės sistemos gradavimo tiesės. Abiem atvejais matavimų skaičius *n* = 7, pasikliautinieji intervalai apskaičiuoti 98 % patikimumui.

Jei analitinis metodas skirtas gliukozei kraujyje matuoti, tai matavimo priemonė turėtų būti graduojama žinomos gliukozės koncentracijos kraujo pavyzdžiais (pageidautina to paties paciento). Tačiau ne visada tai įmanoma. Rekomenduojami du gradavimo tiesių nustatymo metodai.

**Analitės pridėjimo metodas.** Gradavimo tiesei nustatyti naudojamas analitės mėginys (pvz., kraujas, sultys, mikrobiologinė terpė), į kurį pridedama koncentruoto analitės tirpalo. Pridedamo tirpalo tūris turi būti mažas, kad nepraskiestų analitės, pavyzdžiui į 10 ml mėginio įpilama 0,1 ml koncentruoto analitės vandeninio tirpalo. Naudojant įvairios koncentracijos analitės tirpalus paruošiama serija mėginių, kuriuose žinoma pridėtos analitės koncentracija. Atliekama visų mėginių analizė ir nustatoma gradavimo tiesė (9 pav., a).




**9 pav.** Gradavimo tiesių nustatymo metodai: a – analitės pridėjimo metodu; b – mėginių sumaišymo metodu.

**Mėginių sumaišymo metodas**. Šis metodas dažnai naudojamas medicinos ir biochemijos laboratorijose. Tam paprastai naudojami du kontroliniai serumai: vienas su žinoma maža analitės koncentracija, kitas su žinoma didele analitės koncentracija. Mėginiai įvairiais santykiais maišomi tarpusavyje. Taip paruošiama serija žinomos skirtingos analitės koncentracijos mėginių, kurie naudojami gradavimo tiesei nustatyti. Mišinio analitės koncentracija ($c_x$) apskaičiuojama taip:

$$c_x = \frac{V_1 c_1 + V_2 c_2}{V_1 + V_2}, \qquad (22)$$

čia $V_1$ – pirmojo tirpalo tūris, $c_1$ – pirmojo tirpalo koncentracija, $V_2$ – antrojo tirpalo tūris, $c_2$ – antrojo tirpalo koncentracija.

Gradavimo tiesėms nustatyti ne visada naudojama ta pati medžiaga, kuri matuojama. Pavyzdžiui, gliukozės nustatymo metodu, kai naudojama gliukozės oksidazė, išmatuojama tik vieno iš penkių D-gliukozės izomerų – β-D-gliukopiranozės koncentracija. Šis izomeras yra pusiausviras su kitais keturiais D-gliukozės izomerais ir sudaro 64 % visų D-gliukozės formų. Jei analitinė sistema graduojama pusiausviruoju gliukozės izomerų mišiniu ir matuojamoje terpėje taip pat yra toks pat pusiausvirasis mišinys, tada analitinė sistema veiks teisingai.

Gradavimo kreivės tiesinė dalis aproksimuojama tiesės lygtimi, o likusi kreivės dalis tolimesnėje analizėje nenaudojama. Tai reiškia, kad turint konkrečių matavimų duomenis (8 pav.) apskaičiuojama, kokia turėtų būti teorinė $Y$ reikšmė kiekvienai $x$ reikšmei (šie teoriniai taškai 8 pav. neparodyti, tačiau per juos nubrėžta tiesė) Gradavimo tiesė nustatoma iš eksperimentinių duomenų, kurie išmatuoti su paklaidomis. Tai rodo eksperimentinių taškų sklaida apie tiesę. Aproksimuojant eksperimento duomenis tiesės lygtimi

$y = a + bx$, lygties koeficientai $a$ ir $b$ apskaičiuojami taip:

$$a = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2},$$

$$b = \frac{n\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}, \qquad (23)$$

o jų standartiniai nuokrypiai:

$$s_a = \sqrt{\frac{s_0^2 \sum x_i^2}{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}},$$

$$s_b = \sqrt{\frac{s_0^2 n}{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}}. \qquad (24)$$

Standartiniai nuokrypiai apskaičiuojami naudojant matavimo duomenų dispersijos apie aproksimuojančią tiesę išraišką:

$$s_0^2 = \frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2} = \frac{\sum y_i^2 - a\sum y_i - b\sum x_i y_i}{n-2}, \qquad (25)$$

čia $Y_i$ – teorinė $y$ reikšmė ties $x_i$.

Eksperimentiniu būdu gautos tiesės lygties koeficientų patikimumo intervalui apskaičiuoti naudojamas porinis Stiudento koeficientas. Taip apskaičiuotos tiesės lygtys ir patikimumo intervalo kreivės parodytos 8 pav.

Apskaičiuota $Y$ reikšmė yra tikimybinis dydis, nusakomas patikimumo intervalu, kurio plotis priklauso nuo pasirinkto patikimumo lygio. Kuo patikimumo lygis aukštesnis, tuo patikimumo intervalas platesnis. Paprastai pakanka 95 % patikimumo lygmens. 8 pav. parodytas aukštesnis 98 % patikimumo atvejis. Gradavimo tiesės patikimumo intervalas apskaičiuojamas taip:

$$\Delta Y_0 = t s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{n(x_0 - \bar{x})^2}{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}}, \qquad (26)$$

čia $\Delta Y_0$ – $x_0$ reikšmės patikimumo intervalas, $t$ – Stiudento koeficientas, $s_0$ – matavimo duomenų standartinis nuokrypis nuo gradavimo tiesės, $n$ – matavimų skaičius gradavimo kreivei nustatyti, $\bar{x}$ – visų $x$ reikšmių vidurkis.

Analitinio metodo paklaidos mažiausios gradavimo tiesės viduryje. Tolstant nuo gradavimo tiesės vidurio tiek reikšmių didėjimo, tiek ir mažėjimo kryptimi, paklaidos didėja. Todėl praktiniais sumetimais reikia stengtis parinkti tokias matavimo sąlygas, kad matuojama reikšmė būtų kuo arčiau gradavimo tiesės vidurio.

Tiesės lygties narys $b$ nusako analitinio metodo jautrį. Pavyzdžiui, 8 pav. raudona tiesė rodo priklausomybę, kurios $b$ lygus 56,5 nA/mM, o kitos analitinės sistemos, kurią vaizduoja mėlyna tiesė, jautris daug mažesnis – 18,2 nA/mM. Kuo statesnė tiesė, tuo analitinio metodo jautris yra didesnis.

Tiesės lygties narys $a$ nusako gradavimo tiesės padėtį koordinačių pradžios atžvilgiu. Jei jis teigiamas – gradavimo tiesė ties

$x = 0$ bus pasislinkusi išilgai y ašies, $y = a$. Tai yra foninis signalas, kurio dydis lygus $a$. Jei $a$ reikšmė neigiama, $y > 0$ reikšmės bus gautos tokioms $x$ reikšmėms, kai $bx > a$. Jei analitinė sistema negali matuoti neigiamų $y$ reikšmių, tai analitės koncentracijos, mažesnės už $bx$, nebus galima išmatuoti.

Nustačius gradavimo tiesę matuojamas nežinomas mėginys, t. y. sprendžiamas atvirkščias uždavinys:

$$\bar{x}_{an} = \frac{\bar{y}_{an} - a}{b}, \qquad (27)$$

čia $\bar{y}_{an}$ – tiriamo mėginio išmatuoto atsako reikšmių vidurkis, $\bar{x}_{an}$ – mėginyje esančios analitės koncentracijos vidurkis.

Analitės koncentracija tiriamame mėginyje ($x$) apskaičiuojama kaip verčių seka, apibrėžiama patikimumo intervalo pločiu:

$$x = \bar{x}_{an} \pm \Delta x = \bar{x}_{an} \pm tS_x. \qquad (28)$$

Šio uždavinio sprendimui reikalingas $S_x$ gali būti apskaičiuojamas keliais būdais – priklauso nuo to, kaip nustatoma gradavimo tiesė ir kaip matuojamas tiriamas mėginys.

1. Paruošiama $n$ kontrolinių tirpalų ir po vieną kartą pamatuojamas kiekvienas kontrolinis tirpalas ir vieną kartą tiriamasis mėginys ($y_{an}$). Tada

$$S_x = \frac{s_0}{b}\sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{n(y_{an} - \bar{y})^2}{b^2[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2]}}. \qquad (29)$$

2. Paruošiama $n$ kontrolinių tirpalų ir po vieną kartą atliekamas kiekvieno kontrolinio tirpalo matavimas bei atliekama $m$ tiriamo mėginio ($y_{an}$) matavimų. Tada matavimo duomenų vidurkis apskaičiuojamas taip:

$$\bar{y}_{an} = \frac{\sum y_{an,i}}{m}, \qquad (30)$$

o $S_x$ – taip:

$$S_x = \frac{s_0}{b}\sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{n(\bar{y}_{an} - \bar{y})^2}{b^2[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2]}}. \qquad (31)$$

Naudojamas porinis Stiudento koeficientas, kuriam laisvės laipsnių skaičius $v = n - 2$, $n$ – kontrolinių matavimų skaičius.

Analitiniams uždaviniams spręsti gradavimo tiesės nustatomos pasitelkiant kompiuterines programas – eksperimento duomenys greitai ir patogiai aproksimuojami pasirinktais matematiniais modeliais, įvertinamos bei grafiškai pavaizduojamos patikimumo ribos (8 pav.). Tada galima neskaičiuoti $\bar{x}_{an}$ ir patikimumo intervalo, o nustatyti tai grafiškai. Pavyzdžiui, tiriamame mėginyje išmatavus karbamido koncentraciją, gauta 40 nA elektrodo srovė. Gradavimo grafike nubrėžiama horizontali tiesė, kuri susikerta su gradavimo tiese ties reikšme, lygia $\bar{x}_{an}$, ir su patikimumo kreivėmis (10 pav.).

## 2.6. Netiesioginių matavimų metrologinis vertinimas

Kartais ieškomas rezultatas gaunamas atlikus keletą skirtingų matavimų ir matematinius veiksmus su tų matavimų duomenimis. Pavyzdžiui, reikia apskaičiuoti stačiakampio plotą, kurio abi kraštines (*a* ir *b*) galime išmatuoti tik su paklaidomis. Stačiakampio plotas yra abiejų kraštinių sandauga, t. y. mūsų ieškomas rezultatas yra pirminių matavimų duomenų sandauga. Suprantama, kad ieškomo rezultato paklaidos priklausys nuo funkcinio sąryšio tarp ieškomo rezultato ir su paklaidomis išmatuotų pirminių duomenų. Jei ieškomą rezultatą galime išreikšti tokia matuojamų dydžių sandauga:

$$y = x_1^a x_2^b \ldots x_n^q, \qquad (32)$$

tai santykinės visuminės paklaidos kvadratas:

$$\left(\frac{\Delta y}{\bar{y}}\right)^2 = \left(a\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2 + \left(b\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2 + \ldots + \left(q\frac{\Delta x_n}{\bar{x}_n}\right)^2. \qquad (33)$$

Iš čia absoliučioji matavimo visuminė paklaida:

$$\Delta y = \bar{y}\sqrt{\left(a\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2 + \left(b\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2 + \ldots + \left(q\frac{\Delta x_n}{\bar{x}_n}\right)^2}. \qquad (34)$$

3 lentelėje pateikti kiti dažnai pasitaikantys funkciniai sąryšiai ir formulės ieškomo rezultato paklaidoms apskaičiuoti.

Tarkime, reikia apskaičiuoti sklypo plotą. Tam daug kartų išmatavome sklypo kraštinę *a* ir gavome duomenų masyvą $x_1$ bei kraštinę *b* ir gavome duomenų masyvą $x_2$. Apskaičiuojame abiejų duomenų ma-

**3 lentelė.** Formulės daugkartinių matavimų visuminėms paklaidoms apskaičiuoti

| Eil. Nr. | Funkcinė priklausomybė | Absoliučioji paklaida $\Delta y$ | Santykinė paklaida $\Delta y/\bar{y}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | $y = \ln x$ | $\Delta x/\bar{x}$ | $\Delta x/(\bar{x}\cdot \ln\bar{x})$ |
| 2 | $y = e^x$ | $\Delta x \cdot e^{\bar{x}}$ | $\Delta x$ |
| 3 | $y = \sin x$ | $\Delta x \cdot \cos\bar{x}$ | $\Delta x \cdot \mathrm{ctg}\,\bar{x}$ |
| 4 | $y = \mathrm{tg}\, x$ | $\Delta x/\cos^2\bar{x}$ | $2\,\Delta x/\sin 2\bar{x}$ |
| 5 | $y = x_1+x_2+\ldots+x_n$ | $\sqrt{(\Delta x_1)^2+(\Delta x_2)^2+\ldots+(\Delta \bar{x}_n)^2}$ | $\frac{\sqrt{(\Delta x_1)^2+(\Delta x_2)^2+\ldots+(\Delta \bar{x}_n)^2}}{\bar{x}_1+\bar{x}_2+\ldots+\bar{x}_n}$ |
| 6 | $y = x_1 \cdot x_2$ | $(\bar{x}_1\cdot\bar{x}_2)\sqrt{\left(\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2+\left(\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2}$ | $\sqrt{\left(\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2+\left(\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2}$ |
| 7 | $y = x_1/x_2$ | $\frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2}\sqrt{\left(\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2+\left(\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2}$ | $\sqrt{\left(\frac{\Delta x_1}{\bar{x}_1}\right)^2+\left(\frac{\Delta x_2}{\bar{x}_2}\right)^2}$ |

syvų reikšmių vidurkius ($\bar{x}_1$ ir $\bar{x}_2$; 6 formulė) bei jų patikimumo intervalus ($\Delta\bar{x}_1$ ir $\Delta\bar{x}_2$; 16 formulė). Sklypo plotas yra abiejų sklypo kraštinių sandauga, todėl jo matavimo paklaidą galima apskaičiuoti naudojant 3 lentelės šeštą formulę. Taigi, sklypo plotas lygus:

$$Y = \overline{x_1} \cdot \overline{x_2} \pm \Delta y. \qquad (35)$$

Taip galime apskaičiuoti visos teritorijos sklypų plotus. Jei mus domina visos teritorijos plotas, tada reikia visų sklypų plotus susumuoti. Visų sklypų plotai apskaičiuoti su paklaida, todėl reikia apskaičiuoti ir teritorijos ploto paklaidą. Teritorijos ploto paklaida bus skaičiuojama naudojant 3 lentelės penktą formulę, kurioje $\Delta\bar{x}$ – kiekvieno sklypo ploto anksčiau apskaičiuota paklaida.

## 2.7. Ryšio tarp dviejų duomenų masyvų vertinimas

Kartais reikia palyginti du duomenų masyvus ir nuspręsti, ar jie skiriasi. Tarkime, kontroliniame lauke auginame kviečius. Kitame tokiame pat lauke (bandomajame) irgi auginame tos pačios veislės kviečius, tačiau eksperimentiniame lauke kviečius pasėjome anksčiau (vėliau), paveikėme herbicidais ar atlikome kokį kitą veiksmą, kuris gali paveikti javų derlių. Mes norime sužinoti, ar veiksmas turėjo įtakos javų derliui. Tam iš kontrolinio lauko atsitiktinai parinkome, pavyzdžiui, 10 varpų ($n_k$ = 10) ir kiekvieną pasvėrėme, o iš tiriamo lauko parinkome, tarkime, 13 varpų ($n_t$ = 13), kurių kiekvieną taip pat pasvėrėme. Gavome du duomenų masyvus ir norime žinoti, ar jie statistiškai skiriasi. Tai galime sužinoti dviem metodais.

Paprastesnis, tačiau ne toks tikslus yra Fišerio (Fisher) metodas. Jis remiasi abiejų duomenų masyvų dispersijų (10 formulė) palyginimu:

$$F = \frac{s_k^2}{s_t^2} \text{ arba } F = \frac{s_t^2}{s_k^2}, \qquad (36)$$

čia $s_k^2$ – kontrolinio lauko varpų masės dispersija, $s_t^2$ – tiriamo lauko varpų masės dispersija. Skaičiuojant Fišerio kriterijų (*F* kriterijų) skaitiklyje visada rašoma ta dispersija, kuri skaitine reikšme yra didesnė.

Gauta *F* kriterijaus reikšmė palyginama su 4 lentelės duomenimis. Šioje lentelėje nurodyti laisvės laipsnių skaičiai: $v = n - 1$, pirmoje eilutėje – skaitiklyje esančio duomenų masyvo; pirmame stulpelyje – vardiklyje esančio duomenų masyvo. Mūsų nagrinėjamu atveju $v_k$ = 9, o $v_t$ = 12. Tarkime, kad kontrolinio lauko varpų masės dispersija yra mažesnė už tiriamojo lauko, todėl kontrolinis *F* kriterijus yra 3,07. Jei apskaičiuota reikšmė daug didesnė už lentelėje pateiktą *F* kriterijaus reikšmę, galima teigti, kad šie duomenų masyvai statistiškai skiriasi.

*F* kriterijaus metodas nėra pakankamai jautrus, todėl dažniau naudojamas Stiudento kriterijus |*t*|, kuris mūsų nagrinėjamam pavyzdžiui apskaičiuojamas taip:

$$|t| = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)\sqrt{\frac{1 - \frac{2}{n_1 + n_2}}{\frac{s_1^2}{n_2} + \frac{s_2^2}{n_1}}}, \qquad (37)$$

čia $\bar{x}_k$ ir $\bar{x}_t$ abiejų duomenų masyvų reikšmių vidurkiai, $n_k$ ir $n_t$ abiejų duomenų masyvų matavimų skaičius. Apskaičiuotas Stiudento kriterijus palyginamas su lentelėse pateikta Stiudento koeficiento reikšme (1 lentelė). Šiuo atveju laisvės laipsnių skaičius: $v = n_k + n_t - 2$.

Nagrinėjamam pavyzdžiui:

$$v = 10 + 13 - 2 = 21.$$

Taigi, jei suskaičiuotas koeficientas būtų didesnis nei 2,08, galėtume teigti, kad abu duomenų masyvai statistiškai patikimai skiriasi, t. y. kad kontrolinio ir tiriamo lauko vidutinė varpų masė skirtinga. Ar sėjos laikas, trąšos, herbicidai ar kiti neįvertinti veiksniai turėjo tam įtakos – jau kitas klausimas, į kurį statistiniai metodai atsakyti negali.

**4 lentelė.** Fišerio kriterijus 95 % patikimumo lygmeniui

| $\nu_1$ \ $\nu_2$ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 12 | 16 | 24 | 50 | ∞ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 161,4 | 199,5 | 215,7 | 224,6 | 230,2 | 234,0 | 238,9 | 243,9 | 246,5 | 249,0 | 251,8 | 254,3 |
| 2 | 18,51 | 19,00 | 19,16 | 19,25 | 19,30 | 19,33 | 19,37 | 19,41 | 19,43 | 19,45 | 19,47 | 19,50 |
| 3 | 10,13 | 9,55 | 9,28 | 9,12 | 9,01 | 8,94 | 8,84 | 8,74 | 8,69 | 8,64 | 8,58 | 8,53 |
| 4 | 7,71 | 6,94 | 6,59 | 6,39 | 6,26 | 6,16 | 6,04 | 5,91 | 5,84 | 5,77 | 5,70 | 5,63 |
| 5 | 6,61 | 5,79 | 5,41 | 5,19 | 5,05 | 4,95 | 4,82 | 4,68 | 4,60 | 4,53 | 4,44 | 4,36 |
| 6 | 5,99 | 5,14 | 4,76 | 4,53 | 4,39 | 4,28 | 4,15 | 4,00 | 3,92 | 3,84 | 3,75 | 3,67 |
| 7 | 5,59 | 4,74 | 4,35 | 4,12 | 3,97 | 3,87 | 3,73 | 3,57 | 3,49 | 3,41 | 3,32 | 3,23 |
| 8 | 5,32 | 4,46 | 4,07 | 3,84 | 3,69 | 3,58 | 3,44 | 3,28 | 3,20 | 3,12 | 3,03 | 2,93 |
| 9 | 5,12 | 4,26 | 3,86 | 3,63 | 3,48 | 3,37 | 3,23 | 3,07 | 2,98 | 2,90 | 2,80 | 2,71 |
| 10 | 4,96 | 4,10 | 3,71 | 3,48 | 3,33 | 3,22 | 3,07 | 2,91 | 2,82 | 2,74 | 2,64 | 2,54 |
| 11 | 4,84 | 3,98 | 3,59 | 3,36 | 3,20 | 3,09 | 2,95 | 2,79 | 2,70 | 2,61 | 2,50 | 2,40 |
| 12 | 4,75 | 3,88 | 3,49 | 3,26 | 3,11 | 3,00 | 2,85 | 2,69 | 2,60 | 2,50 | 2,40 | 2,30 |
| 13 | 4,67 | 3,80 | 3,41 | 3,18 | 3,02 | 2,92 | 2,77 | 2,60 | 2,51 | 2,42 | 2,32 | 2,21 |
| 14 | 4,60 | 3,74 | 3,34 | 3,11 | 2,96 | 2,85 | 2,70 | 2,53 | 2,44 | 2,35 | 2,24 | 2,13 |
| 15 | 4,54 | 3,68 | 3,29 | 3,06 | 2,90 | 2,79 | 2,64 | 2,48 | 2,39 | 2,29 | 2,18 | 2,07 |
| 16 | 4,49 | 3,63 | 3,24 | 3,01 | 2,85 | 2,74 | 2,59 | 2,42 | 2,33 | 2,24 | 2,13 | 2,01 |
| 17 | 4,45 | 3,59 | 3,20 | 2,96 | 2,81 | 2,70 | 2,55 | 2,38 | 2,29 | 2,19 | 2,08 | 1,96 |
| 18 | 4,41 | 3,55 | 3,16 | 2,93 | 2,77 | 2,66 | 2,51 | 2,34 | 2,25 | 2,15 | 2,04 | 1,92 |
| 19 | 4,38 | 3,52 | 3,13 | 2,90 | 2,74 | 2,63 | 2,48 | 2,31 | 2,21 | 2,11 | 2,00 | 1,88 |
| 20 | 4,35 | 3,98 | 3,11 | 2,87 | 2,71 | 2,60 | 2,45 | 2,28 | 2,18 | 2,08 | 1,96 | 1,84 |

# 3. Uždaviniai

## 1 uždavinys

Slankmačiu išmatavome strypelio skersmenį. Matavimą pakartojome 13 kartų. Matavimų duomenys pateikti 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Strypelio skersmens matavimų duomenys

| Matavimo eil. nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Skersmuo, mm | 3,32 | 3,12 | 3,17 | 3,33 | 3,34 | 3,12 | 3,31 | 3,19 | 3,20 | 3,32 | 3,19 | 3,33 | 3,61 |

1. Patikrinkite, ar visi duomenys patikimi.
2. Atmeskite nepatikimus duomenis, jeigu tokių yra.
3. Raskite strypelio skersmenį 95 % patikimumu.
4. Įvertinkite matavimo duomenų variacijos koeficientą.

### Sprendimas

1. Apskaičiuojame viso duomenų masyvo pagrindinius rodiklius: vidurkį: $\bar{x} = 3{,}273$ ir standartinį nuokrypį: $s = 0{,}131$. Tada kvantilių metodu patikriname, ar nėra duomenų masyve šiurkščių klaidų. Pirmiausia patikriname didžiausią (13) išmatuotą reikšmę: $t_{max} = (3{,}61 - 3{,}273) / 0{,}131 = 2{,}57$. Tai yra šiek tiek daugiau už ribinę kvantilio reikšmę (esant 13 matavimų ir patikimumo lygiui $P = 0{,}95$, $t \approx 2{,}4$; 2 lentelė). Todėl šį matavimą iš duomenų masyvo galime išmesti. Tada likusių 12 matavimų duomenų masyvo vidurkis $\bar{x} = 3{,}245$ ir standartinis nuokrypis $s = 0{,}0873$. Apskaičiuojame $t_{max} = (3{,}34 - 3{,}245) / 0{,}0873 = 1{,}09$. Tai yra mažiau už ribinę reikšmę, todėl matavimas patikimas. Apskaičiuojame $t_{min} = (3{,}245 - 3{,}12) / 0{,}0873 = 1{,}43$. Tai taip pat mažiau už ribinę reikšmę, todėl ir šis matavimas patikimas. Išvada – visos koreguoto duomenų masyvo reikšmės patikimos, šiurkščių klaidų nėra.
2. Strypelio skersmuo: $3{,}245 \pm t \cdot S = 3{,}245 \pm 2{,}179 \cdot 0{,}0873 / \sqrt{12} = (3{,}24 \pm 0{,}05)$ mm.
3. Matavimų variacijos koeficientas: $VK = (0{,}0873 / 3{,}245) \cdot 100 = 2{,}7$ %.

## 2 uždavinys

1. Skaičiuodami kolektyvinio sodo sklypo plotą, daug kartų išmatavome sklypo kraštinių $h$ ir $l$ ilgį (m):
   $h = 19{,}85; 19{,}90; 19{,}75; 19{,}90; 19{,}87; 19{,}79; 19{,}83; 19{,}80; 19{,}99.$
   $l = 30{,}50; 30{,}40; 30{,}52; 30{,}44; 30{,}47; 30{,}49; 30{,}52.$

Apskaičiuokite sklypo plotą 95 % patikimumu.

2. Kolektyvinio sodo bendriją sudaro 6 sklypai, kurių plotai ($m^2$):
   630±1,3; 522±1,8; 590±2,2; 605±2,0; 550±1,4; 220±1,1.

Apskaičiuokite sodo bendrijos plotą 95 % patikimumu.

**Sprendimas**

1. Apskaičiuojame abiejų duomenų masyvų vidurkius, standartinius nuokrypius ir patikimumo ribas:
   $\overline{h} = 19{,}853$; $s_h = 0{,}072$; $\Delta h = 0{,}055$;
   $\overline{l} = 30{,}477$; $s_l = 0{,}044$; $\Delta l = 0{,}041$.

Sklypo plotas $P_S = h \cdot l$, todėl ploto absoliučiajai paklaidai rasti naudotina 35 formulė:

$$\Delta P_S = 19{,}853 \cdot 30{,}477 \sqrt{\left(\frac{0{,}055}{19{,}853}\right)^2 + \left(\frac{0{,}041}{30{,}477}\right)^2} = 1{,}86 .$$

Taigi, sklypo plotas $P_S = (605{,}1 \pm 1{,}9)$ $m^2$.

2. Sodo bendrijos plotas ($P_B$) apskaičiuojamas sudedant visų sodo sklypų plotus. Sodo bendrijos ploto absoliučioji paklaida ($\Delta P_B$) apskaičiuojama pagal 3 lentelės penktąją formulę:

$$\Delta P_B = \sqrt{1{,}3^2 + 1{,}8^2 + 2{,}2^2 + 2{,}0^2 + 1{,}4^2 + 1{,}1^2} = 4{,}1 .$$

Taigi, sklypo plotas $P_B = (3117 \pm 4)$ $m^2$ arba $P_B = (31{,}17 \pm 0{,}04)$ arų.

## 3 uždavinys

Kelis kartus išmatavote šulinio vidinį skersmenį $d$ ir šulinio gylį $h$ (m):
$d = 0{,}95; 0{,}98; 1{,}02; 0{,}99; 1{,}03; 0{,}97; 0{,}99$.
$h = 8{,}9; 8{,}5; 9{,}0; 8{,}6; 8{,}9$.

Apskaičiuokite, kiek vandens gali tilpti šulinyje ir kokiu tikslumu nustatytas tūris.

**Sprendimas**

Šulinio tūris ($V$) apskaičiuojamas pagal formulę $V = \pi r^2 h$, čia $r = d/2$.
Apskaičiuojame šulinio spindulį. Tam visus šulinio skersmens matavimų duomenis padalijame pusiau. Randame šulinio vidutinį spindulį ($\overline{r} = 0{,}495$ m) ir $\Delta\overline{r} = 0{,}013$ (naudodami 0,95 patikimumo lygį) bei šulinio vidutinį gylį ($\overline{h} = 8{,}78$ m) ir $\Delta\overline{h} = 0{,}27$ (naudodami 0,95 patikimumo lygį). $\Delta V$ skaičiuojama pagal 35 formulę:

$$\Delta V = 3{,}1416 \cdot 0{,}495^2 \cdot 8{,}78\sqrt{\left(2\frac{0{,}013}{0{,}495}\right)^2 + \left(\frac{0{,}27}{8{,}78}\right)^2} = 0{,}41.$$

Šulinio tūris $V = (6{,}8 \pm 0{,}4)$ m$^3$.

## 4 uždavinys

Kontroliniame lauke auginamų kviečių grūdų masė (g) vienoje varpoje:

1,12; 1,16; 1,13; 1,16; 1,19; 1,21; 1,11; 1,21; 1,32; 1,22; 1,16.

Eksperimentiniame lauke auginamų kviečių grūdų masė (g) vienoje varpoje:

1,31; 1,25; 1,26; 1,33; 1,15; 1,19; 1,27; 1,33; 1,27; 1,34; 1,31; 1,29; 1,15; 1,11; 1,35.

Apskaičiuokite:

1. Ar skiriasi vidutinė varpų grūdų masė eksperimentiniame ir kontroliniame lauke.
2. Kuriame lauke varpos vienodesnės.

### Sprendimas

Apskaičiuojame eksperimentinio ir kontrolinio lauko varpose esančių grūdų masės vidurkį ir standartinį nuokrypį (6 lentelė):

**6 lentelė.** Grūdų masės skaičiavimo rezultatai

| | Kontrolinio lauko | Eksperimentinio lauko |
|---|---|---|
| Varpos grūdų masės vidurkis | 1,181 | 1,261 |
| Standartinis nuokrypis | 0,059 | 0,077 |
| Matavimų skaičius | 11 | 15 |

1. Apskaičiuojame *F* kriterijų (36 formulė):

$$F = \frac{s_E^2}{s_K^2} = \frac{(0{,}077)^2}{(0{,}059)^2} = 1{,}70.$$

Ribinė *F* kriterijaus reikšmė (4 lentelė) 2,82. Taigi remiantis *F* kriterijumi, abu duomenų masyvai statistiškai nesiskiria vienas nuo kito.

Patikriname šią išvadą tikslesniu Stiudento kriterijaus metodu:

$$|t| = |1{,}261 - 1{,}181|\sqrt{\frac{1 - \frac{2}{15+11}}{\frac{0{,}059^2}{11} + \frac{0{,}077^2}{15}}} = 2{,}88.$$

Ribinė Stiudento kriterijaus reikšmė laisvės laipsnių skaičiui $v = (11 + 15 - 2) = 24$ yra 2,06. Vadinasi, pagal šį kriterijų abu duomenų masyvai statistiškai skiriasi vienas nuo kito.

2. Abiejų duomenų masyvų vidurkiai skiriasi $(1{,}261 - 1{,}181) / 1{,}181 \cdot 100 = 6{,}8$ %. Taigi, eksperimentiniame lauke vidutinė vienos varpos grūdų masė didesnė 6,8 %. Suskaičiuojame abiejų duomenų masyvų variacijos koeficientus: $VK_K = (0{,}059 / 1{,}181) \cdot 100 = 5{,}0$ %, $VK_E = (0{,}077 / 1{,}261) \cdot 100 = 6{,}1$ %. Matome, kad eksperimentiniame lauke varpų grūdų masės reikšmių sklaida yra šiek tiek didesnė nei kontroliniame lauke. Matyt, mūsų naudota poveikio priemonė padidino vidutinę grūdų masę varpose, tačiau varpos yra vienodesnės kontroliniame lauke.

## 5 uždavinys

Pieno rūgšties koncentracija kraujo serume buvo nustatyta naudojantis fotometrine analitine sistema. Analitinės sistemos gradavimui buvo paruošti 7 pieno rūgšties kontroliniai mėginiai, kurie po vieną kartą buvo išmatuoti (7 lentelė).

**7 lentelė.** Pieno rūgšties analitinės sistemos gradavimas

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Koncentracija, $x$, mM | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 |
| Optinis tankis, $y_i$ | 0,2 | 0,37 | 0,64 | 0,93 | 1,22 | 1,50 | 1,80 |

Buvo atlikti trys to paties tiriamo mėginio optinio tankio matavimai: 1,52; 1,55; 1,53. Raskite pieno rūgšties koncentraciją ($c$) tiriamame mėginyje.

### Sprendimas

Šį uždavinį galima išspręsti dviem būdais – skaičiavimo ir grafiniu. Pradžioje uždavinį spręsime pasinaudodami 23–31 formulėmis. Tam apskaičiuojame reikalingus duomenis.

**8 lentelė.** Duomenys pieno rūgšties analitinės sistemos gradavimo tiesei nustatyti

| $n$ | $x_i$ | $y_i$ | $x_i^2$ | $y_i^2$ | $x_i y_i$ | $(x_i+y_i)$ | $(x_i+y_i)^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,2 | 0,20 | 0,04 | 0,0400 | 0,040 | 0,4 | 0,1600 |
| 2 | 0,5 | 0,37 | 0,25 | 0,1369 | 0,185 | 0,87 | 0,7569 |
| 3 | 1,0 | 0,64 | 1,00 | 0,4096 | 0,640 | 1,64 | 2,6896 |
| 4 | 1,5 | 0,93 | 2,25 | 0,8649 | 1,395 | 2,43 | 5,9049 |
| 5 | 2,0 | 1,22 | 4,00 | 1,4884 | 2,440 | 3,22 | 10,368 |
| 6 | 2,5 | 1,50 | 6,25 | 2,2500 | 3,750 | 4,00 | 16,000 |
| 7 | 3,0 | 1,80 | 9,00 | 3,2400 | 5,400 | 4,80 | 23,040 |
| suma: 7 | 10,7 | 6,66 | 22,79 | 8,4298 | 13,850 | 17,36 | 58,920 |

Apskaičiuojame: tiriamo mėginio matavimų duomenų vidurkį:

$$\bar{y}_{\text{an}} = \frac{1{,}52 + 1{,}55 + 1{,}53}{3} = 1{,}533,$$

visų *x* reikšmių vidurkį: $\bar{x}$ =10,7 / 7 = 1,53, ir visų *y* reikšmių vidurkį: $\bar{y}$ = 6,6 / 7 = 0,951. Tada apskaičiuojame tolimesniems skaičiavimams reikalingus duomenis:

$$\left(\sum x_i\right)^2 = 114{,}49; \quad \left(\sum y_i\right)^2 = 44{,}36; \quad \left[n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2\right] = 7 \cdot 22{,}79 - 114{,}49 = 45{,}04;$$

$$\sum (x_i + y_i)^2 = 58{,}92.$$

Dabar galime apskaičiuoti gradavimo tiesės lygties koeficientus *a* ir *b* (lygtys 23):

$$a = \frac{22{,}79 \cdot 6{,}66 - 10{,}7 \cdot 13{,}85}{45{,}04} = 0{,}07963,$$

$$b = \frac{7 \cdot 13{,}85 - 10{,}7 \cdot 6{,}66}{45{,}04} = 0{,}57034,$$

matavimų duomenų dispersiją (25 lygtis):

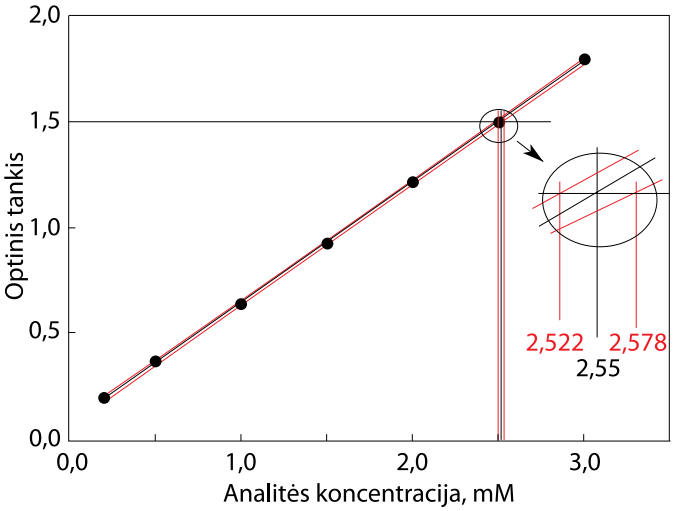
$$s_0^2 = \frac{8{,}4298 - 0{,}07963 \cdot 6{,}66 - 0.57034 \cdot 13{,}85}{5} = 5{,}104 \cdot 10^{-5},$$

matavimų duomenų standartinį nuokrypį nuo gradavimo tiesės: $s_0 = 7{,}14 \cdot 10^{-3}$.

Skaičiuodami naudojame porinį Stiudento koeficientą, šiuo atveju laisvės laipsnių skaičius $v = n - 2 = 5$, o Stiudento koeficiento reikšmė $t = 2{,}571$. Pieno rūgšties koncentraciją tiriamame mėginyje (*c*) galime apskaičiuoti pagal 27, 28 ir 31 formules:

$$c = \bar{x}_{\text{an}} \pm \Delta x_{\text{an}} = 2{,}55 \pm 2{,}571 \frac{7{,}14 \cdot 10^{-3}}{0{,}57} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{7} + \frac{7\left(1{,}533 - \frac{6{,}66}{7}\right)^2}{0{,}57^2 \cdot 45{,}04}} = (2{,}55 \pm 0{,}03)\ \text{mM}.$$

Tą patį uždavinį galima išspręsti ir grafiškai (10 pav.). Rezultatą gausime maždaug tą patį, tik tikslumas bus mažesnis.




**10 pav.** Pieno rūgšties nustatymo gradavimo tiesė ir 95 % patikimumo kreivės; išnašoje – padidinta matavimo rezultato vidurkio ir gradavimo tiesės bei patikimumo kreivių sankirta.

# Baltymų tyrimas

Vida Časaitė, Rolandas Meškys

# Turinys

1. Mikroorganizmai – baltymų (fermentų) šaltinis ..... 41

2. Baltymų gryninimas ..... 45
2.1. Ląstelių ardymo būdai ..... 46
2.2. Beląstelinio ekstrakto gavimas ..... 49
2.3. Papildomas beląstelinio ekstrakto gryninimas ..... 49
2.4. Baltymų mišinio frakcionavimas ..... 49
2.4.1. Baltymų nusodinimas ..... 49
2.4.2. Ultrafiltravimas ..... 51
2.4.3. Chromatografiniai baltymų frakcionavimo metodai ..... 51
2.4.4. Jonų mainų chromatografija ..... 52
2.4.5. Hidrofobinė chromatografija ..... 55
2.4.6. Gelchromatografija ..... 56
2.4.7. Afininė chromatografija ..... 60

3. Vektoriai. Geno klonavimas *E. coli* ląstelėse ..... 67
3.1. Plazmidės ..... 68
3.2. Bakteriofagų vektoriai ..... 69
3.3. Hibridiniai vektoriai ..... 70
3.4. Dirbtinės bakterijų chromosomos ..... 70
3.5. Eukariotų vektoriai ..... 70
3.6. Ekspresijos vektoriai ..... 71
3.7. Reporterinių genų vektoriai ..... 71
3.8. Kursuojantys vektoriai ..... 72
3.9. *E. coli* transformacija ..... 72
3.10. Geno klonavimas *E. coli* ląstelėse ..... 72

4. Metagenominių bibliotekų kūrimas ..... 76
4.1. DNR išskyrimas iš aplinkos pavyzdžių ..... 80
4.2. Bibliotekos kūrimas ..... 81
4.3. Genetinės medžiagos analizė metagenominėje bibliotekoje ..... 81

5. Baltymų savybių keitimas tikslinės mutagenezės būdais ..... 83
5.1. Mutantų bibliotekos kūrimas ..... 83
5.2. Atranka ..... 84
5.3. Atsitiktinė mutagenezė klaidinančios PGR metodu ..... 87
5.4. Cheminė mutagenezė *in vitro* ..... 89
5.5. Mutagenezė ir rekombinacija PGR metodu ..... 89
5.6. Genų maišymas ..... 89
5.7. DNR elektroforezė, gryninimas, karpymas, ligavimas ir *E. coli* transformacija ..... 89

6. Fermentų imobilizacija ..... 92
6.1. Fiziniai imobilizacijos būdai ..... 92
6.2. Cheminiai imobilizacijos būdai ..... 97

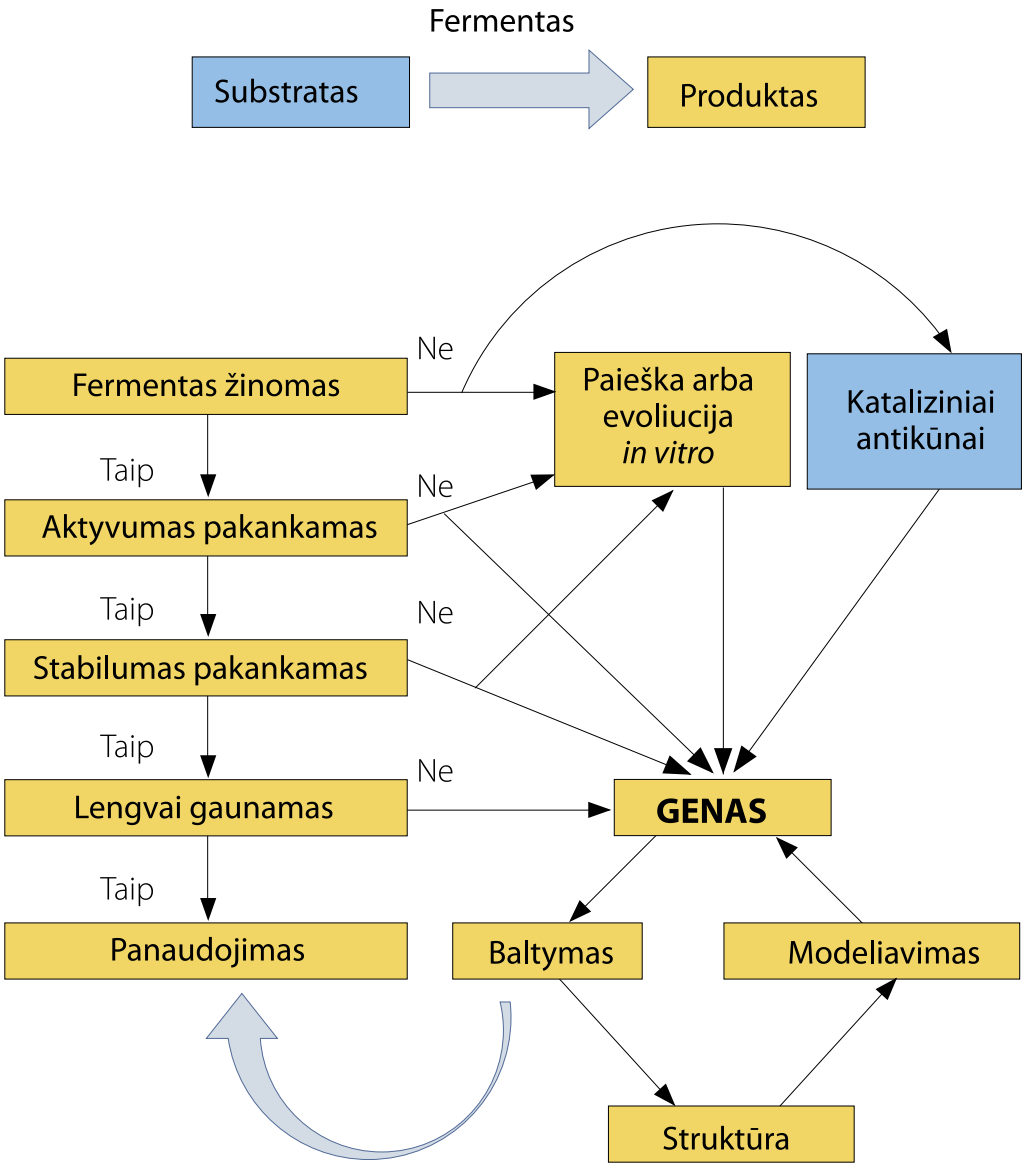
7. Tyrimo metodai ir praktikos darbai ..... 100
7.1. *Escherichia coli* auginimo terpės ..... 100
7.2. Substratą naudojančių bakterijų atranka ..... 101
7.3. Chromosominės DNR išskyrimas ..... 102
7.4. Šarminis plazmidinės DNR išskyrimo metodas ..... 103
7.5. Genetinės medžiagos išskyrimas iš aplinkos pavyzdžių ..... 104
7.6. DNR elektroforezė, DNR gryninimas ir analizė ..... 106
7.7. Imliosios kultūros paruošimo metodas ..... 107
7.8. DNR fragmento įterpimas į DNR vektorių (klonavimas) ..... 108
7.9. Atsitiktinė mutagenezė klaidinančios PGR metodu ..... 109
7.10. Cheminė mutagenezė *in vitro* ..... 111
7.11. Mutagenezė ir rekombinacija PGR metodu ..... 112
7.12. Genų maišymas ..... 113
7.13. Rekombinantinių baltymų biosintezės indukcija ir gryninimas ..... 113
7.14. Antikūnų gryninimas afininės chromatografijos metodu ..... 114
7.15. Imobilizacija ant silanu modifikuoto silikagelio ..... 115

Literatūra ..... 118

Kai kurios sąvokos ..... 119

Priedai ..... 121

Biologinių procesų tyrimai labai susiję su ląstelės komponentų (DNR, RNR, baltymų, metabolitų ir kitų) tyrimais. Norint nustatyti šių komponentų savybes, reikia mokėti juos išgryninti, t. y. atskirti nuo kitų ląstelės junginių. Šiuolaikinės biotechnologijos taip pat naudoja išgrynintus baltymus, pvz., organinėje sintezėje, žemės ūkyje, maisto pramonėje, farmacijoje. Nors baltymus galima išskirti iš įvairių organizmų (pvz., eukariotų ląstelių kultūrų, augalų, gyvūnų), dažniausiai rekombinantinių baltymų gamybai dėl tinkamų savybių (didelė įvairovė, lengva dauginti, patogu keisti ir kt.) naudojami mikroorganizmai (bakterijos, archėjos ir mikromicetai). Mikroorganizmus reikia mokėti užauginti, t. y. sukaupti biomasę, kurioje yra tikslinis baltymas (žr. skyrių *Mikroorganizmai – baltymų (fermentų) šaltinis*). Baltymų gryninimas yra sudėtingas ir dažniausiai brangus procesas, kurį sudaro daug etapų. Kokio grynumo baltymų reikia, priklauso nuo to, kur ir kam jie bus naudojami. Todėl derinant įvairius gryninimo metodus dažnai kiekvienam baltymui sukuriama speciali gryninimo metodika (žr. skyrių *Baltymų gryninimas*). Kartais tikslinių baltymų (fermentų) šaltinį nepatogu ar negalima naudoti, pvz., tai retas augalas, lėtai augantis gyvūnas, patogeninis mikroorganizmas ar virusas, arba jis nėra prieinamas (laboratorijose išauginama tik apie 1 % gamtoje gyvenančių mikroorganizmų). Tada genų inžinerijos metodais tikslinį baltymą koduojantis genas perkeliamas į organizmą, kurį paprasčiau dauginti ir iš kurio paprasčiau išskirti tikslinį baltymą (žr. skyrių *Vektoriai. Geno klonavimas E. coli ląstelėse*). Kai gamtoje aptinkamų baltymų savybės netenkina, pvz., baltymas nėra atrankus tam tikram substratui arba yra neatsparus aukštai temperatūrai, genų inžinerijos metodais jam galima suteikti reikiamų savybių (žr. skyrių *Baltymų savybių keitimas tikslinės mutagenezės būdais*) (1 pav.). Baltymai yra brangūs reagentai, todėl norint sumažinti sąnaudas fizinio ar cheminio modifikavimo metodais padidinamas baltymų stabilumas arba baltymai imobilizuojami ir naudojami daug kartų (žr. skyrių *Fermentų imobilizacija*).




**1 pav.** Fermentų tyrimo, modifikavimo ir kūrimo principinė schema.

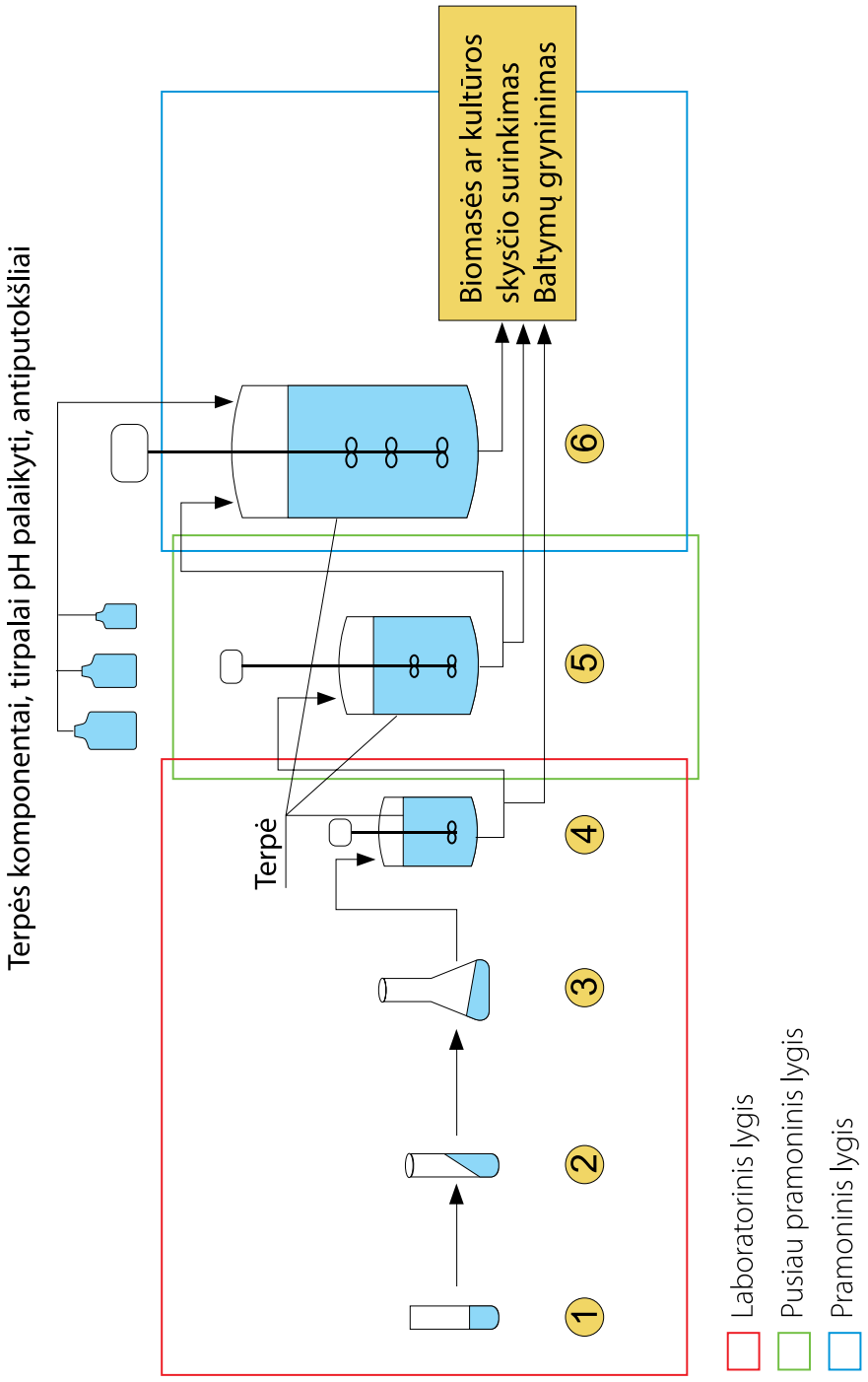
# 1. Mikroorganizmai – baltymų (fermentų) šaltinis

Norint baltymų gamybai naudoti mikroorganizmus, reikia mokėti juos dauginti, t. y. sukaupti didelį biomasės kiekį. Mikroorganizmams augti reikia anglies, fosforo ir azoto šaltinių, įvairių mikroelementų. Jie cheminių junginių pavidalu turi būti ląstelių kultivavimo (dauginimo) terpėje. Ląsteles vienu metu veikia įvairūs išoriniai veiksniai: temperatūra, pH, oksidacijos-redukcijos potencialas, joninė jėga, osmosinis ir hidrostatinis slėgis, radiacija. Mikroorganizmai prisitaiko prie išorinių veiksnių ir normaliai dauginasi bei sintetina reikiamus ar pageidaujamus metabolizmo produktus. Mikroorganizmų prisitaikymą prie kintančių sąlygų lemia didelė jų dalijimosi sparta, savaiminės mutacijos, įvairūs ląstelių bei fermentų sintezės reguliacijos mechanizmai, dėl kurių ląstelės sintetina tik tam tikrą fermentų kiekį. Išmanant biosintezės procesus galima sukurti metodų, leidžiančių reguliuoti fermentų sintezę. Įvairiais atrankos metodais galima atrinkti norimų savybių mikroorganizmus. Tokios mikroorganizmų veislės labai svarbios, todėl jų išsaugojimui skiriama nemažai dėmesio, o pačios svarbiausios saugomos specialiuose mikroorganizmų muziejuose.

Mikroorganizmų kultivavimo schema pateikta 2 paveiksle.

Mikroorganizmus galima kultivuoti paviršiniu ir giluminiu būdu. Paviršiniu būdu mikroorganizmai auginami ant standžiųjų terpių paviršiaus. Tai gali būti agaro terpės, pjuvenos, šiaudai, grūdai ir kiti panašūs substratai. Giluminiu būdu mikroorganizmai auginami skystose terpėse. Šis būdas pranašesnis už paviršinį, nes prisotinant oro didesnį terpės tūrį mikroorganizmus galima geriau aprūpinti deguonimi, gauti daug biomasės ir didelį kiekį reikiamų produktų, pvz., baltymų, polisacharidų. Laboratorijose mikroorganizmai kultivuojami kolbose arba fermentatoriuose dažniausiai skystose įvairios sudėties terpėse. Atsižvelgiant į rūšį, mikroorganizmai auginami deguoninėje (aerobinėje) ar bedeguonėje (anaerobinėje) aplinkoje.

Pagal sudėtį mitybinės terpės skirstomos į sintetines ir kompleksines. Sintetinės terpės sudarytos iš grynų cheminių junginių, kurių tikslus kiekis žinomas, todėl nesunku sekti, kaip kinta terpės komponentų koncentracija kultivuojant mikroorganizmus. Sintetinių terpių komponentai ir jų kiekis parenkamas taip, kad terpėje būtų anglies, azoto ir fosforo šaltinių, pagrindinių mikroelementų, aminorūgščių, vitaminų, – kad mikroorganizmai galėtų daugintis. Keičiant terpės sudėtį galima kontroliuoti mikroorganizmų, gaminančių tikslinį produktą (producentų), dauginimosi greitį, produkto sintezę, nereikalingų ir žalingų metabolitų kaupimąsi. Kultivuojant producentus sintetinėse terpėse galima daug kartų pakartoti procesą ir gauti tą patį produktą, o tai labai svarbu produktą gaminant pramoniniu būdu, t. y. kai kiekvieną kartą reikia pagaminti tokios pačios kokybės gaminį.




**2 pav.** Mikroorganizmų kultivavimo schema: 1 – mikroorganizmų muziejus, 2 – auginimas Petri lėkštelėje, 3 – auginimas kolbose (inokuliatas; 0,5–2 l), 4 – auginimas mažame fermentatoriuje (1–10 l), 5 – auginimas antriniame fermentatoriuje (10–250 l), 6 – pagrindinis auginimas fermentatoriuje (250–100 000 l).

Į kompleksinių terpių sudėtį, be sintetinės terpės komponentų, įeina organinės kilmės medžiagų mišinių (salyklo, misos, kukurūzų ar mielių ekstrakto, peptono, triptono, krakmolo ar celiuliozės hidrolizės produktų; 1 lentelė), o jų kiekybinė ir kokybinė sudėtis nėra tiksliai žinoma. Tokios terpės labai dažnai naudojamos mikroorganizmams kultivuoti, nes susidaro didesnis biomasės, o kartu ir tikslinių baltymų kiekis, palyginti su mikroorganizmų kultivacija sintetinėse terpėse. Kas lemia terpės pasirinkimą? Tai:

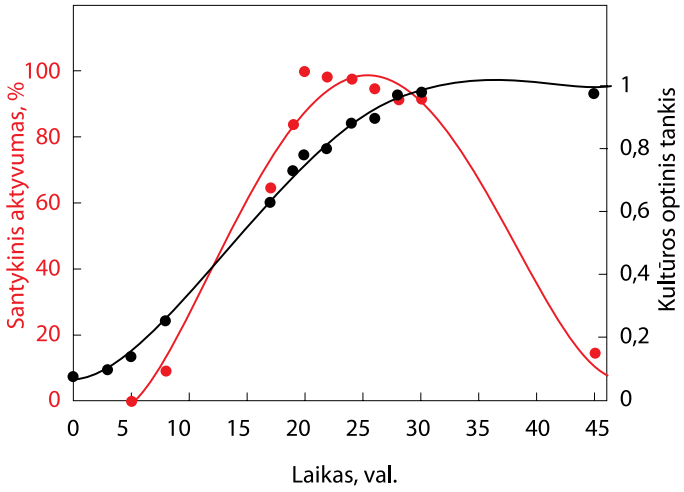
- kaina ir prieinamumas,
- vežimo, laikymo ir naudojimo sąlygos,
- sterilizacijos ir denatūracijos ypatybės,
- maišymasis, klampa, kitos reologinės savybės,
- produkto koncentracija, jo susidarymo greitis ir išeiga,
- priemaišos,
- saugumas.

Biosintezės procesams labai svarbios mikroorganizmų kultivavimo sąlygos. Fermentų sintezė priklauso nuo terpės azoto (azoto neorganinių ir organinių junginių) ir anglies šaltinių. Aminorūgštys gali skatinti arba slopinti fermentų sintezę, veikti mikroorganizmų vystymąsi. Mikroorganizmų dauginimuisi ir fermentų sintezei taip pat būtinos kitos biologiškai aktyvios

**1 lentelė.** Pagrindiniai kompleksinių terpių komponentai ir svarbiausios jų savybės

| **Anglies šaltiniai** | **Savybės** |
|---|---|
| melasa | sacharozės gamybos atlieka; sirupas (50 % sacharozės, 2 % azoto, mikroelementai ir kita) |
| salyklo ekstraktas | 90 % angliavandenių, 5 % azoto (baltymų, peptidų, aminorūgščių pavidalo) |
| išrūgos | pieno pramonės atlieka; pagrindinis angliavandenis – laktozė (apie 5 %), kitos medžiagos: baltymai, druskos, lipidai |
| alkanai ir alkoholiai | $C_{10}$–$C_{20}$ alkanai, metanolis, chemijos pramonės produktai (pvz., naftos distiliacijos); metanolis labai pigus anglies šaltinis; tinka *Pichia* ir *Candida* mielėms auginti |
| **Azoto šaltiniai** | **Savybės** |
| kukurūzų ekstraktas | kukurūzų krakmolo gamybos atlieka; 4 % azoto |
| mielių ekstraktas | gaunamas iš kepimo mielių ir jų gamybos atliekų; sudėtyje yra daug vitaminų |
| peptonas | gyvūninės kilmės baltymų (mėsos baltymų, pieno kazeino baltymų, želatinos) rūgštinis ar fermentinis hidrolizatas; brangus; naudojant terapiniams baltymams sintetinti, atsiranda gyvūninės kilmės virusų rizika |
| augalinės kilmės peptonas | sojų pupelių baltymų rūgštinis ar fermentinis hidrolizatas; saugesnis nei įprastas peptonas, nes nėra žinoma augalų virusų, pavojingų žmogui |

medžiagos – vitaminai, mikroelementai. Mikroorganizmai, gaminantys proteolizinius fermentus, kultivuojami auginimo terpėse su kukurūzų, mielių ekstraktais, turinčiais papildomų augimą skatinančių medžiagų: vitaminų, aminorūgščių, polipeptidų, mikroelementų. Mikroelementai dalyvauja mikroorganizmų metabolizmo procesuose ir aktyvina įvairių fermentų sintezę. Pavyzdžiui, jei mikromicetų ląstelės sintetina fermentą lakazę, terpėje būtinai turi būti vario, nes jis įeina į šio fermento aktyviojo centro sudėtį. Keičiant vario jonų koncentraciją mitybinėje terpėje, galima reguliuoti lakazės biosintezės greitį. Mikroorganizmų fermentų sintezei turi įtakos ne tik kultivavimo terpės sudėtis, bet ir kitos sąlygos: pasėjamosios medžiagos (inokuliato) kiekis ir savybės (jauna ar sena kultūra), terpės rūgštingumas (pH), aeracija, temperatūra. Nuo šių sąlygų priklauso ir fermento biosintezės greitis, ir eiga (3 pav.). Paprastai laboratorinėmis sąlygomis ir gamyboje kultivuojant mikroorganizmus giluminiu būdu pasėjamosios medžiagos kiekis turi būti 1–10 % terpės tūrio. Aeracija yra vienas svarbių veiksnių, reguliuojančių mikroorganizmų dauginimąsi ir biomasės kiekį. Deguonis labai blogai tirpsta vandenyje, todėl kartais terpė prisotinama gryno deguonies, o ne oro. Norint sudaryti mikroorganizmų kultivavimui tinkamiausias sąlygas, reikia atkreipti dėmesį į visus šiuos veiksnius.




**3 pav.** Hipotetinio fermento biosintezės eiga. Bakterijų biomasės kaupimosi ir hipotetinio fermento biosintezės priklausomybė nuo kultivavimo laiko: juoda kreivė žymi kultūros optinį tankį ($A_{600}$), raudona – fermento aktyvumą.

# 2. Baltymų gryninimas

Baltymai – tai iš aminorūgščių sudaryti gamtiniai polimerai. Jie skiriasi aminorūgščių seka polipeptidinėje grandinėje, krūviu, dydžiu, forma, erdvine struktūra, kofaktoriais, izoelektriniu tašku ir kitomis savybėmis. Dėl šių baltymų skirtumų juos galima atskirti nuo kitų ląstelės komponentų (2 lentelė), o jų mišinį suskirstyti į atskirus komponentus.

Mikroorganizmai sintetina ir užląstelinius, ir viduląstelinius baltymus, o ląstelėje esantys baltymai gali būti aptinkami įvairiose jos vietose. Baltymai skiriasi savo struktūra ir savybėmis (3 lentelė), nuo jų savybių priklauso ir gryninimo metodas.

**2 lentelė.** *Escherichia coli* sausos biomasės sudėtis

| Komponentas | Dalis (%) |
|---|---|
| baltymai | 55* |
| RNR | 20,5 |
| DNR | 3,1 |
| lipidai | 9,1 |
| lipopolisacharidai | 3,4 |
| mureinas | 2,5 |
| glikogenas | 2,5 |
| aminorūgštys, vitaminai, kiti mažos molekulinės masės junginiai | 2,9 |
| neorganiniai jonai | 1,0 |

* ląstelėje gali būti keli tūkstančiai skirtingų baltymų, vieno rekombinantinio baltymo kiekis nuo 0,00001 % iki 70 %.

**3 lentelė.** Kai kurios baltymų savybės

| Struktūra | Pastabos | Pavyzdys |
|---|---|---|
| monomerai | dažniausiai užląsteliniai baltymai, dažnai turi disulfidinių ryšių | lizocimas, proteinazės |
| iš vienodų monomerų sudaryti oligomerai | dažniausiai viduląsteliniai fermentai, retai turi disulfidinių ryšių | gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazė, katalazė, heksokinazė |
| iš skirtingų monomerų sudaryti oligomerai | alosteriniai fermentai, skiriasi monomerų atliekamos funkcijos | kokliušo toksinas |
| membranų paviršiniai baltymai | lengvai išlaisvinami detergentais | šarminė fosfatazė |
| membranų integralieji baltymai | stabilizuojami lipidais | porinai |
| membranų inkariniai baltymai | daugelio užląstelinių baltymų sudėtyje yra angliavandenių | glikoproteinai, lipoproteinai |

Baltymų gryninimas – tai daugiapakopis procesas (4 pav.), kurį gali sudaryti keletas ar keliolika stadijų: biomasės kaupimas, biomasės (ląstelių) ardymas, beląstelinio ekstrakto išgavimas ir jo gryninimas, baltymų mišinio frakcionavimas (organiniais tirpikliais, druskomis ar ultrafiltravimas), chromatografija. Baltymų gryninimas gali būti analitinis (gryninamas nedidelis medžiagos kiekis) arba pramoninis (gryninamas didelis medžiagos kiekis). Baltymų gryninimo tikslas – homogeninis preparatas, t. y. sudarytas tik iš vieno baltymo. Baltymų gryninimas yra brangus ir sudėtingas procesas, todėl dažnai baltymai tik dalinai gryninami – pašalinamos pagrindinės baltymą panaudoti trukdančios priemaišos. Taigi gryninimo metodo pasirinkimą lemia gryninamo baltymo naudojimo tikslas (4 lentelė).

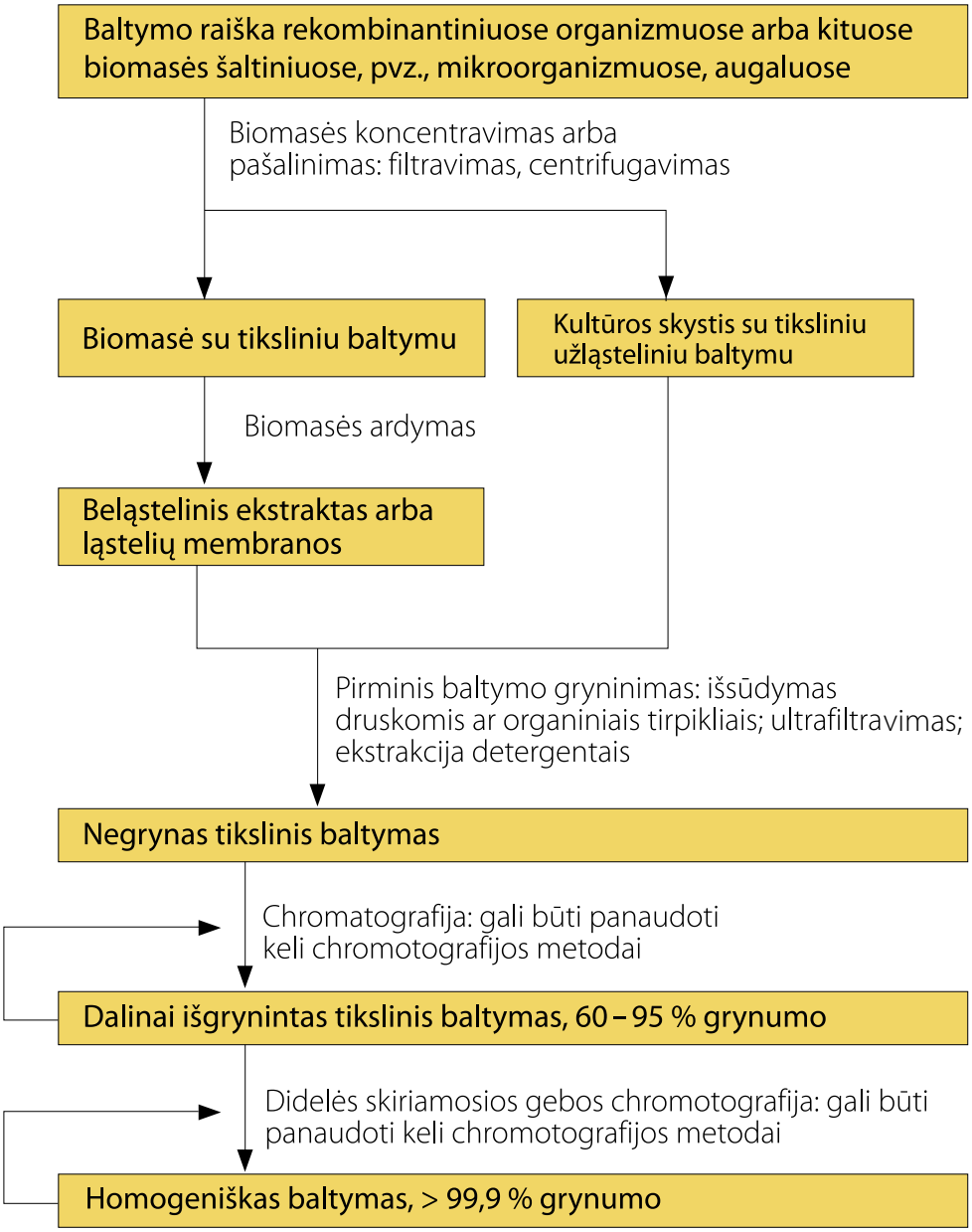
## 2.1. Ląstelių ardymo būdai

Ląstelių ardymo metu suardoma jų struktūra ir ląstelių turinys patenka į aplinką. Yra fiziniai, cheminiai ir fermentiniai ląstelių ardymo būdai. Tinkamas ardymo būdas parenkamas atsižvelgiant į gryninamo baltymo savybes (pvz., stabilumą) ir ląstelių (bakterijų, mikromicetų, augalų, gyvūnų), iš kurių išskiriamas baltymas, savybes.

Visų organizmų ląstelės turi plazminę membraną. Bakterijų ir augalų ląstelių plazminę membraną sudaro tvirtos ląstelių sienelės. Bakterijų ląstelių sienelės pagrindinė sudedamoji dalis yra peptidoglikanas (glikopeptidas). Didžiąją Gram-teigiamų bakterijų ląstelių sienelių struktūros dalį sudaro keli peptidoglikano sluoksniai, o Gram-neigiamų bakterijų ląs-

**4 lentelė.** Baltymų preparatų grynumas

| Baltymo naudojimo sritis | Gryninamo baltymo kiekis | Grynumas |
|---|---|---|
| terapija, žmonių ir gyvūnų gydymas | nuo g iki kg | ypač gryni (> 99,99 % grynumo) |
| antikūnai | nuo µg iki mg | vidutiniškai gryni (< 95 %) ar labai gryni (95–99 %) |
| kristalografija, fizinių ir cheminių savybių nustatymas | nuo mg iki g | labai gryni (95–99 %) |
| antigenai antikūnų gamyba, N-galo sekvenavimas | nuo mg iki g | vidutiniškai gryni (< 95 %) |
| pramoniniai fermentai (chemijos, maisto, tekstilės pramonė, biokatalizė) | nuo kg iki tonų | vidutiniškai gryni (< 95 %) ar mažai gryninti (< 50–70 %), dažnai labai mažai gryninti (chemijos pramonei) |




**4 pav.** Principinė baltymų gryninimo schema.

telių sienelės turi išorinį iš lipidų sudarytą sluoksnį, apsaugantį bakterijas nuo lizocimo poveikio. Ypač tvirtos grybų ir mielių ląstelių sienelės, turinčios daugiau kaip 90 % polisacharidų (chitino, manano, gliukanų). Augalų ląstelių sieneles sudaro keli celiuliozės sluoksniai, turintys lignino ir hemiceliuliozės intarpų. Šie išoriniai ląstelių sluoksniai suteikia ląstelėms ne tik formą, bet ir mechaninį atsparumą. Todėl svarbu parinkti tinkamą ląstelių ardymo būdą.

Prieš ardymą ląstelės ar susmulkinti audiniai suspenduojami tirpaluose, į kurių sudėtį įeina buferinėmis savybėmis pasižymintys junginiai (atsižvelgiant į gryninamo baltymo savybes palaikomas tam tikras terpės pH), įvairios druskos (NaCl, KCl ir kitos) joninei tirpalo jėgai palaikyti, o kad baltymų neardytų viduląsteliniai fermentai, dedama įvairių proteinazių ir peptidazių slopiklių (inhibitorių), pvz., fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), diizopropilfluorfosfato (DFF), pepstatino A, etilendinitrilotetraacto rūgšties (EDTA). Taip pat gali būti naudojamos įvairios baltymus stabilizuojančios medžiagos (gliukozė, glicerolis, sacharozė ar manitolis – dažniausiai naudojama 5–10 % koncentracija), metalų jonai ($Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, 1–10 mM koncentracija). Dažnai į tirpalus dedama redukuojančių junginių (ditiotreitolio (DTT) ar β-merkaptoetanolio (β-ME), 1–10 mM koncentracija), slopinančių baltymų merkaptogrupių (HS–) oksidaciją.

Kad baltymai nedenatūruotų suspenduojant biomasę, ardant ląsteles ar kitų gryninimo stadijų metu reikia palaikyti ne aukštesnę kaip 4 °C temperatūrą.

**Fiziniais ląstelių ardymo būdais** tiesiogiai veikiamos ląstelių membranos. Biomasė gali būti ardoma mechaniškai – trinant, pvz., įvairaus dydžio (0,1–2,0 mm) stiklo rutuliukais, steriliu smėliu arba aliuminio oksido granulėmis. Taip pat naudojami įvairūs malūnai su peiliais, didelio slėgio homogenizatoriai (pvz., *French pressure cell press*). Nedideliam biomasės kiekiui suardyti naudojami ultragarsiniai dezintegratoriai, kuriuose metalinis strypelis, pamerktas į biomasės suspensiją, aukšto dažnio (22–44 kHz) virpesiais suardo ląsteles.

Temperatūros smūgis, t. y. staigus temperatūros pokytis (nuo teigiamos iki neigiamos temperatūros), taip pat naudojamas ląstelėms ardyti. Šis būdas tinka Gram-neigiamų bakterijų ląstelėms ardyti.

Kai kurių Gram-neigiamų bakterijų ląstelėms ardyti naudojamas osmosinis šokas – biomasė suspenduojama mažos joninės jėgos tirpaluose ar net vandenyje. Šis būdas ypač tinka hidroliziniams fermentams, periplazmos baltymams išskirti.

Mechaniškai ardant biomasės suspensija dažnai įkaista (būtina aušinti), todėl šis ardymo būdas netinka temperatūrai neatspariems fermentams išskirti.

**Cheminiai ląstelių ardymo būdai**, palyginti su fiziniais, ne taip stipriai veikia ląsteles, tirpalai neįkaista, o metodai palyginti nebrangūs. Ląstelėms ardyti naudojami organiniai tirpikliai (etanolis, metanolis, acetonas), chaotropiniai junginiai (kalio tiocianatas, kalio bromidas), šarmai arba detergentai, kurie tirpdo membranų lipidus ir taip suardo ląsteles.

**Fermentiniai ląstelių ardymo būdai** naudojami baltymams išskirti iš augalų ir gyvūnų ląstelių ar mikroorganizmų. Šie būdai pagrįsti specifiniu hidrolizinių fermentų poveikiu ląstelių sienelėms, peptidoglikanui ar kitiems ląstelę supantiems polimerams. Dažnai fermentiniai ląstelių ardymo būdai naudojami kartu su mechaniniais ar cheminiais. Įvairių organizmų ląstelių

sienelių sandara skiriasi, todėl jos ardomos skirtingais fermentais arba jų mišiniais, pvz., lizocimu skaidomas peptidoglikanas, chitinazėmis – chitinas, gliukanazėmis – mielių gliukanai, celiulazėmis – augalų celiuliozė, pektinazėmis – augalų pektinas.

## 2.2. Beląstelinio ekstrakto gavimas

Suardžius ląsteles gaunamas mišinys, sudarytas iš ištirpusių baltymų, nukleorūgščių, polisacharidų, netirpių ląstelių fragmentų. Filtruojant arba centrifuguojant šį mišinį pašalinamos visos netirpios dalelės. Centrifuguojant mišinį atskiriamos skirtingo tankio dalelės. Pavyzdžiui, kai išcentrinė jėga yra 1000–2000 *g*, nusodinamos nesuardytos ląstelės, dideli jų sienelių fragmentai, dalis branduolių ir kitų ląstelės organelių. Padidinus išcentrinę jėgą iki 5000–15 000 *g*, nusėda dideli ląstelės struktūros komponentai – mitochondrijos, chloroplastai, liposomos, o norint nusodinti mažesnius komponentus, pvz., plazminę membraną, mikrosomas, ribosomas ar makromolekules, reikia 100 000–500 000 *g* išcentrinės jėgos. Taip gaunamas beląstelinis ekstraktas, kurį galima toliau frakcionuoti. Kai tiksliniai baltymai įeina į membranų sudėtį, surinkta membranų frakcija veikiama detergentais (aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis). Detergentai būna joniniai ir nejoniniai – jie skirtingai tirpina membranas. Membranų baltymai, paveikus detergentais, atsiduria detergento micelių sudėtyje. Membranų baltymai gryninami panašiai kaip tirpūs baltymai, tačiau tenka naudoti detergentus, o micelėse gali būti skirtingų baltymų, todėl juos gryninti sudėtingiau.

## 2.3. Papildomas beląstelinio ekstrakto gryninimas

Kartais prieš frakcionuojant baltymus patartina beląstelinį ekstraktą papildomai išgryninti (5 lentelė). Taip pašalinami kai kurie baltymai ir nukleorūgštys.

## 2.4. Baltymų mišinio frakcionavimas

Baltymai frakcionuojami įvairiais metodais (6 lentelė), kurie remiasi skirtingomis baltymų savybėmis. Dažniausiai eksperimentiškai pagal tiriamojo baltymo savybes parenkamas pats paprasčiausias metodų derinys.

### 2.4.1. Baltymų nusodinimas

**Baltymų nusodinimas organiniais tirpikliais.** Baltymų agregacija (molekulių sukibimas) vandeniniuose organinių tirpiklių tirpaluose priklauso nuo tirpalo santykinės dielektrinės skvarbos: kuo ji mažesnė, tuo lengviau viena su kita sąveikauja skirtingo krūvio molekulės. Taip baltymų molekulės sulimpa ir nusėda. Kiekvienam baltymui būdingos tam tikros savybės: dydis, krūvis, izoelektrinis taškas, hidrofobinių aminorūgščių kiekis ir kita, todėl keičiant organinio tirpiklio koncentraciją galima nusodinti skirtingus baltymus. Frakcionavimo organiniais tirpikliais efektyvumas priklauso nuo ištirpusių druskų koncentracijos, baltymų koncentracijos, baltymų molekulių dydžio ir krūvio, terpės pH.

**5 lentelė.** Beląstelinio ekstrakto papildomas gryninimas

| Nusodinanti medžiaga | Naudojimo sąlygos | Beląstelinis ekstraktas | Pastabos |
|---|---|---|---|
| dekstrano sulfatas | į 1 ml ekstrakto įpilama 0,04 ml 10 % dekstrano sulfato ir 1 ml 1 M $CaCl_2$. Maišoma 15 min., nuosėdos atskiriamos centrifuguojant (10 000 *g*) | ekstrakte daug lipoproteinų | nusodina lipoproteinus |
| polivinilpirolidinas | pridėti 3 % (w/v*), maišoma 0,5–4 valandas, nuosėdos atskiriamos centrifuguojant (17 000 *g*) | ekstrakte daug lipoproteinų | nusodina lipoproteinus (naudojamas vietoj dekstrano sulfato) |
| polietilenglikolis (PEG, $M_r$** > 4000) | iki 20 % (w/v), apdorojama kaip aprašyta anksčiau | plazmos baltymai | PEG sunku visiškai pašalinti, nedenatūruoja baltymų |
| polietileniminas | 0,1 % (w/v), apdorojama kaip aprašyta anksčiau | įvairūs | nusodina nukleoproteinus |
| protamino sulfatas | 1 % (w/v), apdorojama kaip aprašyta anksčiau | įvairūs | nusodina nukleoproteinus |
| streptomicino sulfatas | 1 % (w/v), apdorojama kaip aprašyta anksčiau | įvairūs | nusodina nukleorūgštis |
| oktano rūgštis | pridedama X/15 g, čia X – pavyzdžio tūris ml, apdorojama kaip aprašyta anksčiau | antikūnų koncentracija turi būti > 1 mg/ml | nusodina daugumą baltymų iš kraujo serumo, tirpale lieka imunoglobulinai |

* w/v –svoris/tūris.
** $M_r$ – molekulinė masė.

**6 lentelė.** Pagrindiniai baltymų mišinio frakcionavimo metodai

| Metodas | Priemonės | Frakcionavimą lemia |
|---|---|---|
| **nusodinimas** | amonio sulfatas ar organiniai tirpikliai | baltymo tirpumas |
| | polietileniminas | baltymo tirpumas tam tikros koncentracijos polimero tirpale, baltymo izoelektrinis taškas (pI) |
| | terpės rūgštingumas (pH) | baltymo tirpumas, kai yra tam tikras terpės pH, baltymo pI |
| **chromatografija** | jonų mainų | baltymo krūvis, jo pasiskirstymas baltymo globulėje |
| | hidrofobinė | baltymo hidrofobiškumas |
| | gelchromatografija | baltymo molekulės dydis, forma |
| | afininė | sąveika tarp ligando ir baltymo |
| | chromatofokusavimas | baltymo pI |
| **elektroforezė** | poliakrilamido gelis | baltymo krūvis, baltymo dydis, forma |
| | izoelektrinis fokusavimas | baltymo pI |
| **centrifugavimas** | sacharozės koncentracijos gradientas | baltymo dydis, tankis |
| **ultrafiltravimas** | tam tikro poringumo membrana | baltymo dydis, forma |

Nusodinant baltymus tirpalų temperatūra turi būti labai žema (paprastai apie –20 °C), nes aukštoje temperatūroje organiniai tirpikliai labai lengvai ir negrįžtamai denatūruoja baltymus – suyra jų tretinė struktūra. Dažnai naudojami šie organiniai tirpikliai: etanolis, metanolis, acetonas, izopropilo alkoholis, polietilenglikolis.

Pagrindiniai šio frakcionavimo būdo trūkumai – sunaudojamas didelis tirpalų kiekis, organiniai tirpikliai gali denatūruoti gryninamą baltymą.

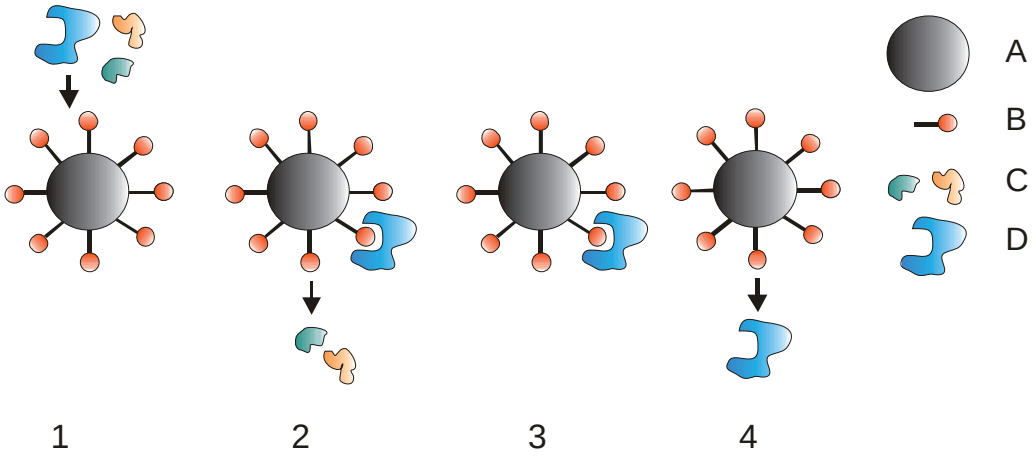
**Baltymų nusodinimas druskomis (išsūdymas).** Tai labai patogus ir dažnai naudojamas baltymų nusodinimo ir pradinio frakcionavimo būdas. Baltymams nusodinti naudojami amonio, natrio ir kalio sulfatai, fosfatai ar citratai. Dėl druskos anijonų sąveikos su teigiamojo krūvio aminorūgščių liekanomis baltymai blogiau tirpsta. Be to, kai tirpalo joninė jėga didelė, baltymai dehidratuojami, todėl jų paviršiuje esančios hidrofobinės sritys gali sąveikauti tarpusavyje. Baltymai sulimpa ir iškrinta nuosėdomis, t. y. baltymai išsūdomi. Baltymų nusodinimą druskomis lemia hidrofobinė sąveika, bet ir kiti veiksniai, pvz., tirpalo pH, tam turi įtakos. Baltymų tirpumas vandeniniuose tirpaluose priklauso nuo jų izoelektrinio taško (pI) – baltymai lengviausiai iškrinta nuosėdomis tirpaluose, kurių pH mažesnis ar artimas baltymo izoelektriniam taškui. Baltymams nusodinti ir frakcionuoti dažniausiai naudojamas amonio sulfatas. Ši druska gerai tirpsta vandenyje (sočiojo tirpalo koncentracija 4,1 M, tirpumas beveik nekinta nuo 0 °C iki 30 °C temperatūros), lengvai kristalinama, pigi, neturi neigiamo poveikio daugumai baltymų, didelė koncentracija (0,5–3,0 M) stabilizuoja baltymus, slopina proteolizinių fermentų aktyvumą. Amonio sulfato kiekis, reikalingas tam tikro sotumo tirpalams paruošti, pateiktas 1P lentelėje (priedai).

## 2.4.2. Ultrafiltravimas

Tai labai efektyvus, nuolat tobulinamas ir dažnai taikomas baltymų frakcionavimo ir koncentravimo metodas naudojant puslaides membranas. Ultrafiltravimo greičiui ir selektyvumui turi įtakos išorinis slėgis, hidrodinaminės sąlygos ultrafiltravimo aparate, frakcionuojamo tirpalo temperatūra, sudėtis ir ištirpusių medžiagų koncentracija. Naudojamos įvairios membranos (iš celiuliozės, polisulfono ir kitos). Svarbi tokių membranų savybė – mažas gimininingumas baltymams, t. y. baltymai neturi lipti prie membranos paviršiaus.

## 2.4.3. Chromatografiniai baltymų frakcionavimo metodai

Šių baltymų frakcionavimo metodų veikimas remiasi skirtingomis baltymų savybėmis – krūviu, hidrofobiškumu, dydžiu ar gebėjimu sąveikauti su tam tikru ligandu (gimininingumu) (5 pav.). Baltymai dažnai frakcionuojami per kelias stadijas. Kiekviena chromatografijos stadija turi būti logiškai parinkta, kad per kitą stadiją reikėtų atlikti kuo mažiau procedūrų, pvz., keičiant buferinį tirpalą ar tirpalo joninę jėgą. Kiekvieno baltymo gryninimui empiriškai parenkamas sorbento ligandas, jo koncentracija, druskos, eliuavimo buferinio tirpalo pH. Dažniausiai po jonų mainų chromatografijos baltymai frakcionuojami




**5 pav.** Principinė baltymų chromatografijos schema: 1 – baltymų mišinys (C ir D) pilamas į kolonėlę, užpildytą tam tikru sorbentu (matrica (A), modifikuota ligandu (B), 2 – gryninamas baltymas (D) sąveikauja (rišasi) su sorbento paviršiuje esančiomis ligando molekulėmis, 3 – su ligando molekulėmis nesąveikaujantys baltymai pašalinami išplaunant kolonėlę buferiniu tirpalu, 4 – pakeitus sąlygas (pvz., buferinio tirpalo pH, joninę jėgą, pridėjus laisvo ligando) gryninamas baltymas (D) atsikabina nuo sorbento paviršiaus.

hidrofobinės chromatografijos metodu, o po to gelchromatografija. Paprastai visa baltymo gryninimo procedūra aprašoma ir gauti rezultatai pateikiami apibendrinančioje lentelėje (3P lentelė, priedai).

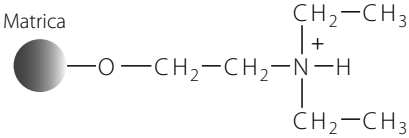
## 2.4.4. Jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografija yra vienas dažniausiai naudojamų chromatografijos metodų. Šiuo metodu atskiriami ir gryninami baltymai, polipeptidai, nukleorūgštys, polinukleotidai ir kitos biomolekulės. Baltymų mišinio frakcionavimas jonų mainų chromatografija pagrįstas skirtingu baltymų krūviu, jo tankiu ir krūvio išsidėstymu baltymo molekulėje. Dėl elektrostatinės sąveikos (elektringųjų dalelių sąveikos) baltymai grįžtamai sąveikauja su priešingo krūvio funkcinėmis grupėmis, kovalentiniais ryšiais prijungtomis prie matricos.

**Funkcinės grupės**. Matricos, prie kurių kovalentiniais ryšiais prijungtos neigiamojo krūvio funkcinės grupės, sąveikauja su teigiamojo krūvio baltymais ir vadinamos katijonitais. Matricos, prie kurių kovalentiniais ryšiais prijungtos teigiamojo krūvio funkcinės grupės, sąveikauja su neigiamojo krūvio baltymais ir vadinamos anijonitais (7 lentelė).

**Matricos** – tai vandenyje netirpūs gamtiniai polisacharidai (pvz., celiuliozė, dekstranas, agarozė) ir sintetiniai polimerai (pvz., hidrofiliniai vinilpolimerai, poliakrilamidas), prie kurių kovalentiniais ryšiais prijungtos funkcinės grupės. Matricos turi būti mechaniškai ir chemiškai patvarios įvairiuose tirpaluose, kurių pH 2–12, atspa-

**7 lentelė.** Jonų mainų ir hidrofobinėje chromatografijoje naudojamos funkcinės grupės

| Sorbentai | Funkcinės grupės | Žymėjimas | Savybės |
|---|---|---|---|
| Jonų mainų chromatografija | | | |
| dietilaminoetilo |   | DEAE | silpnas anijonitas |
| ketvirtiniai aminai (aminoetilo) | $–O–CH_2–CH_2–N^+(C_2H_5)_2–CH_2–CHOH–CH_3$ | QAE | stiprus anijonitas |
| ketvirtiniai aminai (metilamonio) | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–CH_2–CHOH–CH_2–N^+(CH_3)_3$ | Q | stiprus anijonitas |
| karboksimetilo | $–O–CH_2–COO^-$ | CM | silpnas katijonitas |
| sulfopropilo | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–CH_2–CH_2–CH_2SO_3^-$ | SP | stiprus katijonitas |
| metilsulfonato | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–CH_2–CHOH–CH_2SO_3^-$ | S | stiprus katijonitas |
| Hidrofobinė chromatografija | | | |
| eterio | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–OH$ | ETH | |
| izopropilo | $–O–CH_2–CHOH–CH_2–O–CH_2–CHOH–CH_2–O–CH–(CH_3)_2$ | ISO | |
| butilo | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–(CH_2)_3–CH_3$ | Butyl | |
| oktilo | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–(CH_2)_7–CH_3$ | Octyl | |
| fenilo | $–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–CH_2–CH(OH)–CH_2–O–C_6H_5$ | PHE | |

rios organiniams tirpikliams, detergentams ir chaotropiniams reagentams ir netrukdyti tekėti skysčiams. Matricos formuojamos porėtų granulių pavidalo. Kuo mažesnės ir homogeniškesnės granulės, tuo geriau frakcionuojamas mišinys. Matricos prigimtis taip pat turi įtakos baltymų sorbcijai, todėl, kai funkcinės grupės vienodos, baltymai gali skirtingai (priklauso nuo matricos savybių) frakcionuotis, pvz., DEAE-celiuliozės savybės skiriasi nuo DEAE-agarozės savybių.

**Kolonėlės**. Baltymai frakcionuojami kolonėlėse, užpildytose sorbentu. Kolonėlės – tai stikliniai, metaliniai arba polimeriniai vamzdeliai. Jų viršutinė ir apatinė angos uždarytos sandariais adapteriais, padengtais pralaidžiomis membranomis, kurios sulaiko sorbentą, bet praleidžia biomolekules. Gaminamos įvairaus skersmens, ilgio ir tūrio (nuo kelių mililitrų iki kelių šimtų litrų) įvairiais sorbentais užpildytos kolonėlės, taip pat gaminami sorbentai pildomoms kolonėlėms.

**Sorbentų, naudojamų jonų mainų chromatografijoje, savybės**. Kaip jonitas suriša jonus, nusako sorbento gelio talpa. Ją galima apibūdinti taip:

- Bendra jonine talpa, t. y. kiek milimolių (mmol) funkcinių grupių (ligandų) yra 1 g (ml) sorbento.
- Pasiekiama sorbento gelio talpa – tai realus baltymo kiekis, kurį gali sorbuoti 1 ml gelio. Dažniausiai pasiekiama gelio talpa išreiškiama albumino kiekiu (mg), galinčiu prisikabinti prie 1 ml jonito.
- Dinamine gelio talpa – tai baltymo (albumino) kiekis (mg), kurį gali sorbuoti 1 ml sorbento esant tam tikram frakcionavimo greičiui. Dinaminė gelio talpa mažėja didėjant frakcionavimo greičiui.

Pasiekiamos ir dinaminės gelio talpos vertės yra tik orientacinės, nes skirtingus baltymus tas pats sorbentas nevienodai sorbuoja. Paprastai 1 ml sorbento baltymo neturi būti daugiau nei 10–40 % albumino kiekio, kurį gali sorbuoti sorbentas. Jei baltymo bus pernelyg daug, dalis baltymų išeis iš kolonėlės neprikibę prie sorbento. Baltymų ar kitų biomolekulių sorbcija priklauso nuo jų savybių, matricos, funkcinių grupių savybių ir eksperimento sąlygų (pvz., pH, joninės jėgos). Didelės molekulinės masės biomolekulių, dėl erdvinių trukdžių negalinčių pasiekti gilesnių matricos granulių sluoksnių, sorbentas paprastai sorbuoja mažiau, nei mažesnės molekulinės masės molekulių. Didesnio krūvio baltymai stipriau sorbuojami, nei mažesnio krūvio. Makroporinės ir turinčios didesnį kiekį imobilizuotų ligandų matricos pasižymi geresnėmis sorbcinėmis ir frakcionavimo savybėmis. Biomolekulių sorbcija taip pat priklauso nuo eksperimento atlikimo sąlygų: buferinio tirpalo, jo pH, frakcionavimo greičio, eliuuojančio priešjonio prigimties ir kitų.

Chromatografijos stadijos: jonitu užpildytos kolonėlės paruošimas, tiriamojo baltymo sorbcija ir sorbuotų baltymų laipsniškas išplovimas iš kolonėlės.

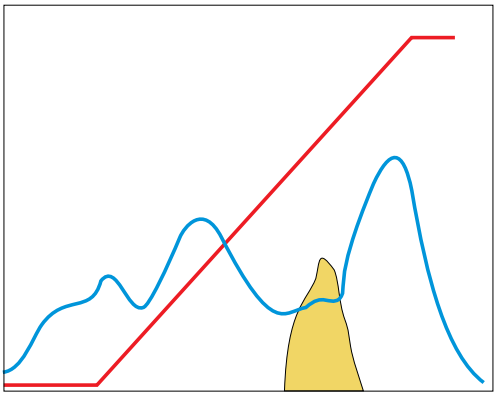
**Jonitu užpildytos kolonėlės paruošimas**. Pirmiausia per jonitu užpildytą kolonėlę leidžiamas buferinis tirpalas (dažniausiai nedidelės joninės jėgos), kol įtekančio ir ištekančio buferinio tirpalo pH pasidaro vienodas. Jei naudojamas mažos joninės jėgos buferinis tirpalas (5–10 mM), jo sunaudojama iki 20 kolonėlės tūrių, o jei didelės joninės jėgos buferinis tirpalas (50–100 mM), galima sunaudoti mažiau. Jei buferinio tirpalo joninė jėga maža, sorbentą reikia kelis kartus praplauti stiklinėlėje dideliu buferinio tirpalo kiekiu, leisti sorbentui nusistoti ir tik po to pildyti kolonėlę. Buferinis tirpalas parenkamas atsižvelgiant į jonitą, tiriamosios biomolekulės stabilumą, reikiamą pH. Dažniausiai naudojami buferiniai tirpalai pateikti 2P lentelėje (priedai).

Atliekant jonų mainų chromatografiją baltymai sorbuojami, kai buferinio tirpalo joninė jėga nedidelė (5–50 mM). Kartais darant bandymus parenkama tokia tirpalo joninė jėga, kad tiriamasis baltymas sorbuojamas, o didelė dalis nereikalingų baltymų neprikimba prie sorbento ir išteka iš kolonėlės. Kad gryninamas baltymas būtų stabilus, į buferinį tirpalą dedama priedų (metalo jonų, detergentų, druskų, stabilizatorių, kofaktorių, organinių tirpiklių, EDTA, redukuojančiųjų medžiagų ir kt.). Kolonėlių dydis parenkamas atsižvelgiant į gryninamo baltymo kiekį ir sorbento talpą. Kolonėlės pildomos, paruošiamos ir baltymas gryninamas temperatūroje, kurioje jis nedenatūruoja ir išlieka aktyvus (dažniausiai 4 °C).

**Tiriamojo baltymo sorbcija**. Chromatografijai paruoštas frakcionuojamas baltymų mišinys (pvz., beląstelinis ekstraktas ar baltymų mišinys po kurio nors chromatografijos etapo) turi būti tokiame pačiame buferiniame tirpale, kuriame buvo sorbentas. Jame neturi būti netirpių medžiagų (jos pašalinamos centrifuguojant ar filtruojant), tiriamojo baltymo negali būti daugiau nei gali sorbuoti sorbentas, o baltymo koncentracija (0,1–40 mg/ml) ir tūris (0,1–20 kolonėlės tūrių) nėra labai griežtai ribojami. Žinant tiriamojo baltymo pI parenkamas buferinio tirpalo, kuriame vyks efektyvi baltymo sorbcija, pH. Jei pH > pI, baltymo krūvis bus neigiamas ir jį sorbuos anijonitas, jei pH < pI, baltymo bendras krūvis bus teigiamas ir jį sorbuos katijonitas. Efektyviai sorbcijai reikia, kad buferinio tirpalo pH skirtųsi nuo baltymo pI bent 1. Nesorbuoti baltymai pašalinami plaunant kolonėlę buferiniu tirpalu, naudotu kolonėlei paruošti.

**Sorbuotų baltymų išplovimas (eliuavimas).** Kiekvienas baltymas skirtingai sąveikauja su sorbento funkcinėmis grupėmis, nes skiriasi baltymo krūvis, krūvio tankis, jo išsidėstymas baltymo paviršiuje. Tuo pagrįstas ir baltymų išplovimas iš kolonėlės. Baltymo sąveiką su sorbento funkcinėmis grupėmis galima reguliuoti keičiant buferinio tirpalo joninę jėgą arba pH. Sorbuoti baltymai nuo sorbento atkabinami didinant konkuruojančio jono koncentraciją. Konkuruojantys jonai (dažniausiai $Na^+$, $K^+$, $H^+$, $Cl^-$, $HCOO^-$, $CH_3COO^-$) pamažu užima baltymo vietas ant sorbento ir atkabintas baltymas eliuentu išplaunamas iš kolonėlės. Šis procesas priklauso nuo sorbcijos stiprumo – pirmiausia išplaunami silpniausiai prie sorbento prikibę baltymai, vėliausiai – stipriausiai (6 pav.).

Konkuruojančių jonų koncentraciją galima keisti labai įvairiai (koncentracijos kitimas – tolygus, didėjantis, slenkstinis, eksponentinis ar kt.). Eliuavimui (medžiagų išplovimui iš kolonėlės) naudojamų tirpalų tūris gali būti įvairus, dažniausiai tai 5–20 kolonėlių tūris. Iš kolonėlės išplaunami baltymai renkami nedidelėmis frakcijomis, o tiriamasis baltymas nustatomas pagal baltymo 280 nm ilgio bangos ar kitokio ilgio bangos sugertį, fermentinį aktyvumą, analizuojant frakcijas elektroforeze ir kitais metodais (6 pav.).




**6 pav.** Jonų mainų chromatografijos eiga. Mėlyna linija žymi baltymų koncentraciją (pvz., 280 nm ilgio bangos sugertis), raudona – konkuruojančių jonų koncentraciją. Geltonai pažymėtas kiekvienos frakcijos gryninamo fermento aktyvumas.

## 2.4.5. Hidrofobinė chromatografija

Yra žinoma, kad apie 40–50 % išorinio baltymo paviršiaus yra nepolinis (hidrofobi-

nis). Būtent ši baltymo paviršiaus dalis ir sąveikauja su hidrofobiniais sorbentais, todėl baltymų mišinius galima frakcionuoti pasinaudojus biomolekulių hidrofobiškumo skirtumais. Tokios chromatografijos metu baltymų hidrofobinės sritys sąveikauja su matricų hidrofobiniais ligandais. Hidrofobinė ir atvirkštinių fazių chromatografijos yra glaudžiai susiję baltymų gryninimo metodai, besiskiriantys sąveikos stiprumu. Hidrofobinėje chromatografijoje naudojamuose sorbentuose ligandų kiekis yra 10–50 μmol/ml gelio, o atvirkštinių fazių chromatografijoje naudojamuose sorbentuose – keli šimtai μmol/ml gelio, todėl baltymai išplaunami nepoliniais organiniais tirpikliais. Atvirkštinių fazių chromatografija naudojama peptidams ir mažos molekulinės masės baltymams, stabiliems vandens ir organinių tirpiklių mišinyje, frakcionuoti ir išskirti.

Sorbento hidrofobiškumas priklauso nuo funkcinių grupių alifatinės grandinės ilgio (ar benzeno žiedų skaičiaus) ir funkcinių grupių kiekio ant matricos (7 lentelė).

Reikalingas kolonėlės dydis apskaičiuojamas pagal tiriamojo baltymo kiekį ir pagal tai, kiek jo gali surišti sorbentas (dažniausiai naudojamos 5–10 cm ilgio kolonėlės). Kaip ir jonų mainų chromatografijoje, kolonėlės pirma praplaunamos baltymų sorbcijos buferiniu tirpalu. Kad baltymą sorbuotų hidrofobinis sorbentas, į buferinį tirpalą pilama didelės koncentracijos druskų tirpalų: 1–3 M NaCl arba 0,5–3 M $K_2SO_4$, $Na_2SO_4$ arba 0,5–4 M $(NH_4)SO_4$. Didinant druskų koncentraciją didėja baltymų sorbcija ant hidrofobinių sorbentų, baltymai elgiasi panašiai kaip išsūdymo druskomis metu.

Baltymų mišinys ruošiamas arba dializuojant prieš tinkamą buferinį tirpalą, arba pakeičiant buferinį tirpalą gelchromatografijos būdu, arba tiesiog pridedant atitinkamą druskos kiekį į baltymų mišinį. Jei pridėjus amonio sulfato tiriamasis baltymas iškrinta nuosėdomis, reikėtų mažinti amonio sulfato koncentraciją, keisti jį NaCl arba frakcionavimui naudoti sorbentą, tarp kurio ligandų ir baltymo būtų stipri hidrofobinė sąveika. Frakcionuojamo baltymo neturi būti daugiau, nei gali surišti sorbentas.

Baltymai iš kolonėlės su hidrofobiniais sorbentais išplaunami tolygiai arba slenksčiais mažinant druskų koncentraciją buferiniame tirpale, praplovus kolonėlę vandeniu išplaunami beveik visi sorbuoti baltymai. Kad baltymai būtų dar geriau išplaunami, galima naudoti organinius tirpiklius, kurie maišosi su vandeniu (etilenglikolį, propilenglikolį, glicerolį), detergentus, chaotropines druskas. Šie priedai konkuruoja su baltymu dėl surišimo vietos, todėl susilpnėja baltymo ir ligando sąveika.

## 2.4.6. Gelchromatografija

Gelchromatografija – baltymų frakcionavimo būdas, pagrįstas skirtinga baltymų molekuline mase ir forma. Gelchromatografiją galima naudoti, kai biomolekulės lengvai praranda natūralią (natyvią) struktūrą dėl pH pokyčių, didelės druskų koncentracijos. Baltymai frakcionuojami kolonėlėse, užpildytose porėtomis granulėmis. Skirtingos molekulinės masės molekulės nevienodai giliai prasiskverbia į granulių vidų – didesnės gali patekti tik prie granulių paviršiaus, mažesnės įsiskverbia giliau, o pačios mažiausios – į visas gelio granulių poras. Judant

buferiniam tirpalui kolonėle pirmiausia išplaunami didžiausi baltymai, po to vidutinio dydžio, vėliausiai – patys mažiausi, kuriems ištrūkti iš giliausių granulių sluoksnių reikia daugiausia laiko. Kitaip negu jonų mainų chromatografijoje, gelchromatografijos metu baltymai paprastai nesąveikauja su granulių matrica ir buferinio tirpalo sudėtis dažniausiai neturi įtakos baltymų judėjimui kolonėlėje, todėl gelchromatografijos sąlygos gali būti labai įvairios, t. y. frakcionuoti galima, jei buferiniame tirpale yra kofaktorių, detergentų, chaotropinių junginių, kai tirpalo joninė jėga yra didelė ar maža, aukštoje temperatūroje. Galima frakcionuoti baltymų kompleksus, sudarytus iš kelių ar keliolikos skirtingų baltymų.

**Teorinės sąvokos** (7 pav.)

$V_t$ – bendrasis kolonėlės tūris ($h \times \pi R^2$).

$V_o$ – laisvasis tūris (tarp granulių esančio buferinio tirpalo tūris, judančioji fazė).

$V_s$ – erdvė granulių viduje (buferinio tirpalo tūris granulių viduje, nejudančioji fazė).

$V_s = V_t - V_o$

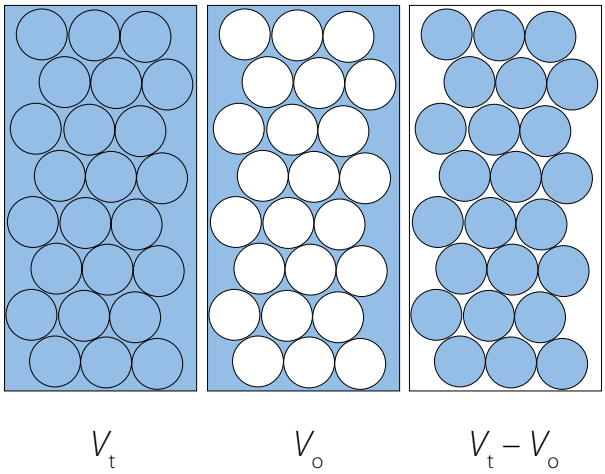
$V_e$ – baltymo išplovimo tirpalo tūris (tai tirpalo, kuriuo išplaunamas baltymas, tūris).

$K_{av}$ – baltymų skirstymąsi nusakantis pasiskirstymo koeficientas (nusako nejudančiosios fazės dalį, į kurią gali pereiti baltymas).

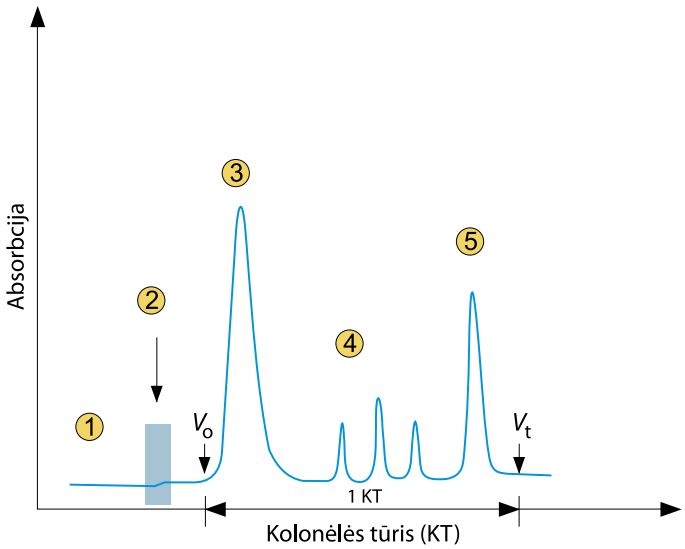
$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o = V_e - V_o / V_s$

$1 > K_{av} > 0$

Visos baltymo molekulės turi būti išplautos iš kolonėlės buferinio tirpalo tūriu, lygiu vienam kolonėlės tūriui, taigi $K_{av}$ negali būti didesnis už 1 ir mažesnis už 0. Kai pasiskirstymo koeficientas lygus 1, reiškia, gryninamos molekulės yra labai mažos ir patenka į visas gelio granulių poras. Jei $K_{av}$ artėja prie 0, reiškia, baltymai visai nepatenka į granulių vidų ir išeina su judančiąja faze ($V_e = V_o$). Jei $K_{av}$ yra didesnis už 1, reiškia, baltymas išplaunamas didesniu nei 1 kolonėlės buferinio tirpalo tūriu, t. y. baltymas sąveikauja su granulėmis. Jei $K_{av}$ vertė neigiama, reiškia, $V_e$ mažesnis už $V_o$, greičiausiai tai yra blogai užpildytos kolonėlės rodiklis (8 pav.).




**7 pav.** Teorinės gelchromatografijos sąvokos.




**8 pav.** Baltymų mišinio skirstymo pagal molekulinę masę teorinė chromatograma: 1 – kolonėlės paruošimas, 2 – pavyzdžio tūris, 3 – išplaunami didelės molekulinės masės baltymai, 4 – išplaunami vidutinės molekulinės masės baltymai, 5 – išplaunami mažos molekulinės masės baltymai.

Gelchromatografija naudojama, kai:

- reikia tiriamąjį mišinį suskirstyti į dvi grupes: mažos molekulinės masės ir didelės molekulinės masės molekules. Tai reikalinga, pvz., kai norima pašalinti mažos arba labai didelės molekulinės masės priemaišas, pakeisti buferinį tirpalą prieš paruošiant baltymą saugojimui arba liofilizacijai;
- reikia baltymus suskirstyti pagal molekulinę masę ir nustatyti tiriamojo baltymo molekulinę masę.

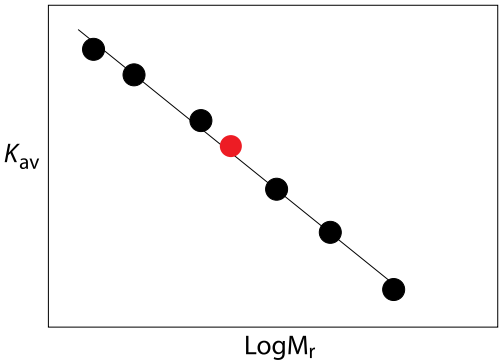
Baltymų mišinio frakcionavimo sėkmė priklauso nuo tinkamo gelio parinkimo, gero kolonėlių užpildymo, kokybiško chromatografijos atlikimo. Gelchromatografijos kolonėlių paruošimui naudojamas buferinis tirpalas. Jo tūris lygus 2–5 kolonėlės tūriams, o baltymų išplovimui buferinio tirpalo reikia mažiau – 1–2 kolonėlės tūrių. Baltymų mišinio skirstymui į grupes (druskoms pašalinti, buferiniam tirpalui pakeisti) naudojamos didelio skersmens ir trumpos (5–10 cm) kolonėlės, o baltymų skirstymui pagal molekulinę masę – siauros ir ilgos (30–50 cm). Gelchromatografijoje svarbu ne baltymo kiekis, bet baltymo pavyzdžio tūris. Jei gelchromatografijos tikslas – suskirstyti baltymus į grupes, baltymų mišinio tūris gali siekti 30 % kolonėlės tūrio, o jei baltymai skirstomi pagal molekulinę masę, – ne daugiau kaip 1–3 %. Tiriamasis baltymas turi būti stabilus naudojamame buferiniame tirpale, jo koncentracija gali siekti 70 mg/ml, reikėtų pašalinti lipidus

ir lipoproteinus, nes jie gali didinti tirpalo klampumą. Pildyti kolonėlę ir išplauti baltymus galima skirtingais buferiniais tirpalais, o kad baltymų nesorbuotų gelio granulės, dažnai į buferinį tirpalą pilama 0,15 M NaCl tirpalo. Reikia vengti medžiagų, galinčių inaktyvinti ar nusodinti baltymus. Gelio granulių dydis ir matrica parenkama pagal darbo tikslą. Iš gaminamų gelchromatografijos priemonių galima pasirinkti tinkamą bet kokiam baltymų mišiniui frakcionuoti.

Pagal granulių skersmenį geliai skirstomi į *coarse*, *medium*, *fine*, *superfine*. Kuo granulės mažesnės, tuo geriau suskirstomas baltymų mišinys, nes sutrumpėja baltymų judėjimo kelias iš gelio granulių nejudančiosios fazės į judančiąją fazę, tačiau lėtėja frakcionavimo greitis (ribojamas slėgis). Baltymų mišinys geriau suskirstomas, kai frakcionavimo greitis mažas (bet ne mažesnis už mažiausią gamintojo rekomenduojamą). Nustačius optimalias gelchromatografijos sąlygas, galima jas taikyti didesniems mėginiams frakcionuoti, tik reikia išlaikyti tą patį mėginio ir kolonėlės tūrio santykį (galima didinti kolonėlės skersmenį, bet negalima keisti jos aukščio).

**Gelchromatografijos taikymas tiriamojo baltymo molekulinei masei nustatyti.** Molekulinė masė nustatoma lyginant žinomos molekulinės masės baltymų išplovimo tūrį su tiriamojo baltymo išplovimo tūriu. Baltymo išplovimo tūris tiesiogiai priklauso nuo jo molekulinės masės (jei tarsime, kad baltymai yra idealios sferos formos), kai pasiskirstymo koeficientas yra nuo 0,1 iki 0,7. Molekulinei masei nustatyti parenkamas toks gelis, kad standartinių žinomos molekulinės masės baltymų ir tiriamojo baltymo pasiskirstymo koeficientas būtų nuo 0,1 iki 0,7. Paruošta kolonėlė kalibruojama žinomos molekulinės masės baltymų mišiniu (apskaičiuojamas $K_{av}$), o po to frakcionuojamas tiriamasis pavyzdys. Braižomas $K_{av}$ priklausomybės nuo molekulinės masės logaritmo grafikas: ordinačių ašyje – nežinomos molekulinės masės baltymo $K_{av}$, abscisių ašyje – molekulinės masės logaritmas, ir apskaičiuojama tiriamojo baltymo molekulinė masė (9 pav.).

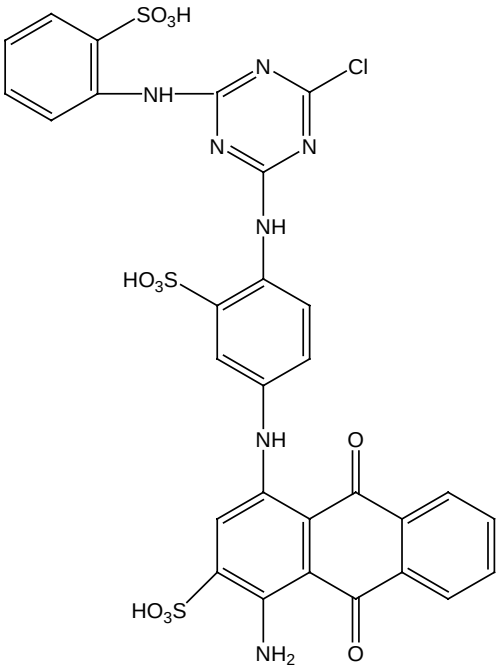
Kolonėlėms kalibruoti gaminami žinomos molekulinės masės baltymų pavyzdžiai su Dekstrano mėlio (*Dextran blue*, molekulinė masė apie 2 MDa) mėginiu, skirtu laisvajam kolonėlės tūriui nustatyti. Baltymo pavyzdžio tūris neturi viršyti 2 % kolonėlės tūrio, o į buferinį tirpalą rekomenduojama įpilti 0,15 M NaCl tirpalo, nes tada sumažėja nespecifinė baltymų sorbcija ant granulių. Chromatografija gali būti atliekama tokiomis sąlygomis, kai natūralioji baltymų struktūra nepakinta, ir tokiomis, kai baltymai denatūruoja (šlapalo, guanidino chlorido, SDS tirpaluose), kad baltymų struktūros skirtumai turėtų mažiau įtakos rezultatams.




**9 pav.** Pasiskirstymo koeficiento ($K_{av}$) priklausomybė nuo baltymų molekulinės masės ($M_r$).

## 2.4.7. Afininė chromatografija

Afininė (giminingumo) chromatografija – metodas, kuriuo gryninami baltymai remiantis jų biologine funkcija ar chemine struktūra. Baltymų mišinys frakcionuojamas dėl baltymų molekulių ir cheminiais ryšiais prie matricos prijungtų ligandų grįžtamosios sąveikos. Ligandai gali būti gamtiniai (pvz., aminorūgštys, kofaktoriai) ar sintetiniai junginiai (pvz., sintetiniai dažikliai, 10 pav.).




**10 pav.** Sintetinis *Cibacron Blue* dažiklis, naudojamas afininėje chromatografijoje.

Sąveika tarp ligando ir biomolekulės gali būti elektrostatinė, hidrofobinė ar nulemta vandenilinių ryšių. Biomolekulės nuo afininio sorbento pašalinamos pridėjus laisvo ligando ar jo analogo arba pakeitus buferinio tirpalo joninę jėgą ar pH. Šis frakcionavimo būdas yra labai atrankus, gaunami tūkstančius kartų grynesni baltymai, o jų išeiga dažniausiai būna labai didelė. Svarbu tai, kad gryninamos biomolekulės koncentruojasi. Šis metodas idealiai tinka tada, kai matrica yra modifikuota ligandu, kurį gali specifiškai atpažinti tik gryninamas baltymas, o visos kitos biomolekulės su juo nesąveikauja.

**Afininių sorbentų naudojimas įvairioms biomolekulėms gryninti.** Afininiai sorbentai dažnai naudojami įvairioms biomolekulėms gryninti. 8 lentelėje pateikta informacija apie kai kurių afininių sorbentų panaudojimą.

**Afininių sorbentų sudėtinės dalys.** Afininį sorbentą sudaro matrica, įvairaus ilgio ir struktūros funkcinės grupės ir ligando molekulės. Dažniausiai ligando ir biomolekulės surišimo vieta yra biomolekulės viduje, todėl dėl erdvinių trukdžių jie gali blogai susirišti. Todėl tarp matricos ir ligando dažnai įterpiamos įvairaus ilgio ir struktūros funkcinės grupės – ligandas nutolsta nuo matricos ir taip sustiprėja biomolekulių sąveika su ligandu. Funkcines grupes reikia įterpti, kai ligandas mažesnis negu 1000–5000 Da (fermentų substratai ar jų analogai, fermentų inhibitoriai, kofaktoriai ir kt.), o kai ligando molekulinė masė didesnė nei 5000 Da (virusai, baltymai, nukleorūgščių fragmentai ir kt.), nereikia tarp matricos ir ligando įterpti jokių papildomų grupių. Šiuo metu gaminamos afininei

**8 lentelė.** Afininių sorbentų naudojimas

| Gryninamos biomolekulės | Prie matricos prisiūtas ligandas | Sorbentų pavyzdžiai (GE Healthcare) |
|---|---|---|
| imunoglobulinai | *Staphylococcus aureus* ir *Streptococcus* ląstelių baltymai, atpažįstantys imunoglobulinus | Protein A, Protein G, HiTrap IgM, IgY Sepharose |
| rekombinantiniai baltymai, modifikuoti papildomomis sekomis (inkarais) | glutationas, metalo chelatai, imunoglobulinai ir kiti | GSTrap FF, Glutathione Sepharose 4 FF, HiTrap Chelating HP, HiTrap Albumine IgG |
| serino ir kitos proteazės | *p*-aminobenzamidinas, argininas | Benzamidine Sepharose 4FF, Arginine sepharose 4B |
| DNR surišantys baltymai | heparinas | HiTrap Heparin, Heparin Sepharose 6B |
| biotinu žymėti baltymai ar kitos biomolekulės | streptavidinas | HiTrap Streptavidin HP, Streptavidin Sepharose HP |
| fibronektinas | želatina | Gelatin Sepharose 4B |
| albuminas | sintetinis dažiklis (pvz., *Cibacron Blue*) | Cibacron Blue F3G-A, HiTrap Blue HP |
| nuo $NAD^+$ priklausomos dehidrogenazės ir nuo ATP priklausomos kinazės | 5´-AMP, cibakronas | 5´-AMP Sepharose, HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 FF |
| nuo $NADP^+$ priklausomos dehidrogenazės | 2´,5´-ADP, sintetinis policiklinis dažiklis *Porcion Red* | 2´,5´ -ADP Sepharose 4B, Red Sepharose 4B |
| glikoproteinai ir polisacharidai | lektinai | Con A Sepharose 4B, Lentil Lectin Sepharose 4B |
| DNR ar RNR molekulės | oligonukleotidai | paprastai sintetinama konkrečiai sekai |
| su tioliais reaguojančios molekulės | tioliai | Thiopropyl Sepharose 6B |

chromatografijai paruoštos matricos, kurios aktyvintos įvairiomis funkcinėmis grupėmis (amino-, hidroksi- ar karboksigrupėmis), kad būtų galima prijungti norimą ligandą. Tai galimybė pačiam susisintetinti norimo gimininingumo sorbentą.

**Pavyzdžio paruošimas afininei chromatografijai.** Prieš naudojant šį metodą rekomenduojama nors iš dalies išgryninti tiriamąjį pavyzdį, nes tada neužsikimš kolonėlės ir nereikės jų veikti agresyviomis priemonėmis, kurios sutrumpina afininių sorbentų naudojimo laiką. Kartais pavyzdžio nebūtina ypatingai ruošti, užtenka tik dializuoti ir nuskaidrinti. Būtina taip parinkti buferinį tirpalą, jo pH, joninę jėgą ir priedus (pvz., detergentus), kad tiriamosios biomolekulės gerai jame tirptų ir išlaikytų natūralią struktūrą. Prieš darbą reikia patikrinti, ar numatytomis biomolekulių išplovimo sąlygomis (pH, didelė druskų koncentracija, organiniai tirpikliai, proteazės) jos nedenatūruos ir nepakis. Jei reikia, prieš naudojant afininės chromatografijos metodą tiriamąjį pavyzdį galima iš dalies išgryninti kitais chromatografijos metodais.

**Sorbuotų biomolekulių išplovimas iš kolonėlės su afininiu sorbentu.** Sorbuotos biomolekulės desorbuojamos keliais būdais.

**Pirmasis būdas.** Keičiama buferinio tirpalo sudėtis taip, kad sorbuotam baltymui ar kitai biomolekulei atsikabinant nuo ligando nebūtų pažeista nei jos, nei ligando struktūra. Vienas švelniausių desorbcijos būdų, nepažeidžiantis ligando ir biomolekulės struktūros, yra tirpalo joninės jėgos keitimas, pvz., eliuuojant 1 M NaCl gradientu ar šuoliais keičiant druskos koncentraciją.

**Antrasis būdas.** Biomolekulėms išplauti naudojamas ekstremalaus pH arba didelės koncentracijos chaotropinių druskų tirpalas, tačiau tai gali grįžtamai arba negrįžtamai pažeisti ligando ir biomolekulės struktūrą. Biomolekules galima išplauti keičiant buferinio tirpalo pH, kai kintanti ligando arba baltymo krūvį turinčių grupių jonizacija silpnina ligando ir biomolekulės sąveiką ir biomolekulės desorbuojamos. Tai dažniausiai naudojamas išplovimo būdas. Kad nebūtų pažeista biomolekulės struktūra, surinktų frakcijų pH nedelsiant neutralizuojamas, dažniausiai 1 M Tris buferiniu tirpalu (pH 9). Desorbcijai gali būti naudojami organiniai tirpikliai (paprastai 10 % dioksanas arba 50 % etilenglikolis), mažinantys eliuento dielektrinę skvarbą ir silpninantys ligando ir biomolekulės sąveiką. Chaotropiniai junginiai (guanidino chloridas, šlapalas) keičia tirpalo struktūrą ir desorbuoja biomolekules.

**Trečiasis būdas.** Biomolekulės desorbuojamos į buferinį tirpalą pridėjus specifiškai su ligandu arba biomolekule besijungiančių medžiagų, kurios konkuruodamos dėl surišimo vietos suardo ligando ir biomolekulės sąveiką. Konkurencinis išplovimas – dažnai naudojamas nei sorbento, nei tiriamosios biomolekulės struktūros nekeičiantis išplovimo iš kolonėlės su afininiu sorbentu būdas. Selektyvus eliuentas desorbuoja biomolekulę konkuruodamas dėl surišimo vietos su ligandu arba biomolekule. Kaip eliuentai gali būti naudojami fermentų substratai, kofaktoriai, metalo jonai, inhibitoriai ir kiti junginiai. Kai kada dėl didelės ligandų kainos šis biomolekulių išplovimo iš kolonėlės būdas gali būti nepatrauklus.

Toliau aptarta, kada dažniausiai naudojama afininė chromatografija.

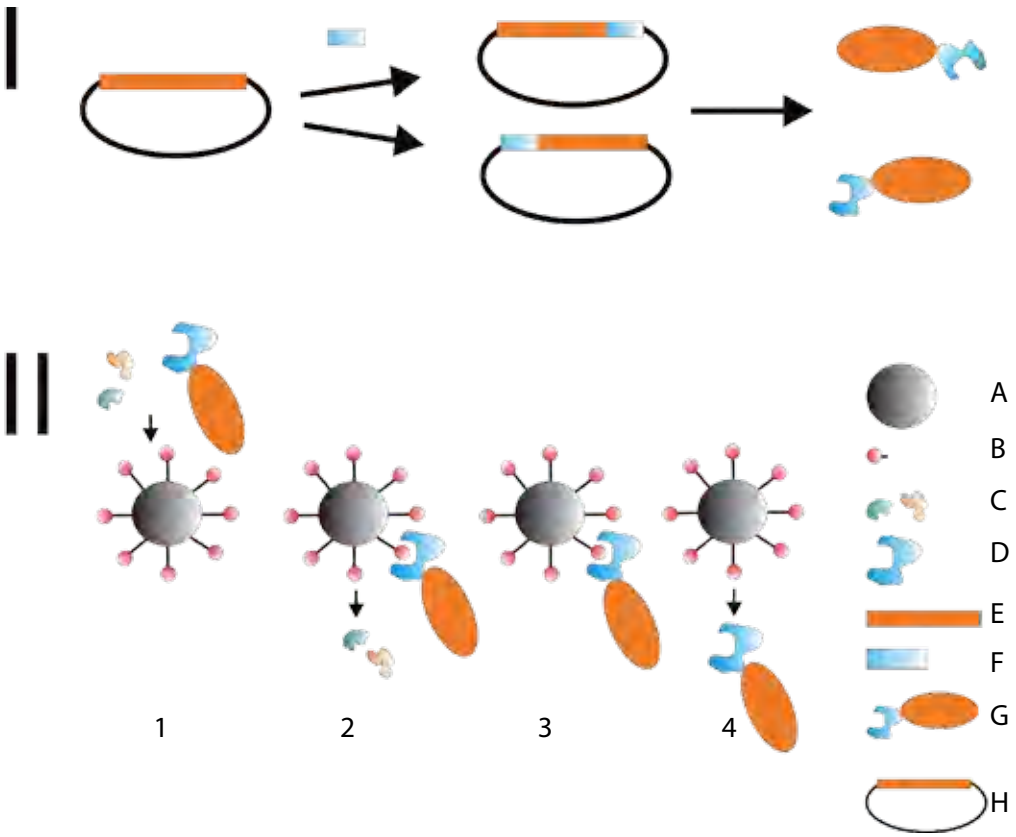
**Imunoglobulinų gryninimas.** Afininis antikūnų gryninimas gali būti pagrįstas stipria ir specifiška antikūno ir antigeno sąveika. Kaip ligandas dažniausiai naudojamas antigenas. Jei ligandas yra antikūnas, galima atrankiai iš baltymų mišinio išskirti norimą antigeną.

Labai populiaru imunoglobulinų gryninimui naudoti baltymus, išskirtus iš *Staphylococcus aureus* (baltymas A), *Streptococcus* (baltymas G) ar panašių mikroorganizmų. Šie baltymai yra labai gimininingi polikloninių ir monokloninių imunoglobulinų Fc sričiai. Priklausomai nuo baltymo šaltinio, jie gali atpažinti skirtingų klasių (A, G, M ir kitų) imunoglobulinus, todėl tokius baltymus naudojant kaip ligandus galima greitai ir efektyviai išgryninti įvairių klasių antikūnus. Prieš afininę chromatografiją rekomenduojama dalinai gryninti tiriamąją medžiagą (pašalinti lipoproteidus, nusodinti imunoglobulinus amonio sulfatu ir ištirpinti juos sorbcijos buferiniame tirpale). Frakcionuojant tiriamąjį pavyzdį specifiškai sorbuojami imunoglobulinai, o kiti baltymai pasišalina neprikibę prie sorbento. Imunoglobulinai išplaunami tolygiai mažinant buferinio tirpalo pH ar per kolonėlę leidžiant rūgštų buferinį tirpalą (pH 3,5–5,0). Surinktų frakcijų pH nedelsiant neutralizuojamas 1 M Tris buferiniu tirpalu (pH 9,0), t. y. paprastai į mėgintuvėlius, kur surenkamos frakcijos, iš anksto pilamas tam tikras 1 M Tris buferinio tirpalo kiekis, kad būtų išsaugota imunoglobulinų natyvi struktūra.

**Rekombinantinių baltymų gryninimas.** Vis dažniau rekombinantinių baltymų gryninimui afininės chromatografijos metodu naudojamos žinomo dydžio ir struktūros polipeptidinės sekos – inkarai („tag“). Jie įterpiami į gryninamų baltymų struktūrą genų inžinerijos metodais ir specifiškai rišasi prie tam tikrų afininių sorbentų ligandų (11 pav.). Įterpus inkarus į baltymo struktūrą galima greitai ir efektyviai atskirti modifikuotus baltymus nuo kitų ląstelės baltymų ir juos sukoncentruoti. Inkarai, sorbentų ligandai ir išplovimo sąlygos pateiktos 9 lentelėje.

Išgrynintų rekombinantinių baltymų inkarai nukerpami tam tikromis proteazėmis. Proteazės iš baltymo ir proteazių mišinio pašalinamos naudojant afininius sorbentus, skirtus proteazėms surišti.

**Serino proteazių pašalinimas arba gryninimas.** Ardant ląsteles paprastai į beląstelinį ekstraktą patenka proteazės, kurios lemia nespecifinę baltymų hidrolizę. Jas būtina pašalinti arba slopinti jų veikimą jau per pirmąsias baltymų gryninimo stadijas. Proteazes galima pašalinti naudojant afininius sorbentus (12 pav.), skirtus proteazėms surišti. Sintetinis inhibitorius *para*-aminobenzamidinas, imobilizuotas ant sefarozės matricos, naudojamas kaip specifinis sorbentas tripsinui, tripsino tipo serino proteazėms ir zimogenams (neaktyvioms proteolizinių fermentų formoms) surišti. Jis dažnai naudojamas proteazių sorbcijai iš kultūros skysčio, beląstelinio ekstrakto ar serumo. Nukirpus rekombinantinių baltymų inkarus proteazės pašalinamos naudojant afininius sorbentus su imobilizuotu *p*-aminobenzamidinu. Proteazės išplaunamos 0,5 M glicino tirpalu (pH 3,0).



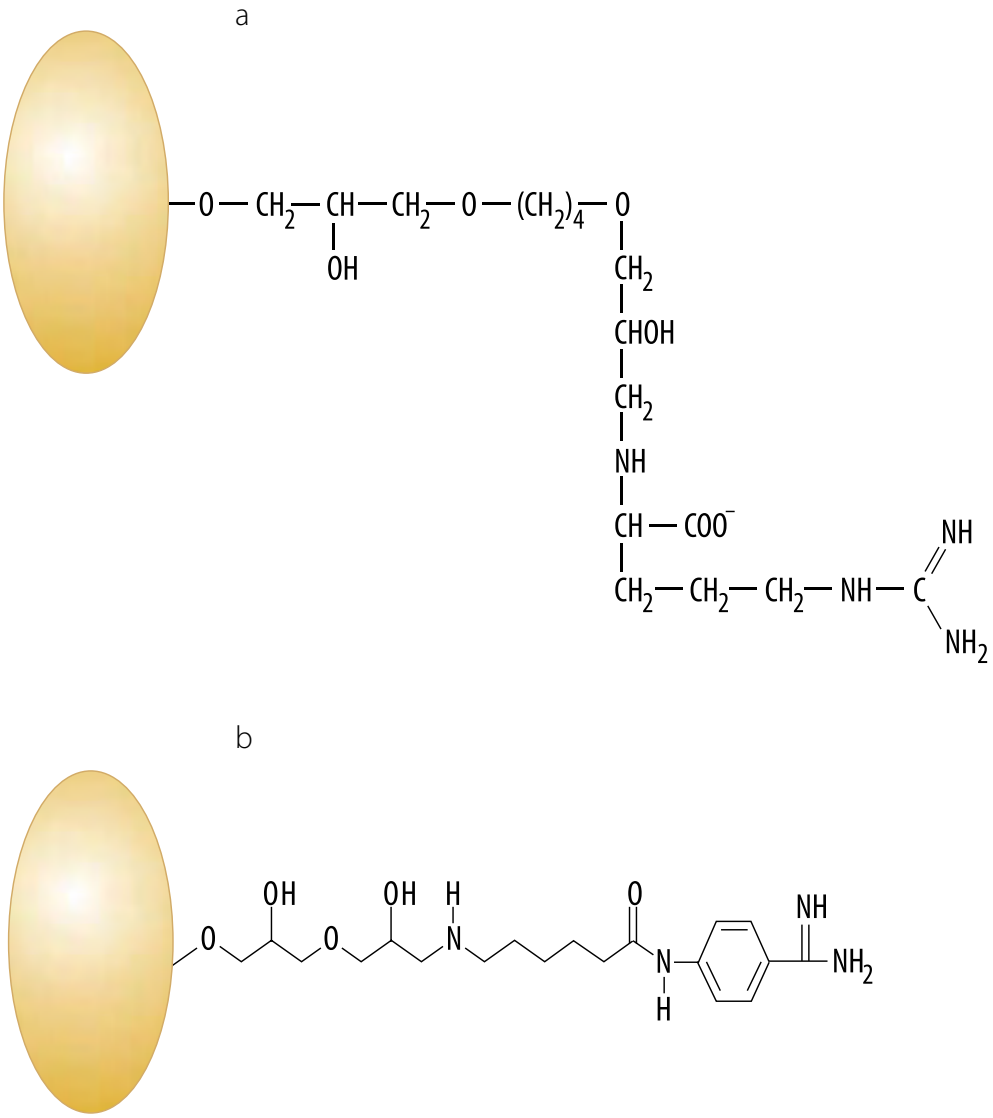

**11 pav.** Principinė baltymų su inkarais kūrimo ir gryninimo schema. I – rekombinantinių hibridinių baltymų kūrimas. Prie tikslinį baltymą koduojančio geno (E), klonuoto plazmidiniame vektoriuje (H), genų inžinerijos metodais geno pradžioje arba gale įterpiama inkarą (F) koduojanti seka. Ląstelės gamina hibridinį baltymą (G). II – baltymų mišinio frakcionavimas: 1 – baltymų mišinys (C ir G) leidžiamas per kolonėlę, užpildytą tam tikru sorbentu (matrica (A), modifikuota ligandu (B), 2 – gryninamas baltymas (G) per inkarą (D) sąveikauja (rišasi) su sorbento paviršiuje esančiomis ligando molekulėmis, 3 – nesurišti baltymai išplaunami buferiniu tirpalu, 4 – gryninamas baltymas (G) atkabinamas nuo sorbento pakeitus sąlygas (buferinio tirpalo pH, joninę jėgą, pridėjus laisvo ligando ir kitaip).

**9 lentelė.** Papildomų aminorūgščių sekų (inkarų) ir baltymų domenų panaudojimas afininėje chromatografijoje

| Papildoma seka (inkaras) | Sorbentas | Desorbcijos būdas | Papildomos sekos dydis, aminorūgštys (ar), masė (kDa) | Inkaro seka | Pastabos |
|---|---|---|---|---|---|
| His | $Ni^{2+}$-NTA, kobaltas | imidazolas ar mažas pH, desorbuojama buferiniu tirpalu su 0,5 M imidazolu | 5–15 ar | HHHHHH | natūraliosios (natyvios) struktūros arba denatūruotas; pigus sorbentas |
| FLAG | anti-FLAG antikūnai | mažas pH ar EDTA/EGTA[1] | 8 ar | DYKDDDDK | didelio specifiškumo; griežtos eliuavimo sąlygos |
| Strep II | modifikuotas streptavidinas | destiobiotinas | 8 ar | WSHPQFEK | brangus sorbentas |
| S-peptidas | S-baltymas | rūgštinis pH, fermentinis pašalinimas | 15 ar | KETAAAKFERHMDS | galima detekcija, brangus sorbentas |
| maltozę rišantis domenas (MBP) | amilozė | maltozė | 40 kDa | | didina gryninamo baltymo tirpumą, lemia jo sekreciją iš ląstelės, pigus sorbentas |
| Glutation-*S*-transferazė (GST) | glutationas | rekombinantinis baltymas, išplaunamas didinant glutationo koncentraciją | 26 kDa | | nebrangus sorbentas |
| celiuliozę rišantys domenai | celiuliozė | Gd·HCl | 4–20 kDa | | gerina gryninamo baltymo sekreciją iš ląstelės |
| kalmoduliną rišantis peptidas | kalmodulinas | EDTA/EGTA | 4 kDa | | galima detekcija, brangus sorbentas |
| His-patch tioredoksinas | $Ni^{2+}$-NTA, Talon | imidazolas | 11,7 kDa | | didina tirpumą |

[1] Etilenglikoltetraacto rūgštis.

Serino proteazes ir zimogenus, specifiškai atpažįstančius argininą, galima surinkti iš tiriamųjų baltymų tirpalų afininiu sorbentu su imobilizuotu argininu. Jie desorbuojami didinant NaCl koncentraciją iki 1 M arba guanidino chlorido ar šlapalo koncentraciją iki 0,7 M arba išplaunant argininu (konkurencinis išplovimas).




**12 pav.** Arginino sorbentas (a), *p*-aminobenzamidino sorbentas (b).

# 3. Vektoriai. Geno klonavimas *E. coli* ląstelėse

Šiuolaikiniai biologijos, medicinos, žemės ūkio ir biotechnologijos tyrimai dažnai susiję su genų inžinerija. Naudojant molekulinės biologijos metodus kuriami reikiamų savybių organizmai. Genų inžinerijos *in vivo* ir *in vitro* metodais sprendžiamos užduotys, kaip į recipiento genomą įterpti svetimus genus arba naujus reguliacinius elementus. Dažniausiai genų klonavimas padeda spręsti fundamentines problemas, susijusias su genų struktūra arba jų ekspresijos (raiškos) reguliavimu. Kitas svarbus uždavinys – naujomis savybėmis pasižyminčius organizmus pritaikyti biotechnologijoje, pvz., svarbių žmogaus baltymų ir hormonų, vaistinių preparatų ar maistui naudojamų priedų gamyboje.

Dažniausiai genų inžinerijoje naudojamas organizmas yra *Escherichia coli* (žarnyno lazdelės) bakterijos. Sukurta nemažai šios bakterijos kamienų ir joms skirtų vektorių, kurie leidžia klonuoti DNR fragmentus ir efektyviai valdyti norimų genų raišką. Vektorius – tai mažos DNR molekulės, kurias galima įterpti į ląstelę, kur jos replikuojasi. Vektorius, naudojamas DNR fragmentams padauginti, vadinamas klonavimo vektoriumi, o tam tikro geno raiškai – ekspresijos vektoriumi. Dažniausiai naudojami vektoriai: plazmidės, fagai, kosmidės, mielių dirbtinės chromosomos.

Dažnai klonuojant negimininingų organizmų genus dėl transkripcijos ir transliacijos sistemų skirtumų svetimų genų raiška būna neefektyvi. Kad taip nenutiktų, tenka keisti aminorūgščių kodonus į įprastesnius *E. coli* ląstelėms, taip pat keičiama svetimos DNR koncentracija, promotoriai ir kt. Tačiau kartais keičiamas ir pats šeimininkas.

Kiti labai dažnai genų inžinerijoje naudojami organizmai yra mielės ir mikromicetai. Dažniausiai – *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus* spp. Šiuose organizmuose, kaip ir visose eukariotuose, vysta diferenciacija, mitozė, mejozė, todėl jie tinka šių biologinių funkcijų tyrimui. Be to, mielės negamina toksinų, auga ant pigių substratų, glikozilina susintetintus baltymus – to negali daryti prokariotai. Yra sukurta mikromicetų, kurie yra fermentų, mažamolekulių medžiagų ir patogenų producentai mikrobiologijos pramonėje, klonavimo sistemų. Mikromicetai sintetina daug įvairių baltymų ir glikozilina juos taip, kaip ir aukštesnieji eukariotai. Klonavimui grybuose naudojamos plazmidės, mielių dirbtinės chromosomos.

Augalai gali regeneruoti iš vienos diferencijuotos ląstelės ar net protoplasto. Be to, augalų ląsteles galima nesunkiai transformuoti Ti plazmide, tam panaudojant šią plazmidę turinčias *Agrobacterium tumefaciens* bakterijas. Ti plazmidės pagrindu sukurtus vektorius galima įterpti į chromosomą, vadinasi, įterpti į augalų ląsteles svetimus genus ir po to iš vienos ląstelės išauginti augalą. Organizmai, kurių visose ląstelėse yra svetimų genų, vadina-

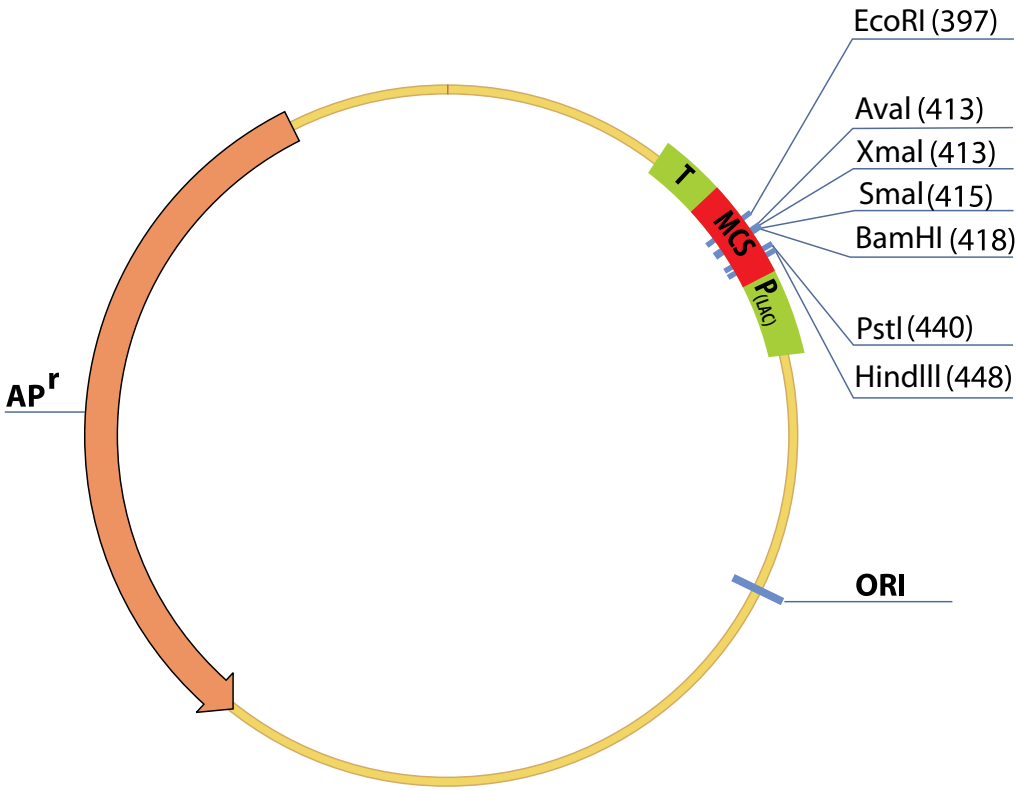
mi transgeniniais. Jie genų inžinerijos metodais jiems suteiktas savybes perduoda savo palikuonims.

Klonuojant gyvūnų genus bakterijose buvo daug sužinota apie jų struktūrą, tačiau jų funkcijas ir reguliaciją galima tirti tik gyvūnų ląstelėse. Todėl buvo sukurti gyvūnų ląstelėms pritaikyti genų ekspresijos vektoriai, transformacijos ir atskirų genų įterpimo į daugialąsčių organizmų chromosomas metodai. Gyvūnų ląstelių genų inžinerijos pagrindinis tikslas yra žmogaus genų tyrimai ir gautos informacijos taikymas medicinoje.

## 3.1. Plazmidės

Tai dažniausiai už chromosomą mažesnės žiedinės, dvigrandės DNR molekulės, esančios bakterijose arba kai kuriose eukariotų ląstelėse, galinčios replikuotis nepriklausomai nuo chromosomų. Plazmidžių dydis įvairus – nuo kelių iki kelių šimtų kilobazių (kb) porų. Plazmidiniai vektoriai gaminami iš natūralių plazmidžių pašalinus nereikalingus ir įterpus reikiamus segmentus. Šiuo metu galima nusipirkti įvairių plazmidinių vektorių, skirtų klonuoti DNR ir baltymų sintezei. DNR fragmentų klonavimui reikalingos tokios pačios restriktazės, kuriomis bus karpomos vektoriaus ir klonuojamo pavyzdžio DNR. Todėl vektoriai paprastai turi seką – polilinkerį, kurią atpažįsta keli restrikcijos fermentai, kad vektorius galėtų būti naudojamas įvairiems DNR pavyzdžiams klonuoti. Paprastai klonavimo srityje yra promotorius ($P_{LAC}$) ir terminacijos signalas (T), kurie įgalina sintetinti įterpto geno produktą. Promotorius plazmidėje turi būti prieš naujų įterptų genų pradžią, nes tik tada bus sintetinami norimi baltymai (13 pav.). Plazmidinis vektorius taip pat turi turėti atsparumo antibiotikams geną, kad būtų galima atrinkti klonuotus organizmus. Į šeimininko ląstelę patekęs vektorius gali joje daugintis. Dažnai ląstelių transformacijos svetima DNR (transformuotomis vadinamos tokios ląstelės, į kurias pateko svetima DNR molekulė) efektyvumas yra labai mažas, todėl reikia padaryti taip, kad išgyventų tik ląstelės su plazmidėmis. Tam plazmidėse yra atrankos genai, pvz., koduojantys atsparumą kuriam nors antibiotikui. Pavyzdžiui, transformuotose *E. coli* ląstelėse gali būti atsparumo ampicilinui genas ($AP^r$), kuris koduoja fermentą *β*-laktamazę, inaktyvinantį ampiciliną. Tada plazmidžių neturinčios ląstelės nužudomos antibiotikais. Replikacijos pradžia (ORI) yra specifinė 50–100 bazių porų (bp) DNR seka, kuri būtina plazmidžių replikacijai (dalijimuisi). Šeimininko fermentai jungiasi prie ORI ir taip sužadinama plazmidžių replikacija, kuri paprastai nepriklauso nuo nukleotidų sekos. Taigi, bet kokia DNR seka, įterpta į tokią plazmidę, replikuojasi kartu su visa plazmidine DNR. Ši savybė yra molekulinio DNR klonavimo pagrindas.

Kai kurie klonavimo vektoriai turi lacZ geno (*β*-galaktozidazės) fragmentą, leidžiantį atrinkti plazmides, į kurias įterptas DNR fragmentas, t. y. į šį geną įterpus papildomą DNR seką, ląstelės nebeskaido į terpę pridėto dirbtinio laktozės analogo X-GAL, kurio produktas yra mėlynas. Kai ląstelės skaido X-GAL, t. y. plazmidės neturi intarpo, ląstelių kolonijos būna mėlynos, o kai šis genas sugadintas, t. y. yra įterptas papildomas DNR fragmentas, kolonijos būna baltos.




**13 pav.** Plazmidinio vektoriaus schema. ORI – seka, reikalinga plazmidžių dalijimuisi. $Ap^r$ – atsparumą antibiotikui lemiantis genas, kuris terpėje su atitinkamais antibiotikais padeda išgyventi tik toms bakterijoms, kurios turi plazmides. MCS – polilinkeris, trumpa seka su keliomis klonavimui patogiomis restriktazių sritimis (EcoRI, HindIII, BamHI ir kt.), į kurią įterpiamas DNR fragmentas.

## 3.2. Bakteriofagų vektoriai

**Lambda bakteriofagas** (λ). Tai virusai, užkrečiantys (infekuojantys) bakterijas. Jų nulemta ląstelių transformacija 1000 kartų efektyvesnė, palyginti su plazmidiniais vektoriais. Pašalinus nereikalingą λ DNR segmentą, įterpiama klonuojama DNR. Tuomet *in vitro* suformuojamas virionas, turintis rekombinantinę DNR. λ genomas yra 49 kb ir jame gali tilpti iki 25 kb svetimos DNR. Bakteriofago galai – tai viengrandė 12 nukleotidų seka, vadinama COS sritimi. Šios sritys yra komplementarios viena kitai, todėl vienas bakteriofago DNR galas gali susijungti su kito bakteriofago DNR galu ir sudaryti dimerus ar multimerus. Galai gali susijungti ir suformuoti žiedinę DNR. Viriono surinkimo metu du baltymai Nu1 ir A atpažįsta COS sritį ir nukreipia tarp jų esančią bakteriofago DNR į tuščią fago galvą. Užpildyta galva pritvirtinama prie uodegos ir suformuojamas virionas. Šis procesas paprastai vyksta šeimininko

ląstelėje, tačiau ruošiant rekombinantinius bakteriofago virionus naudojama *in vitro* surinkimo sistema. Nu1 ir A baltymai koduojami bakteriofago genome, jei šie genai mutuoti, DNR negali būti supakuota į galvas. Uodegos pritvirtinamos tik prie užpildytų galvų, todėl ląstelėse kaupiasi tuščios galvos ir uodegos, kurios vėliau gali būti išskirtos. Kai šie komponentai susimaišys su rekombinantine bakteriofago DNR ir Nu1 ir A baltymais, bus surinktas visas bakteriofago virionas, turintis rekombinantinę DNR.

## 3.3. Hibridiniai vektoriai

**Fagmidės ir kosmidės.** Fagmidės – tai plazmidiniai vektoriai, turintys bakteriofago ORI seką. Tokie vektoriai gali būti naudojami klonavimui kaip ir paprastos plazmidės, arba naudojant bakteriofagus gali būti sintetinama viengrandė DNR, kuri supakuojama į bakteriofago daleles. Kosmidės – tai plazmidiniai vektoriai, turintys bakteriofago COS sritis, kurios leidžia norimą DNR įterpti į bakteriofago galvą. Šių vektorių pranašumas – galimybė įterpti ilgas DNR grandines ir efektyvi ląstelių transformacija.

## 3.4. Dirbtinės bakterijų chromosomos

Šie vektoriai skirti dideliems DNR fragmentams klonuoti. Tokius fragmentus sudėtinga klonuoti, nes chromosominė DNR jautri mechaniniam poveikiui ir skiriama gali sutrūkinėti. Dirbtinės bakterijų chromosomos (BAC) suteikia DNR stabilumo, įmanoma klonuoti 100–1500 kb dydžio fragmentus.

## 3.5. Eukariotų vektoriai

**Dirbtinės mielių chromosomos (YAC).** Tai specialios linijinės dirbtinės chromosomos vektoriai, atitinkantys normalias mielių chromosomas. Galuose turi telomerus, kurie stabilizuoja chromosomų galus, centromerą, kuri užtikrina chromosomos pasiskirstymą dviejose dukterinėse ląstelėse, ir vektorių, turinčių ląstelių atrankai skirtus genus. YAC vektoriai gali pernešti šimtus tūkstančių bazių porų svetimos DNR. Dirbtinės mielių chromosomos skirtos:

- klonuoti genus, kurie dauginasi eukariotų ląstelėse kaip eukariotų chromosomos;
- klonuoti labai didelius fragmentus (100 kb – 10 Mb).

Galutinis klonavimo produktas yra chimerinė linijinė DNR molekulė su telomeromis galuose – dirbtinės chromosomos. YAC dažnai turi bakterinę ORI seką ir selekcinius markerius (vektorius, turinčius ląstelių atrankai skirtus genus), todėl jas galima dauginti ir bakterijose, ir mielėse.

**Retrovirusų vektoriai.** Tai RNR virusai, skirti į žmogaus ir gyvūnų genomą įterpti naujus ar pakeistus genus. Viruso atvirkštinė transkriptazė viruso RNR verčia į DNR ir pastaroji įterpiama į šeimininko genomą. Retrovirusų vektoriai dažnai naudojami onkogenų ir kitų žmogaus genų tyrimams.

Kiti naudojami virusų vektoriai: SV40, *vaccinia* virusas, adenovirusai, bakulovirusai (vabzdžių ląstelėms).

## 3.6. Ekspresijos vektoriai

Ekspresijos (raiškos) vektoriai skirti klonuotam DNR fragmentui įterpti į eukariotų ar bakterijų ląsteles. Vektoriai turi atsparumo antibiotikui geną, sekoskaitos pradmenų jungimosi vietas bei ląstelės šeimininko atpažįstamą promotorių ir kitas reguliacines sekas, kurios lemia efektyvią baltymų sintezę (10 lentelė).

Ekspresijos vektoriai gali turėti papildomas sekas, prie kurių jungiamas klonuojamas genas ir kurios palengvina rekombinantinio baltymo ekspresiją arba gryninimą.

## 3.7. Reporterinių genų vektoriai

Kai reikia tirti geno raišką ląstelėje, naudojami genai, koduojantys reporterinius baltymus, kurių aktyvumas gali būti lengvai išmatuotas ląstelėse (pvz., galaktozidazės, žaliai fluorescuojančio baltymo (GFP). Šie genai sujungiami su tiriamojo geno re-

**10 lentelė.** Ekspresijos sistemų charakteristikos

| Charakteristika | *E. coli* | Mielės | Vabzdžių ląstelės | Žinduolių ląstelės |
|---|---|---|---|---|
| padvigubėjimo dažnis | didelis (30 min.) | didelis (90 min.) | mažas (18–24 val.) | mažas (24 val.) |
| kultivavimo terpės kaina | maža | maža | didelė | didelė |
| raiška | aukšta | žema–aukšta | žema–aukšta | žema–vidutinė |
| baltymo tretinė struktūra | kartais reikalingas „pervyniojimas“ | kartais reikalingas „pervyniojimas“ | teisingas susivyniojimas | teisingas susivyniojimas |
| *N*-glikozilinimas | nėra | daug manozių | paprastas | sudėtingas |
| *O*-glikozilinimas | nėra | yra | yra | yra |
| fosforilinimas | nėra | yra | yra | yra |
| acetilinimas | nėra | yra | yra | yra |
| acilinimas | nėra | yra | yra | yra |
| γ-karboksilinimas | nėra | nėra | nėra | yra |
| bendra kaina | maža | maža | vidutinė | didelė |

guliacinėmis sekomis. Jei tam tikromis sąlygomis pasireiškia tiriamasis genas, tai sintetinamas ir reporterinis baltymas. Keičiant įterptų reguliacinių sekų nukleotidus ar ląstelės genotipą ir stebint reporterinio baltymo sintezės pokyčius, galima tirti tam tikro geno raiškos ypatumus.

## 3.8. Kursuojantys vektoriai

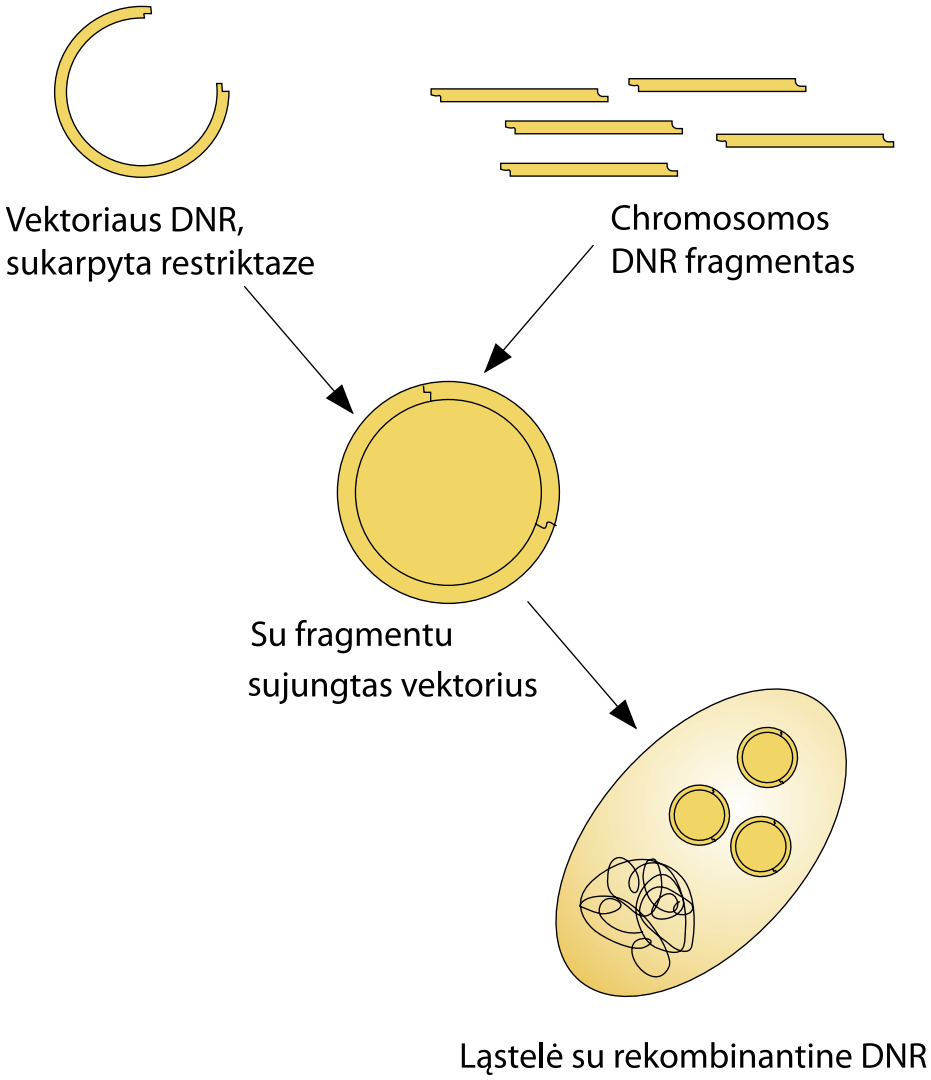
Kursuojantys (angl. *shuttle*) vektoriai gali replikuotis dviejuose skirtinguose organizmuose, pvz., bakterijose ir mielėse arba žinduolių ląstelėse ir bakterijose, nes turi kelias tinkamas replikacijos ORI sritis. Leidžia klonuoti genus bakterijose, juos pakeisti ar mutuoti ir įterpus į mielių ar gyvūnų ląsteles patikrinti jų funkcijas.

## 3.9. *E. coli* transformacija

Transformacija – tai svetimos DNR patekimo ir raiškos sukelti ląstelių genetiniai pokyčiai. Paprastai *E. coli* ląstelės negali pasiimti plazmidžių ar kitos DNR iš terpės. Tam, kad plazmidė patektų į ląstelę, jos sienelę reikia paveikti tam tikromis medžiagomis, pvz., paveikus ląsteles kai kurių dvivalenčių katijonų didele koncentracija, nedidelė dalis ląstelių tampa imliosiomis, t. y. tampa pralaidžios svetimai DNR. Dažniausiai *E. coli* ląstelės veikiamos $CaCl_2$ ir sumaišomos su plazmidiniu vektoriumi. Paprastai tik viena iš dešimties tūkstančių ląstelių tampa imlioji ir į ją patenka svetima DNR. Į kiekvieną tokią ląstelę patenka po vieną plazmidę, kuri turi atsparumo antibiotikams geną. Išgyvena į Petri lėkšteles ant mitybinės terpės su antibiotiku pasėtos tik tos ląstelės, kurios turi plazmidinius vektorius su atsparumo tam antibiotikui genais. Kad į ląstelę patektų plazmidė, dažnai naudojamas ir kitas metodas – elektroporacija. Ląstelės veikiamos trumpu elektros impulsu, dėl kurio ląstelių sienelėse susidaro poros, pro kurias gali patekti svetima DNR. Yra sukurta labai daug įvairių imliųjų ląstelių paruošimo metodų. Šiuo metu galima nusipirkti ir vienu, ir kitu metodu paruoštų *E. coli* ląstelių (pvz., iš *Stratagene*, *Sigma-Aldrich*, *Invitrogen*).

## 3.10. Geno klonavimas *E. coli* ląstelėse

Prieš klonuojant genus visų pirma reikia žinoti, kuriam tikslui tai daroma. Jei darbo tikslas – kokio nors baltymo sintezė, reikia naudoti ekspresijos vektorius. Jei norima analizuoti genus, jų struktūrą ar tarpgenetinę DNR sritį, užtenka paprastų klonavimo vektorių (dažnai jie yra sukurti patogiai atrankai vykdyti). Taigi pirmiausia reikia pasirinkti tinkamą vektorių. Toliau reikia paruošti plazmidinį vektorių ir norimą klonuoti DNR: sukarpyti tinkama restriktaze, jei reikia – defosforilinti ir išgryninti. Taip pat reikia paruošti ir klonuojamą geną: jei reikia, padauginti polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu, sukarpyti ir išgryninti. Į vektorių įterpiamas intarpas, tada vektorius perkeliamas į *E. coli* ląsteles, atrenkami tinkami klonai, jie patikrinami nustačius seką. Jei darbo tikslas – tiesiog genas, kitas žingsnis yra *E. coli* kamienų transformacija, jei baltymas – tinkama geno raiška, jos optimizavimas bei baltymų analizė (14 pav.).




**14 pav.** Klonavimo *E. coli* ląstelėse schema.

**DNR karpymas.** Paprastai DNR karpoma laikantis gamintojo pateiktų rekomendacijų, optimalioje temperatūroje (dažniausiai 37 °C), tam tikrą laiką (10–60 min.). Fermentai inaktyvinami inkubuojant 65–80 °C temperatūroje 10–20 min. arba gryninant DNR. Tokiomis pačiomis restriktazėmis karpomas ir DNR fragmentas, ir plazmidinis vektorius.

Paprastai vektoriuose būna specialios restrikcijos vietos svetimiems genams įterpti, pvz., EcoRI ar BamHI. Tačiau kartais reikia apgalvoti, kad klonuojamo geno atviro skaitymo rėmelis atitiktų vektoriaus koduojamas ekspresijai būtinas sekas (įvairūs inkarai His, Strep, GST).

Restrikcijos fermentai (restrikcijos endonukleazės, restriktazės) atpažįsta ir perkerpa savitas dvigrandės DNR sekas. Fermentai padaro du DNR vijų trūkius, vieną prieš kitą, t. y. nutraukia fosfodiesterinius ryšius, bet nepažeidžia heterociklinių bazių.

Svarbu žinoti, kad fermentų veikimo efektyvumas skiriasi, ypač jei dvi skėlimo vietos yra arti viena kitos. Jei atstumas tarp dviejų restrikcijos sričių ilgesnis nei 10 bp, abiem restriktazėmis gali būti karpoma vienu metu, o jei atstumas trumpesnis ar vieno restrikcijos fermento efektyvumas daug mažesnis negu kito, restrikcija turi būti vykdoma iš pradžių ne tokia efektyvia, vėliau efektyvesne restriktaze. Kai kurios restriktazės pasižymi „žvaigždiniu“ aktyvumu, kai ne tokia aktyvi restriktazė kerpa nespecifiškai, pavyzdžiui, kai yra didelė glicerolio koncentracija, didelis pH ir maža joninė jėga. Jei klonavimui naudojama viena restriktazė, po karpymo defosforilinkite vektorių. Po karpymo rekomenduojama išgryninti vektoriaus DNR.

**Ligavimas.** Sukarpyta DNR liguojama laikantis gamintojo pateiktų rekomendacijų T4 DNR ligaze. DNR karpymo (restrikcijos) ir ligavimo schema pateikta 15 pav.

Ligavimo mišiniais transformuojamos *E. coli* ląstelės, o vėliau atrenkami arba pažymimi reikiami klonai, iš kurių išskiriama plazmidinė DNR analizuojama, jeigu reikia, nustatoma jos seka. Plazmidėms išskirti naudojamas specialus skyrimo rinkinys arba šarminis plazmidžių skyrimo metodas.

EcoRI restriktazė kerpa DNR sudarydama „lipnius“ galus:

TCTCTGATGT**G↓AATTC**TAGCGG  TCTCTGATGT**G**  **AATTC**TAGCGG

→

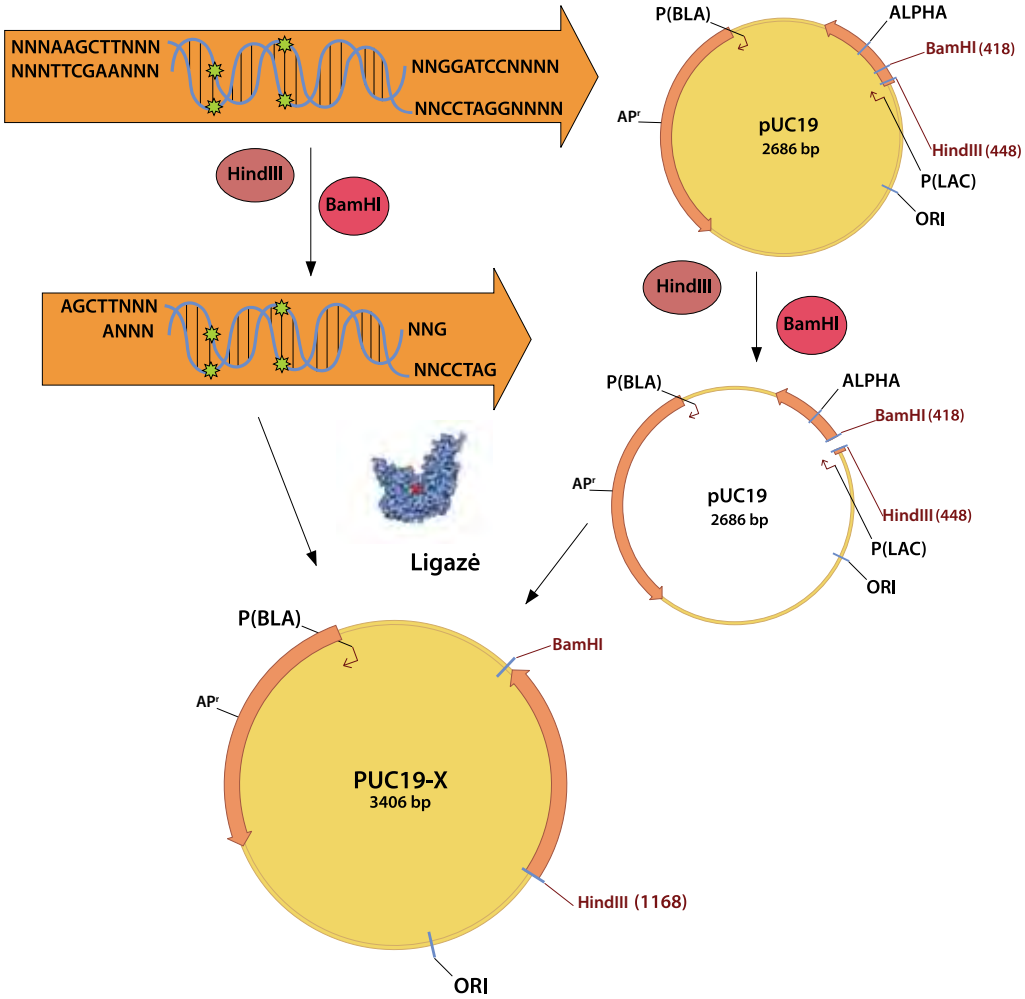
AGAGACTACA**CTTAA↑G**ATCGCC  AGAGACTACA**CTTAA**  **G**ATCGCC

SmaI restriktazė kerpa DNR sudarydama „bukus“ galus:

TCTCTGATGT**CCC↓GGG**TAGCGG  TCTCTGATGT**CCC**  **GGG**TAGCGG

→

AGAGACTACA**GGG↑CCC**ATCGCC  AGAGACTACA**GGG**  **CCC**ATCGCC




**15 pav.** DNR karpymo ir ligavimo schema.

# 4. Metagenominių bibliotekų kūrimas

Gyvybės biocheminiams procesams suprasti dažniausiai lengviau tirti paprastas sistemas (pvz., mikroorganizmus) nei sudėtingas (žmogų), juo labiau kad mikroorganizmų ir sudėtingų organizmų kai kurios savybės nesiskiria, pvz., aminorūgščių sintezė. Be to, mikroorganizmams būdingos unikalios savybės, pvz., jie skaido daugybę substratų. Todėl genetinė ir biologinė mikroorganizmų įvairovė yra svarbi mokslinių tyrimų sritis. Tik 1 % mikroorganizmų galima išauginti laboratorinėmis sąlygomis, taigi aplinkoje lieka netirta 99 % biologinės įvairovės. Metagenomika – tai molekulinės biologijos ir genetikos mokslo sritis, tirianti tiesiai iš aplinkos mėginių išskirtą genetinę medžiagą. Išskyrus DNR klonuojami pilni genai ir įvertinama genetinė įvairovė.

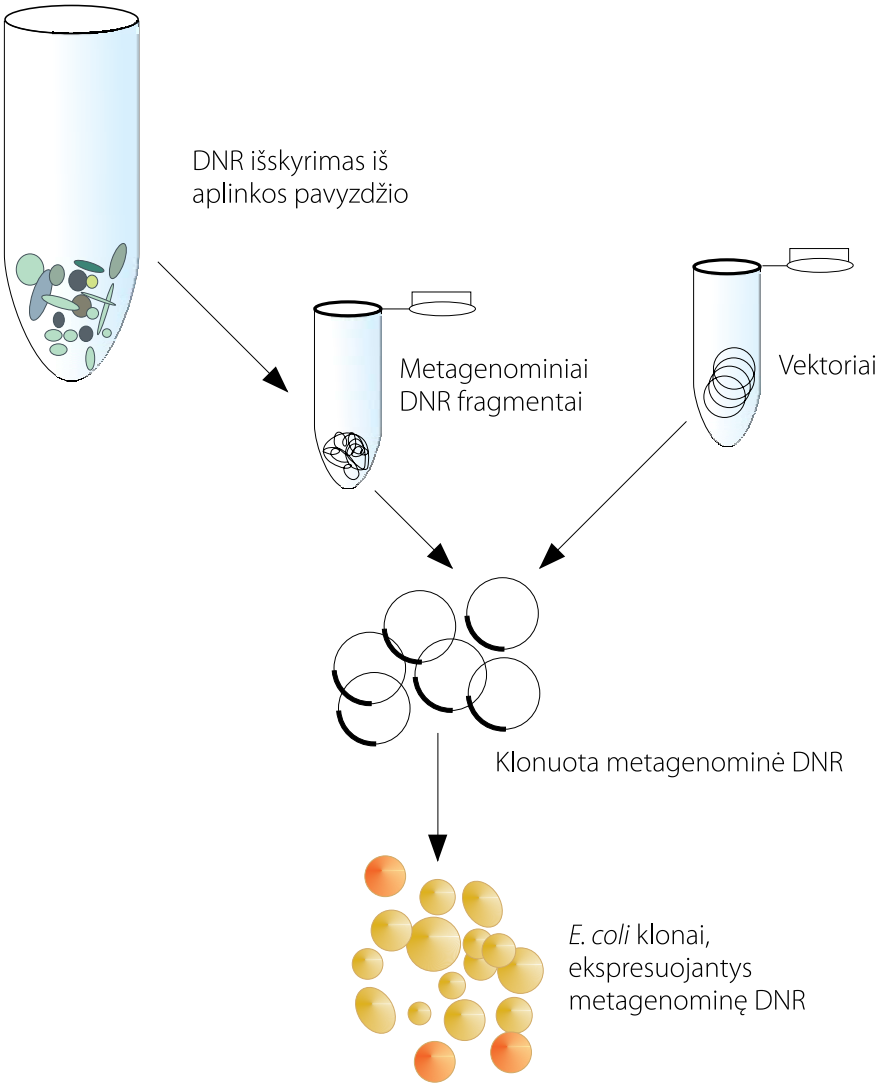
Apskaičiuota, kad viename grame aplinkos mėginio galėtų būti nuo tūkstančio iki dešimties tūkstančių dar nežinomų prokariotų rūšių. Mikroorganizmai pasižymi ypač didele genetine įvairove, todėl nekultivuojamos rūšys greičiausiai yra didžiausias naujų cheminių junginių šaltinis planetoje. Kurti metodus šiems mikroorganizmams kultivuoti būtų lėtas ir sudėtingas procesas, kuriam reikia daugiau žinių apie jų fiziologiją negu turi mokslininkai, – reikia rasti tiesesnį ir greitesnį būdą. Pirmasis klonuoti DNR tiesiogiai iš aplinkos mėginių pasiūlė N. R. Peisas (Pace), o netrukus tai įgyvendino kartu su T. M. Šmitu (Schmidt) ir E. F. DeLongu (DeLong). Jie sukūrė λ fago iš jūros vandens mėginio biblioteką ir tikrino ją ieškodami 16S rRNR genų. Kelią tolesniems tyrimams atvėrė E. F. DeLongo darbo grupės klonavimo tiesiai iš jūros vandens mėginių pasiekimai. Dėl ypač didelės mikroorganizmų įvairovės patraukliausia dirvožemio metagenominė analizė, tačiau ji vystėsi lėčiau, nes dirvožemis yra nevienalytė terpė. Kartu išskirtos dirvožemio sudedamosios dalys gali jungtis prie DNR ir inhibuoti fermentines reakcijas, reikalingas klonavimui. Ilgainiui buvo sukurta įvairių tiesioginių ir netiesioginių DNR išskyrimo iš dirvožemio metodų. Nors šis etapas išliko vienas iš kebliausių ir labiausiai lemiančių metagenominių bibliotekų kokybę, jau daug išsiaiškinta apie dirvožemio mikroorganizmų genus.

Metagenomika tiria nukleotidų sekas, struktūrą, reguliavimą ir funkcijas. Mokslininkai gali tyrinėti mažiausią aplinkos sistemos komponentą išskirdami DNR iš šios sistemos organizmų ir įterpdami ją į modelinius organizmus. Juose ši DNR pasireiškia (ekspresuojasi) ir gali būti tiriama standartiniais laboratoriniais metodais. Paprastai tyrimo procesą sudaro tokie etapai: 1. genetinės medžiagos išskyrimas, 2. genetinės medžiagos paruošimas, 3. bibliotekos kūrimas ir 4. genetinės medžiagos analizė metagenominėje bibliotekoje (16, 17 pav.).

**Pirmasis etapas** yra DNR išskyrimas. Surinktas pavyzdys turi atspindėti tiriamąją aplinką, nes įvairių aplinkų biologinė įvairovė skiriasi. Surinktame pavyzdyje būna daug įvairių mikroorganizmų, jų ląsteles galima ardyti cheminiais (pvz., šarmine de-

natūracija) ar fiziniais (pvz., ultragarsu) metodais. Kai DNR ištrūksta iš ląstelių, ją reikia atskirti nuo likusio pavyzdžio. Tam pasitelkiamos fizinės ir cheminės DNR savybės. DNR iš pavyzdžio galima išskirti keliais metodais: centrifuguojant, nusodinant, naudojant afininius sorbentus.

**Antrasis etapas** – surinkta DNR paruošiama klonavimui modeliniuose organizmuose. Genominė DNR yra santykinai didelė, todėl restrikcijos endonukleazėmis sukarpoma į mažesnius fragmentus. Tokie mažesni DNR fragmentai gali būti sujungiami su vektoriais.

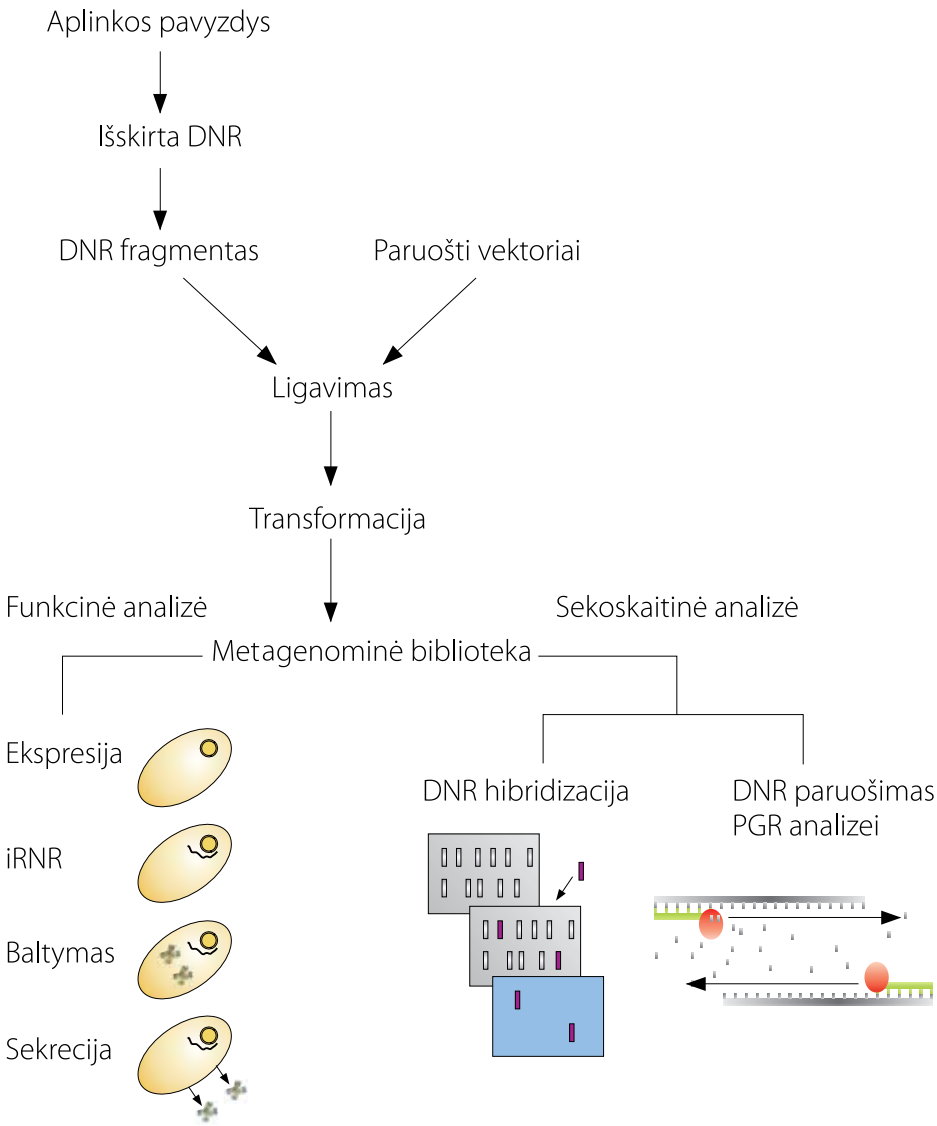



**16 pav.** Metagenominių bibliotekų kūrimas.

**Trečiasis etapas** – vektorius su metagenominiais DNR fragmentais įterpiamas į modelinį organizmą. Tai leidžia padauginti, ekspresuoti ir ištirti organizmų, kurie neauga laboratorinėmis sąlygomis, DNR. Kaip modeliniai organizmai paprastai naudojamos *E. coli* ląstelės. Ląstelių transformacijos metodas pasirenkamas atsižvelgiant į pavyzdžio tipą ir pageidaujamą reakcijos efektyvumą. Metagenominė DNR vektoriuje yra tame pačiame pavyzdyje, tačiau vektoriai yra sukurti taip, kad vienoje ląstelėje gali egzistuoti tik vienos rūšies DNR fragmentas. Dažniausiai kaip vektorius naudojamos plazmidės, kuriose telpa iki 10 kb dydžio DNR fragmentai. Tačiau tokiose bibliotekose didelių operonų ir genų sankaupų aptikti nepavyksta, todėl naudojami ir kiti vektoriai. Bibliotekoms iš didesnių DNR fragmentų kurti naudojamos kosmidės, kuriose telpa 25–35 kb dydžio DNR intarpai, dirbtinės bakterijų chromosomos (BAC), kuriose telpa 200 kb intarpai, ir fosmidės, į kurias galima įterpti maždaug 40 kb dydžio DNR fragmentus. Į vieną BAC telpa didelis DNR fragmentas, todėl įmanoma nustatyti visą ieškomo produkto biosintezės kelią. Transformuotos ląstelės auginamos atrankioje terpėje, kad išgyventų tik vektorių turinčios ląstelės. Kiekviena užaugusi ląstelių grupė vadinama kolonija. Koloniją sudaro daugybė klonuotų ląstelių, išaugusių iš vienos ląstelės. Tokios ląstelės, turinčios visą metagenominę DNR, įterptą į vektorių, vadinamos metagenomine biblioteka. Kiekvieną koloniją galima išsaugoti, o vėliau naudoti tolesniems atskirų fragmentų iš aplinkos pavyzdžio tyrimams. Vienas didžiausių sunkumų – sukurti tokias metagenomines bibliotekas, kurios gerai atspindėtų naudoto aplinkos mėginio rūšinę įvairovę. Viename mililitre jūros vandens yra apie du šimtus rūšių organizmų, tad tokį metagenomą sudaro 1 Gb nesikartojančios DNR. Tam, kad sekos kartotųsi ir persidengtų, biblioteka turėtų būti daugybę kartų didesnė už metagenomą. Kuo ji didesnė, tuo labiau tinka retoms bendrijos rūšims (< 1 %) aptikti. Metagenominėje bibliotekoje, kurios dydis 100–1000 kartų didesnis už metagenomo dydį, visos rūšys gerai pastebimos. Taigi vieno mililitro jūros vandens rūšinei įvairovei atspindėti reikėtų maždaug 500 Gb dydžio bibliotekos. O dirvožemio rūšinė įvairovė yra maždaug 20 kartų didesnė, todėl reikėtų net 10 000 Gb dydžio bibliotekos.

**Ketvirtasis, paskutinis, etapas** – tai metagenominės DNR analizė (17 pav.). DNR ekspresija lemia organizmo fizines ir chemines savybes, todėl yra daug galimų analizės metodų. Fenotipas yra organizmo fizinių savybių visuma, susijusi su geno raiška. Metagenominės analizės pavyzdys – ieškoti neįprastų spalvų ar formų organizmų. Kai kada fenotipo pokyčius sunku pastebėti, pvz., kai kurių fermentų katalizuojamas chemines reakcijas. Metagenominės DNR nulemtas chemines savybes galima nustatyti tiriant produktus, susidariusius modeliniame organizme. Taip galima ištirti, ar modeliniame organizme atliekama fermento funkcija, kurios prieš tai nebuvo, pvz., ar modelinis organizmas, kai nėra įprastų maisto medžiagų, maitinasi neįprastomis maisto medžiagomis. Po fenotipinės analizės paprastai atliekama genotipinė analizė. Palyginus DNR bazių seką su žinomų DNR, sužinoma, kaip veikia genų produktai (baltymai).

Metagenominės bibliotekos paprastai naudojamos žinomų genų naujų formų




**17 pav.** Metagenominių bibliotekų analizės metodai.

paieškai. Iš metagenominės DNR tyrimų sužinoma apie DNR struktūrą, organizaciją, evoliuciją ir kilmę, o visa tai gali būti panaudota moksliniams tikslams visuomenės ir aplinkos labui.

Daugybė mikroorganizmų skaido atliekas, naudojami naujiems vaistams, aplinkos neteršiantiems plastikams ar net kai kurioms maisto sudedamosioms dalims gaminti. Išskirta iš šių organizmų DNR suteikia mums galimybę optimizuoti šias procedūras ir pritaikyti jas praktiškai. Dėl neveiksmingų standartinių kultivavimo laboratorijos sąlygomis būdų galima biologinių išteklių gausybė (pavyzdžiui, mikroorganizmai) yra nepanaudota, nežinoma ir neapibūdinta, o metagenomika suteikia galimybę apibūdinti genetinę įvairovę nepaisant laboratorinių kultivavimo sąlygų prieinamumo. Metagenominių bibliotekų informacija – tai ne tik žinios, šią informaciją galima taikyti pramonėje, terapijoje ir saugant aplinką nuo taršos. Beveik 70 % antibiotikų, 74 % priešvėžinių preparatų, 70 % antimigreninių priemonių, 66 % nuo hipertenzijos vartojamų preparatų gauti iš natūralių produktų. Taigi iš aplinkos išskirti mikroorganizmai yra įvairių vaistų šaltinis.

Dėl stulbinančios nekultivuojamų mikroorganizmų įvairovės visose jų gyvenamose nišose metagenominiai tyrimai visada baigsis dar nežinomų genų ir baltymų atradimu. Taigi didelė tikimybė atrasti naujų nukleotidų sekų suteikia metagenominei analizei patrauklumo. Nuo pat šio metodo atsiradimo rasta daug naujų genų, kurių koduojami produktai reikalingi farmacijos pramonei arba kituose gamybos procesuose. Įdomu tai, kad iki šiol buvo ieškoma tik tam tikrus fermentus koduojančių sekų, pvz., lipazes ir esterazes. Jos svarbios, nes dauguma šių klasių fermentų išlieka aktyvūs organiniuose tirpikliuose, o jų veikimui nereikalingi kofaktoriai. Kita svarbi ieškoma fermentų klasė – oksidoreduktazės. Jos dažniausiai naudojamos karboniliniams junginiams, hidroksirūgštims, aminorūgštims ir chiraliniams alkoholiams sintetinti. Kitais būdais šiuos junginius susintetinti sudėtinga. Ypač domimasi nuo NAD priklausomomis alkoholio reduktazėmis, kurios naudojamos serumo lipidų analizei reikalingoms medžiagoms – deuteriu ir tričiu žymėtiems junginiams ir dihidroksiacetonui – pagaminti. Pramonei reikalingi polisacharidus, pavyzdžiui, krakmolą, modifikuojantys fermentai. Tokius fermentus koduojantys genai sudaro didelę metagenominiais tyrimais atrastų genų dalį. Rasta proteazių ir nitrilazių. Svarbūs ir genų, reikalingų vitaminų biosintezei, tyrimai. Greita ir efektyvi naujų fermentų paieška metagenominėse bibliotekose, jų modifikavimas, metabolinių kelių kūrimas ir tobulinimas leidžia kurti naujomis savybėmis pasižyminčius organizmus.

## 4.1. DNR išskyrimas iš aplinkos pavyzdžių

Yra aprašyta daug įvairių DNR išskyrimo iš dirvos, dumblo, žarnyno ir kitų šaltinių metodų. Jie gali būti skirstomi į tiesioginius ir netiesioginius DNR išskyrimo metodus. Išskiriant DNR tiesioginiu metodu, tiriamojo pavyzdžio matricoje esančios ląstelės suardomos (tai vadinama lize), vėliau DNR atskiriama nuo matricos ir ląstelių nuolaužų. O išskiriant DNR netiesioginiu metodu,

prieš suardant ląsteles jos atskiriamos nuo kitų pavyzdžio komponentų, surenkamos ir išskiriama jų DNR. Netiesioginiu išskyrimo metodu galima išskirti didesnės molekulinės masės ir grynesnę DNR nei tiesioginiu, tačiau išskirtos DNR kiekis dažnai yra daug mažesnis. Taigi DNR bibliotekų kūrimui paprastai naudojamas tiesioginis DNR išskyrimo metodas, kuriuo gaunamas reikiamas DNR kiekis (µg). Kadangi šiuo metodu gaunamas didesnis DNR kiekis, išskiriama ir didesnė mikroorganizmų populiacija, o kartu ir didesnė jų įvairovė. Tačiau kartais didesnis DNR kiekis neatspindi bakterijų įvairovės, todėl ne visada netiesioginiais metodais išskirta DNR blogiau atspindi mikroorganizmų populiaciją.

Kita problema, su kuria susiduriama kuriant kokybiškas DNR bibliotekas, – eukariotų DNR pavyzdyje. Jei kuriama genų biblioteka *E. coli* ar kitose prokariotų ląstelėse, dažniausiai vyksta tik prokariotų genų ekspresija. Eukariotų genomas (3–140 000 Mb) daug didesnis už prokariotų (0,6–9,5 Mb), todėl iš pavyzdžio, kuriame yra 0,1 % eukariotų ląstelių, gautame DNR ekstrakte bus 91 % eukariotų nukleorūgšties. Taigi tokia DNR biblioteka turi būti 10 kartų didesnė, kad atitiktų tokį patį kiekį prokariotų genomų, gautų iš eukariotų DNR neturinčių pavyzdžių.

Išskirta DNR turi būti gryna. Prie dirvožemio DNR būna prisijungę įvairūs polifenoliniai junginiai. Kuo labiau organinėmis medžiagomis užterštas dirvožemis, tuo labiau užteršta ir iš jo išskirta DNR. O teršalai slopina fermentines reakcijas. Jei nepavyksta išskirti švarios DNR, reikia papildomai ją gryninti – ji, pvz., dializuojama, centrifuguojama.

## 4.2. Bibliotekos kūrimas

Kuriant genų biblioteką DNR sukarpoma, pvz., restriktazėmis, iki reikiamo dydžio fragmentų, kurie sujungiami (liguojami) su tomis pačiomis restriktazėmis perkirptu vektoriumi. Ligavimui vektoriaus ir intarpo santykis turėtų būti 1:10. DNR fragmentų dydis priklauso nuo metagenominės bibliotekos kūrimo tikslo: jei ieškomas konkretus genas, sukarpyti DNR galima į 1–3 kb dydžio fragmentus. Jei tikslas – metabolinių kelių ar operonų tyrimai, DNR dydis turėtų būti didesnis (3–20 kb), atitinkamai parenkamas ir klonavimo/ekspresijos vektorius. Po ligavimo vektorius įterpiamas į ląstelę ir pasėjama Petri lėkštelėje su atitinkamu antibiotiku. Iš užaugusių kolonijų atrenkamos kelios, įvertinamas tuščių plazmidžių ir turinčių metagenominių intarpų santykis, įterptų fragmentų dydis, jų sekos.

## 4.3. Genetinės medžiagos analizė metagenominėje bibliotekoje

Jei bibliotekos atitinka keliamus reikalavimus, jas galima saugoti, atrinkti pagal norimą požymį arba nustatyti atskirų klonų sekas.

Metagenominėje bibliotekoje esančią informaciją galima pasiekti funkcija ir sekoskaita pagrįsta analize. Funkcinė analizė pradedama nuo ieškomą požymį išreiškiančių genų klonų identifikavimo. Tada tiramos jų biocheminės savybės ir nustatoma nukleotidų seka. Šia analize greitai nustatomi genai, kurie gali būti panaudoti pramonėje, medicinoje ar žemės ūkyje, nes koduoja naudingus baltymus ar kitus

produktus. Funkcinės analizės metodų trūkumai – sudėtinga sėkmingai klonuoti visą genų grupę, lemiančią požymį, dažnai ląstelė šeimininkė neišreiškia ieškomos funkcijos ir klonų aktyvumas gali būti per mažas funkcijai aptikti. Funkcinės analizės metodais aptikti nauji ir seniau aprašyti antibiotikai, atsparumo antibiotikams genai, lipazės, chitinazės, membranos baltymai, genai, koduojantys 4-hidroksibutirato metabolizmo fermentus, ir genai, lemiantys biotino sintezę.

Sekoskaita pagrįstos analizės pagrindinis principas – konservatyvių (mažai kintančių ar mažai pakitusių) DNR sekų panaudojimas kuriant zondus hibridizacijai arba PGR pradmenis, kurie pasitelkiami dominančioms sekoms metagenominėse bibliotekose rasti. Deja, šiuo analizės būdu negalima atrasti visiškai naujų genų šeimų, nes būtina naudotis jau žinomomis genų sekomis. Bet molekulinė įvairovė tokia didelė, kad dažnai pakanka ir dar nežinomų panašių genų. Svarbūs atradimai buvo padaryti ir atsitiktinai nustatant metagenominių genų klonų nukleotidų sekas. Didžiausias sekoskaitinės analizės pranašumas – nereikia genų ekspresijos ląstelėje šeimininkėje, kas labiausiai apsunkina funkcinę analizę.

# 5. Baltymų savybių keitimas tikslinės mutagenezės būdais

Biotechnologijoje vis dažniau naudojami žmogaus pakeisti, pagerinti baltymai, fermentai, biologiškai aktyvios medžiagos ar jų producentai. Keičiant fermentų savybes sukuriami tam tikroms sąlygoms pritaikyti arba naujomis savybėmis pasižymintys fermentai. Kai kurie iš jų kaip substratus gali naudoti neįprastus junginius, katalizuoti neįprastas reakcijas ar dalyvauti visai naujų cheminių junginių sintezėje. Vienas veiksmingiausių būdų gauti tokius fermentus yra baltymų inžinerija.

Baltymų inžinerija modifikuojamas pramoninių fermentų, pvz., lipazių, proteazių, karboksipeptidazių, gliukanazių, gliukozidazių, pektiną modifikuojančių fermentų arba fermentų, skaidančių patvarius junginius, aktyvumas ir stabilumas. „Patobulinti“ fermentai naudojami žemės ūkio technologijose, detergentams, biojutikliams gaminti. Be to, baltymų inžinerija pritaikoma ir sveikatos apsaugoje – kuriamos vakcinos, vaistai, ieškoma molekulių taikinių, reikalingų vaistų gamyboje.

Baltymų inžinerijos technologijos pradėjo sparčiai vystytis prieš kelis dešimtmečius kartu su genų inžinerija, nes atsirado galimybių kurti ir vystyti baltymus laboratorijoje. Taigi baltymai keičiami keičiant juos koduojančius genus. Naujausi atrankos metodai leidžia greičiau patikrinti dideles fermentų bibliotekas, o derinant naujus genetikos įrankius su skaičiavimo metodais galima sukurti norimų savybių fermentus.

Jau milijonus metų norimų savybių augalų ir gyvūnų veislės kuriamos pagal evoliucijos principus. Biologai ir chemikai panaudojo evoliuciją įvairių molekulių savybėms keisti. Atrankos metodai naudojami tam tikrų savybių mutantų bibliotekos nariams identifikuoti, pvz., katalizuojantiems cheminius virsmus.

Natūraliai fermentai išsivystė per milijonus metų, o laboratorijoje kuriami fermentai „evoliucionuoja“ daug greičiau. Laboratorijoje „evoliuciją“ galima atlikti naudojant esamus fermentus arba molekulės gali būti kuriamos *de novo* iš atsitiktinių sekų, kaip pradinio šablono. Tačiau dėl labai didelės galimos molekulių įvairovės sunku identifikuoti ir išskirti baltymus, kurių funkcijos domina mokslininkus. Derinant eksperimentinius ir skaičiavimo metodus įmanoma sukurti specialius baltymus – receptorius ir katalizatorius, kurių nėra gamtoje.

## 5.1. Mutantų bibliotekos kūrimas

Naujų molekulių rinkinio kūrimo pirmasis žingsnis yra bibliotekos sukūrimas (18 pav.). Iki suklestint genų inžinerijai, teko tenkintis tais baltymais, kurie buvo randami gamtoje. Vystantis molekulinei biologijai ir cheminei sintezei išmokta kurti ir modifikuoti genus. Dabar taikant kryptingą arba atsitiktinę mutagenezę geno, koduojančio esamą baltymą, įmanoma sukurti mutantinius

baltymus. Į plazmidę įterpiamas pakeistas genas ir visa tai įterpiama į bakterijos ar eukarioto ląstelę. Tokios ląstelės palikuonys – klonai – gamina tokį mutantinį baltymą, kokį koduoja modifikuotas genas. Daugelio baltymų tam tikrų aminorūgščių lemiamas struktūros ir funkcijos sąryšis buvo nustatytas vieną kodoną keičiant kitu. Taip baltymams suteikiamos naujos savybės. Daugybę įvairiausių baltymų galima sukurti vieną ar kelias aminorūgštis pakeitus bet kuria kita. Iš esmės vienu metu galima keisti kodonų kiek tik norima. Naujai funkcijai sukurti galima pakeisti netgi visą geną. Tokie pakeitimai leidžia turėti labai daug derinių, kurie viršija realiai sukuriamų bibliotekų dydį. Pavyzdžiui, jei polipeptido ilgis yra šimtas aminorūgščių, įmanomi $10^{154}$ deriniai, o sukurti galima biblioteką, turinčią tik $10^{12}$ skirtingų narių.

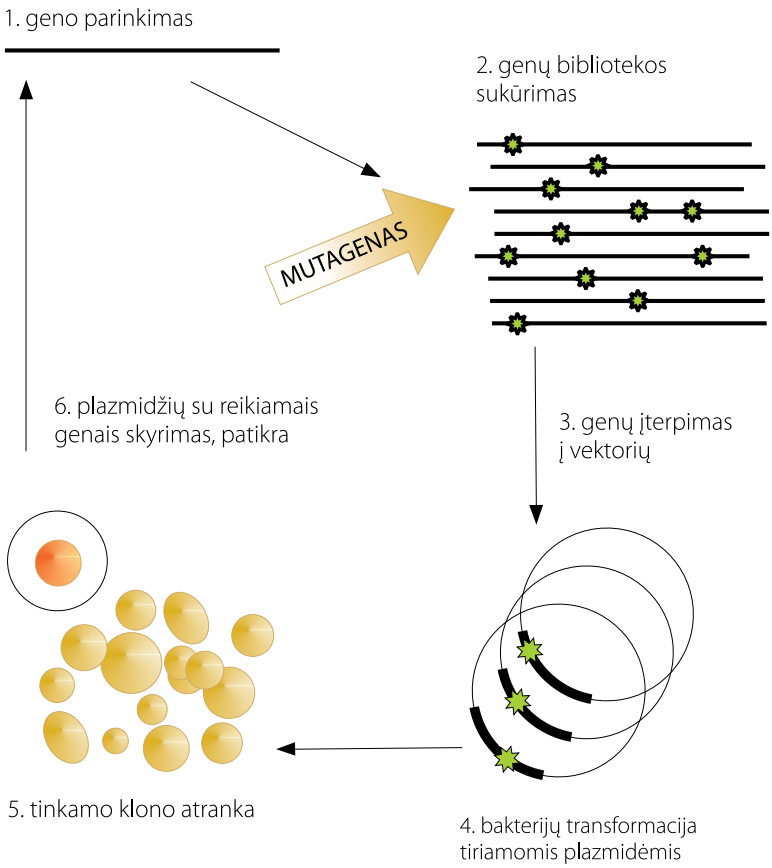
Taškinėms mutacijoms sukelti atsitiktinėje geno vietoje naudojami keli metodai. Yra sukurti specialūs bakterijų kamienai, kuriuose yra mutuojama plazmidinė, bet ne chromosominė DNR. Plazmidinė DNR mutuojama paveikus ją ultravioletine spinduliuote arba cheminiais mutagenais. Yra ir kitas būdas – klaidingos PGR metodas, kai sumažinamas polimerazės tikslumas ir taip gaunamos atsitiktinės mutacijos. Šie metodai tinka, jei nėra informacijos apie tiriamų baltymų struktūrą ar jų veikimo mechanizmus. Dar vienas metodas atsitiktiniams mutantams gauti yra genetinė rekombinacija. Tokios mutagenezės pavyzdys yra genų maišymas (*gene shuffling*) – vieno arba kelių genų DNR atsitiktinai sukarpoma ir panaudojama PGR reakcijoje be pradmenų. Šios reakcijos metu DNR fragmentai jungiasi atsitiktinai ir sudaro naujų hibridinių genų bibliotekas.

## 5.2. Atranka

Kitas žingsnis baltymų inžinerijoje yra reikiamo varianto atranka. Didžiausias iššūkis – nustatyti tas kelias populiacijos molekules, kurios koduoja ką nors įdomaus, ir atskirti jas nuo daugybės kitų, kurios to nedaro. Šią problemą galima išspręsti dviem būdais. Bibliotekos analizuojamos tikrinant kiekvieną individą atskirai (atranka) arba sudaromos sąlygos, kuriomis išlieka tik reikiami klonai (selekcija). Metodo pasirinkimas priklauso nuo to, kaip dažnai ką nors įdomaus koduojančios DNR molekulės atsiranda tiriamajame mišinyje. Yra sukurta daug jautrių cheminių, biologinių ir imunologinių tyrimo metodų daugybės klonų kataliziniam ar jungimosi aktyvumui įvertinti. Šie metodai dažniausiai pagrįsti spalvotų ar fluorescuojančių produktų susidarymu veikiant tam tikram mutantiniam baltymui, tačiau gali būti naudojami ir efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), masių spektroskopijos ar magnetinio branduolių rezonanso spektroskopijos metodai. Šiais metodais įmanoma patikrinti bibliotekas, kurių dydis yra $10^2$–$10^4$ klonų, bet daug našesnis yra fluorescencija aktyvintas ląstelių rūšiavimo (FACS) metodas, kuris per sekundę patikrina apie $10^5$ klonų. Klasikinis atrankos eksperimentas *in vivo* pagrįstas koduojamo baltymo gebėjimu ištaisyti kokį nors metabolinį defektą arba suteikti atsparumą kokiam nors toksinui parenkant tokias atrankos sąlygas, kuriomis išgyventų tik ląstelės su pageidaujama funkcija. Šiuo metodu galima išanalizuoti daug didesnes bibliotekas, nei įprastai atrenkant klonus. Be to, parenkant substratus arba reakcijos sąlygas galima praplėsti atrenkamų fermentų specifiškumą ar atrinkti kitomis savybėmis pasižyminčius baltymus. Baltymų ekspozicija

bakteriofagų, ląstelių ar ribosomų paviršiuje *in vitro* sąlygomis bei iRNR ir jų koduojamų baltymų sujungimas *in vitro* – tai kelios galingos technologijos, kurios buvo sukurtos siekiant susieti genotipą su fenotipu už ląstelės ribų. *In vitro* kompartmentalizacija (visumos dalies atskyrimas, izoliavimas nuo kitų dalių) yra dar vienas naudingas metodas. Genai įterpiami kartu su baltymų biosintezei reikalingais komponentais į vandens-aliejaus ir vandens-aliejaus-vandens emulsijas, kuriose jie gali būti atrenkami panašiai kaip ir ląstelės aplinkoje. Nors tam tikro tikslinio baltymo ar fermento sukūrimas gali atimti daug laiko ir pastangų, jis gali atsipirkti, jei reikiama funkcija po mutagenezės atsiranda gana retai.

Naujomis funkcijomis pasižyminčius baltymus galima sukurti dviem būdais. Pirmasis būdas – baltymas gaunamas mutuojant (keičiant) visiškai atsitiktinę nukleotidų seką. Antrasis būdas – perdaroma egzistuojantį baltymą koduojanti seka. Labai daug baltymų šiuo būdu jau buvo pagerinti: pagerintas baltymų stabilumas, atsparumas nenatūraliomis sąlygomis, specifiškumas

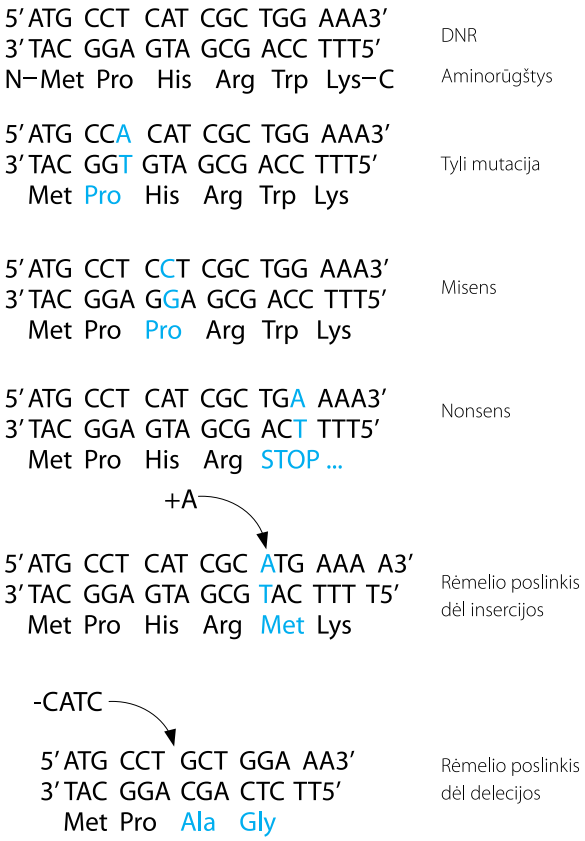



**18 pav.** Baltymų inžinerijos schema.

substratui, selektyvumas, enantioselektyvumas. Kai kuriais atvejais vos kelios mutacijos drastiškai pakeičia baltymo funkciją, o kartais reikia ne vieno mutagenezės ciklo baltymo aktyvumui pakeisti.

Pradėjus naudoti baltymų inžineriją paaiškėjo, kad baltymus galima labai keisti. Pavyzdžiui, buvo sukurti baltymai ne iš 20 įprastų aminorūgščių, bet tik iš 14, ir tokie baltymai įgaudavo reikiamą erdvinę struktūrą bei atlikdavo savo funkciją. Kitas mutagenezės būdas – baltymų ketvirtinės struktūros keitimas. Pavyzdžiui, iš dimerų gaunami monomerai – arba atvirkščiai. Taip pat galima keisti baltymų struktūros elementus, pavyzdžiui, baltymo C-galo domeną perkelti į N-galą. Antrinės struktūros elementai gali būti perdėliojami panašiai kaip lego kaladėlės ir taip gaunama vis kitokia tretinė struktūra. Žinant baltymų struktūrą ir kiek įmanoma ją keisti, galima sukurti norimų funkcijų baltymą, – pavyzdžiui, pakeitus aminorūgščių seką aktyviajame centre ar prie jo.

DNR mutacijos gali būti taškinės (tikslinės) ir atsitiktinės. Ne visos mutacijos yra naudingos, kartais į genų vidų gali įsiterpti STOP kodonas arba pasislinkti atviro skaitymo rėmelis, o tai sugadina baltymą (19 pav.).



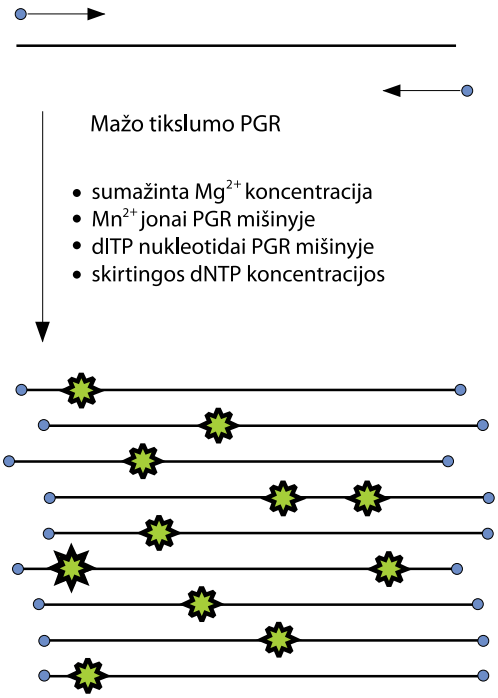

**19 pav**. Taškinės mutacijos pavyzdžiai.

Apibendrinant galima pasakyti, kad svarbiausia baltymų inžinerijoje – pasirinkti tikslą (kokį naudingą arba kokiomis savybėmis pasižymintį baltymą norima sukurti), turėti gerą atrankos sistemą ir daug kantrybės, jei atlikus pirmą mutagenezės reakciją negaunamas trokštamas rezultatas.

## 5.3. Atsitiktinė mutagenezė klaidinančios PGR metodu

Šis metodas tinka, kai norima tirti daug įvairių mutacijų, vykstančių visame gene. Jei nėra žinoma fermento erdvinė struktūra, jo aktyviojo centro padėtis, šis metodas tinka aktyviems, stabiliems mutantams kurti. Šiuo metodu gaunama daug įvairių mutantų, todėl reikalinga gera jų atrankos sistema. Mutagenezė vykdoma į reakcijos mišinį pridėjus mangano jonų ir sumažinus magnio jonų koncentraciją. Žinoma, kad tokiomis sąlygomis polimerazės tikslumas labai sumažėja ir ji pradeda klysti. Didėjant mangano koncentracijai reakcijos mišinyje, didėja klaidų tikimybė ir mažėja fragmentų dauginimo efektyvumas, todėl svarbu parinkti PGR sąlygas, kad susidarytų produktas su tam tikru skaičiumi (1–5) mutacijų vienoje DNR molekulėje. Mutacijų skaičių galima sužinoti nustačius atrinktų mutantų sekas. PGR mutagenezę galima vykdyti ir pridėjus dITP vietoj vieno iš keturių nukleotidų (dATP, dGTP, dCTP, dTTP): tuomet į keturis mėgintuvėlius dedama po tris skirtingus nukleotidus ir 10–20 μM dITP vietoj ketvirto nukleotido (20 pav.).

**PGR** – polimerazės grandininė reakcija (angl. *Polymerase chain reaction*; PCR) – tai molekulinės biologijos metodas, leidžiantis padauginti (amplifikuoti) DNR *in vitro*.




**20 pav.** Klaidinančios PGR metodas.

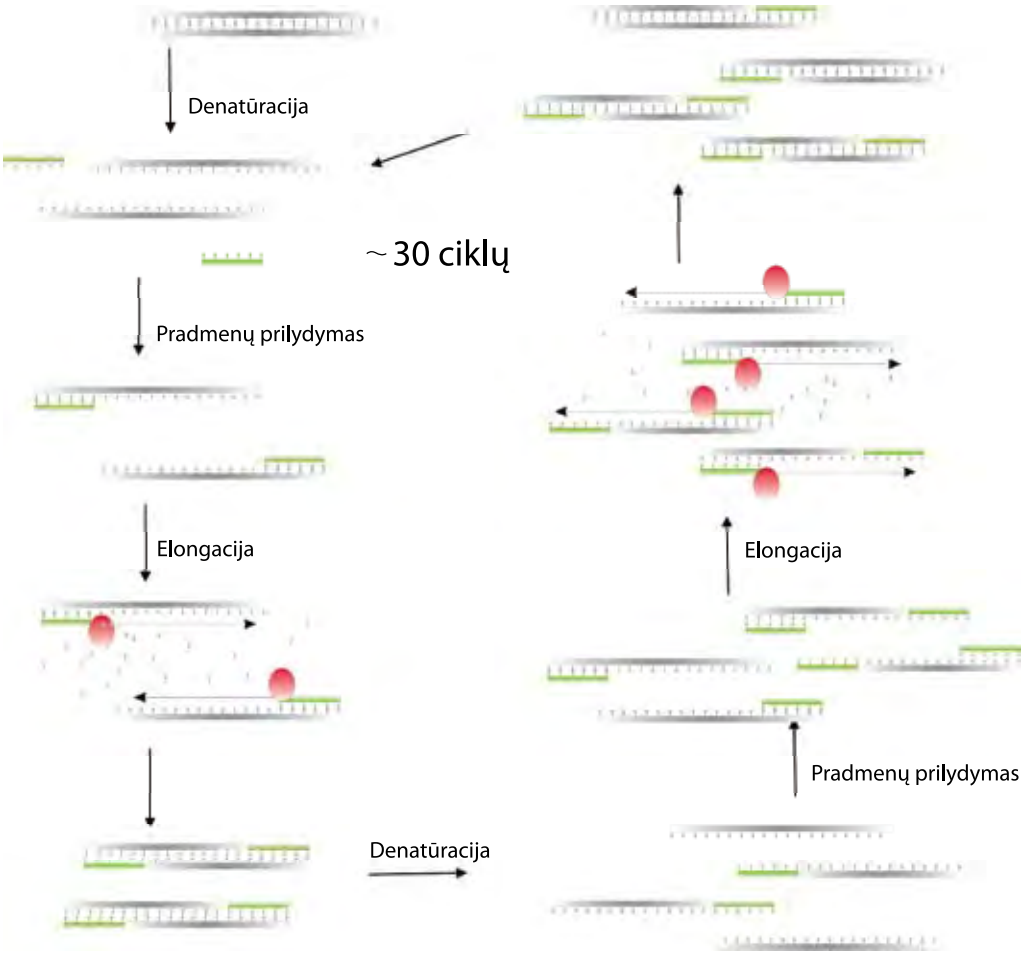
Pagrindiniai PGR komponentai:

- termostabili DNR polimerazė (*Taq*, *Pfu*, *Pfx*) ir jai tinkama aplinka (buferinis tirpalas, magnio jonai);
- viengrandžiai pradmenys, tapatūs norimo padauginti fragmento galams;
- deoksinukleozidų trifosfatai (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- DNR matrica.

Paprastai PGR atliekama mikromėgintuvėliuose (bendras tūris 10–100 μl), kurie dedami į termociklerį. PGR sudaro trys pagrindiniai žingsniai, kuriuos kartojant 20–40 kartų (ciklų) gaunamas reikiamas kiekis DNR:

1. denatūracija – pakeliama temperatūra, kad atsiskirtų dvigrandės DNR grandinės;
2. pradmenų prilydymas – temperatūra sumažinama, kad prie viengrandės DNR matricos prisijungtų pradmenys;
3. elongacija – temperatūra optimali DNR polimerazei, kuri sintetina naują DNR grandinę, komplementarią DNR matricai.

Sintezė vyksta 5´–3´ kryptimi (21 pav.).




**21 pav.** Polimerazės grandininės reakcijos schema.

## 5.4. Cheminė mutagenezė *in vitro*

Yra žinoma, kad kai kurie cheminiai junginiai specifiškai veikia DNR, pvz., skruzdžių rūgštis, azoto rūgštis, nitrozoguanidinas, natrio disulfitas ($Na_2S_2O_5$), hidrazinas, dimetilsulfatas keičia DNR struktūrą. Bazių analogai, kurių struktūra panaši į purinus ir pirimidinus, gali būti įterpti į DNR struktūrą vietoj įprastų nukleotidų, pvz., bromuracilas, aminopurinas. Intarpiniai agentai, pvz., akridino oranžas, proflavinas, etidžio bromidas, įsiterpia į DNR grandinę ir taip ją „išplečia“, todėl polimerazė įterpia papildomą nukleotidą ir sukelia atviro skaitymo rėmelio poslinkį. Cheminės mutagenezės reakcija skirta bent vienam nukleotidui kiekvienoje DNR molekulėje pakeisti, todėl labai svarbu parinkti tinkamą DNR ir mutageno koncentracijos santykį, veikimo laiką ir temperatūrą.

## 5.5. Mutagenezė ir rekombinacija PGR metodu

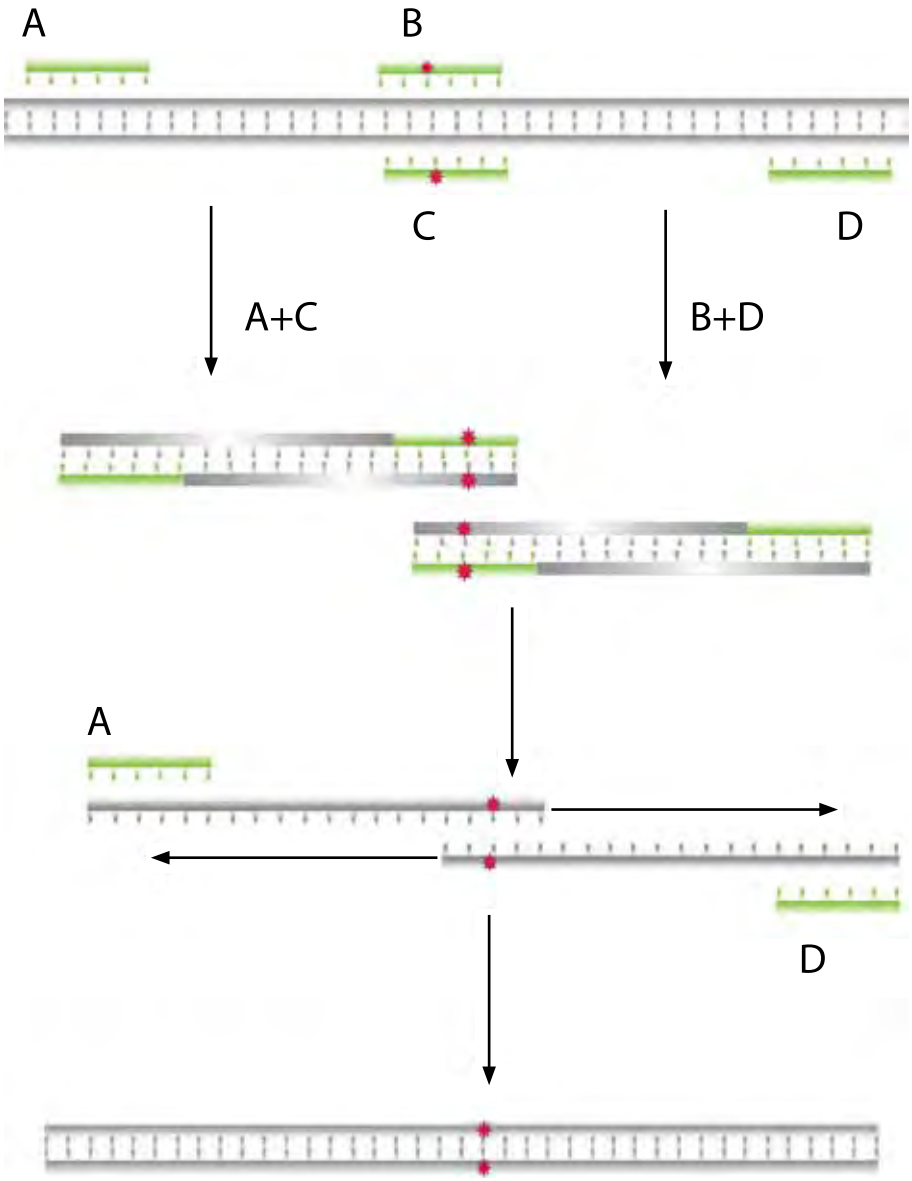
Mutagenezės ir rekombinacijos PGR metodas (persidengiantis prailginimas) yra skirtas specifinėms mutacijoms sukelti. Jei žinoma baltymo erdvinė struktūra, galima parinkti konkrečias mutagenezės vietas, esančias baltymo aktyviajame centre arba netoli jo. Mutacijos susidaro PGR metodu vykstant vienai po kitos dviem reakcijoms ir naudojant dvi pradmenų poras. Reikalingi šoniniai – nemutuoti pradmenys, komplementarūs norimo padauginti fragmento galams, ir specifiniai pradmenys, kuriuose yra užkoduoti pageidaujami pakeitimai (pvz., bazių pakeitimai, insercijos ar delecijos). Pastarieji mutageneziniai pradmenys yra komplementarūs vienas kitam. Iš pradžių atliekama PGR dviejuose mėgintuvėliuose, kiekviename iš jų yra po mutuotą ir šoninį pradmenį (tiesioginis ir atvirkštinis). Vėliau atliekama antroji PGR reakcija – į mėgintuvėlį dedami tik šoniniai pradmenys ir abu pirmosios PGR metu susidarę fragmentai, kurie turi persidengiančias sritis ir yra vienas kito pradmenys (22 pav.).

## 5.6. Genų maišymas

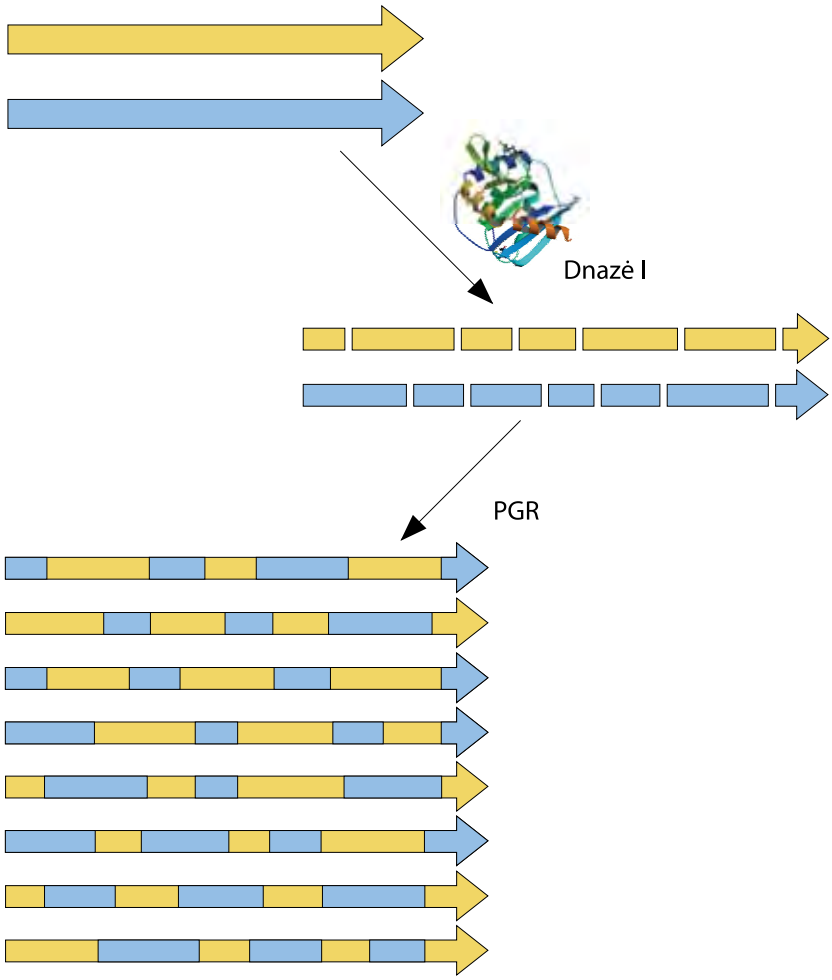
Genų maišymas naudojamas homologinių DNR sekų rekombinacijai (23 pav.). Vykstant rekombinacijai atsiranda ir taškinės mutacijos, kurios kartais gali būti naudingos. Genai maišomi paprastai keturiais žingsniais: 1. paruošiami genai, 2. jie fermentu DNaze sukarpomi į fragmentus, 3. veikiant polimeraze surenkama DNR, 4. surinkta DNR padauginima PGR metodu.

## 5.7. DNR elektroforezė, gryninimas, karpymas, ligavimas ir *E. coli* transformacija

DNR po mutagenezės ar PGR reakcijų analizuojama DNR elektroforezės metodais. Elektroforezė – tai įkrautų dalelių judėjimas elektros lauke. DNR molekulių krūvis neigiamas, todėl jos juda link teigiamojo elektrodo. Paprastai DNR elektroforezė atliekama agarozės arba poliakrilamido geliuose. Agarozės gelyje DNR molekulės pasiskirsto pagal molekulių dydį: kuo mažesnė DNR molekulė, tuo greičiau ji juda geliu elektros lauke. Išgryninta agarozė yra




**22 pav.** Persidengiančio prailginimo mutagenezės schema. Pradmenys B ir C atlieka dvi funkcijas: jie turi būti komplementarūs DNR matricai ir komplementarūs vienas kitam, nes antrojo PGR ciklo metu jie yra pradmenys dviem tarpiniams PGR produktams. Šoniniai pradmenys A ir D turi būti komplementarūs dauginamo geno galams ir gali turėti restriktazių atpažinimo sekas, tinkamas tolesniam klonavimui. Šiame darbe reikėtų naudoti *Pfu* arba kitą polimerazę, kuri neprikabina papildomų nukleotidų 3´ gale (*Taq* polimerazė netinka).




**23 pav.** Genų maišymo schema.

miltelių pavidalo, netirpi vandenyje kambario temperatūroje, tačiau tirpsta verdančiame vandenyje ir buferiniame tirpale, o vėsdama polimerizuojasi ir sudaro gelį (panašiai kaip želė). Kuo daugiau agarozės ištirpinama vandenyje, tuo standesnis gelis ir tuo trumpesnius DNR fragmentus galima frakcionuoti.

Tinkami DNR fragmentai klonuojami, ligavimo mišiniais transformuojamos *E. coli* ląstelės ir atrenkami reikiami klonai, iš kurių išskiriama plazmidinė DNR. Ji analizuojama, o jeigu reikia, nustatoma DNR seka. Plazmidės išskiriamos naudojant specialų išskyrimo rinkinį arba šarminiu plazmidžių išskyrimo metodu.

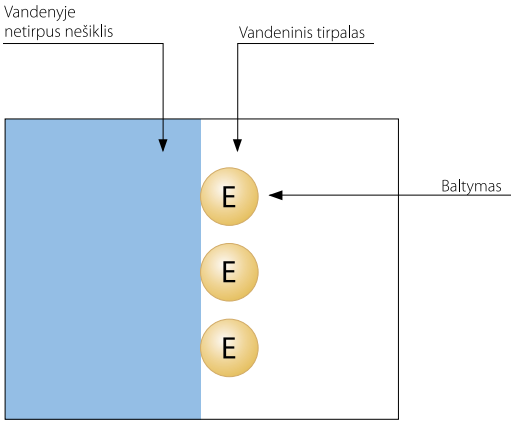
# 6. Fermentų imobilizacija

Dažnai fermentų naudojimą riboja tai, kad jie yra nestabilūs ir neatsparūs organiniams tirpikliams. Nors kai kurie fermentai naudojami vieną kartą (pvz., lipazės ar proteinazės skalbimo priemonėse, amilazė krakmolo hidrolizėje), katalizatorius norima naudoti keletą kartų ir taip sumažinti sąnaudas. Kad fermentai išliktų stabilūs ir aktyvūs ir būtų galima juos panaudoti keletą kartų, jie imobilizuojami, t. y. pririšami prie nešiklių, kuriuos galima po katalizės atskirti nuo reakcijos mišinio. Imobilizuoti fermentai dažnai pranašesni už neimobilizuotus: jie lengvai atskiriami nuo reakcijos mišinio, todėl reakciją galima bet kada sustabdyti, o katalizatorių panaudoti dar kartą. Be to, paprasčiau gauti grynesnį, t. y. fermentu neužterštą, produktą. Imobilizuotais fermentais užpildžius, pvz., kolonėles, katalizė gali vykti nepertraukiamai, o procesą, atsižvelgus į produkto sintezės intensyvumą, galima kontroliuoti keičiant srauto greitį ar substrato koncentraciją. Imobilizuojant fermentus galima pakeisti kai kurias jų savybes – aktyvumo priklausomybę nuo terpės pH, joninės jėgos, taip pat atsparumą įvairiems denatūruojantiems veiksniams (temperatūrai, organiniams tirpikliams ir kt.). Fermentus galima imobilizuoti ir ant elektrai laidžių paviršių. Taip kuriami įvairūs bioelektrokatalizės metodai, pvz., kuro elementai – biokatalizės sistemos, kurios gamina elektros srovę oksiduodamos gamtinius junginius (gliukozę, laktozę ir kt.). Dėl tokių panaudojimo galimybių imobilizuoti fermentai vis plačiau naudojami įvairiose pramonės srityse ar moksliniuose tyrimuose.

Imobilizacijos būdai skirstomi į fizinius (adsorbcija ant nešiklių, įterpimas į gelius, imobilizacija naudojant puslaidę membraną, imobilizacija dvifazėje sistemoje) ir cheminius (kovalentinis fermento prijungimas prie nešiklio bifunkciniais reagentais).

## 6.1. Fiziniai imobilizacijos būdai

**Adsorbcija ant nešiklių**. Paprasčiausias imobilizacijos metodas – adsorbcija ant nešiklių. Fermento tirpalas inkubuojamas su nešiklio suspensija ir taip fermentas adsorbuojamas ant jo paviršiaus (24 pav.). Imobilizacijai naudojami ir organiniai (polisacharidai, polimeriniai jonitai, modifikuota celiuliozė, kolagenas, medžio pjuvenos), ir neorganiniai (aliuminio, titano ir kitų metalų oksidai, silikageliai, aktyvintoji anglis, kaolinas) nešikliai. Adsorbcijai labai svarbūs vandeniliniai ryšiai, hidrofobinė, elektrostatinė ir koordinacinė sąveika. Kokie ryšiai susidarys tarp nešiklio matricos ir fermento molekulės, lemia nešiklio paviršiaus prigimtis ir fermento molekulės paviršiuje esančios funkcinės grupės, terpės pH, tirpalo joninė jėga.




**24 pav.** Baltymų sorbcija ant nešiklių.

Pagrindinis šio metodo trūkumas – gana silpna fermento ir nešiklio sąveika. Pakitus terpės pH, joninei jėgai ar temperatūrai, fermentas gali atsikabinti nuo paviršiaus. Norint pagerinti nešiklių sorbcines savybes, juos galima papildomai modifikuoti – įterpiamos hidrofobinės ar krūvį turinčios grupės. Galima keisti ir fermento savybes, pvz., genų inžinerijos metodais į baltymo struktūrą įterpti aminorūgščių sekas ar domenus, kurie labai gerai atpažįsta nešiklį. Gerai žinoma nešiklio ir fermento pora, kai nešiklis – celiuliozė, o fermentas turi celiuliozę rišantį domeną.

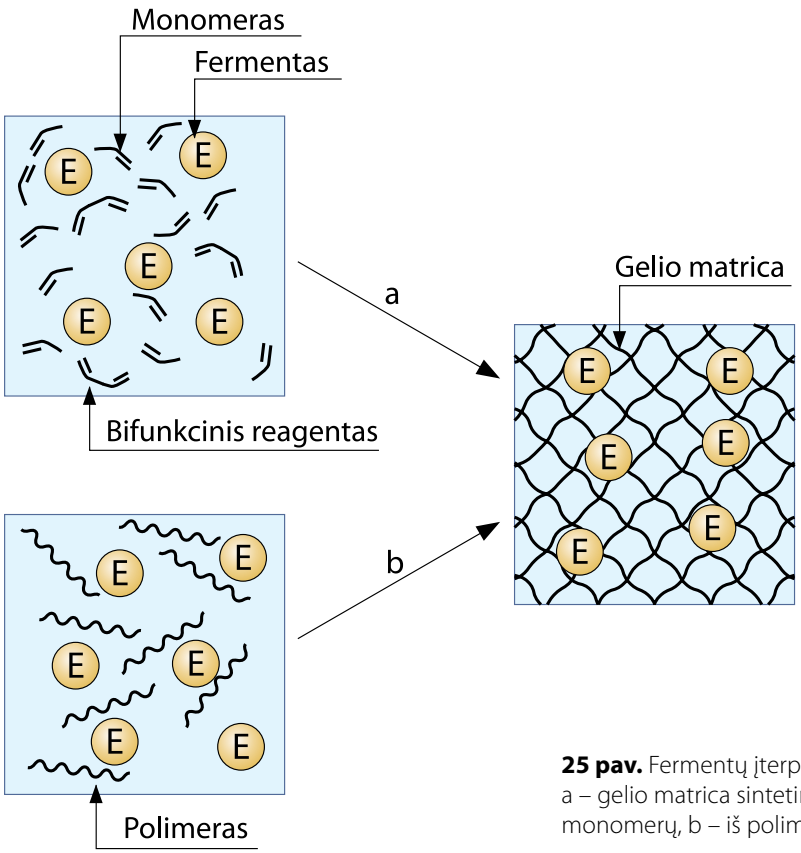
**Įterpimas į gelį**. Įterpimas į gelį yra vienas iš technologiškai paprastesnių fermentų imobilizacijos būdų. Į gelį įterpiamas fermentas nesudaro cheminių ryšių su gelio matrica (baltymo molekulė „sėdi“ polimeriniame tinkle, kurio poros yra mažesnės už baltymo molekulę). Imobilizuoti galima dviem būdais: gelis sintetinamas iš monomerų arba iš jau pagamintų polimerų.

Pirmasis būdas – fermento tirpalas sumaišomas su monomero tirpalu ir vykdoma polimerizacija. Taip suformuojamas gelis, kuriame įsiterpusios baltymo molekulės. Gelio sintezei iš monomerų naudojami bifunkciniai „susiuvantys“ reagentai, padedantys suformuoti trimatę gelio struktūrą (25 pav., a). Imobilizacijos efektyvumas labai priklauso nuo fermento atsparumo monomerų poveikiui, nes jie būdami chemiškai reaktyvūs gali pakeisti baltymo molekulę pvz., ją chemiškai modifikuoti, nutraukti cheminius ryšius, svarbius baltymo struktūros vientisumui, ir pan.

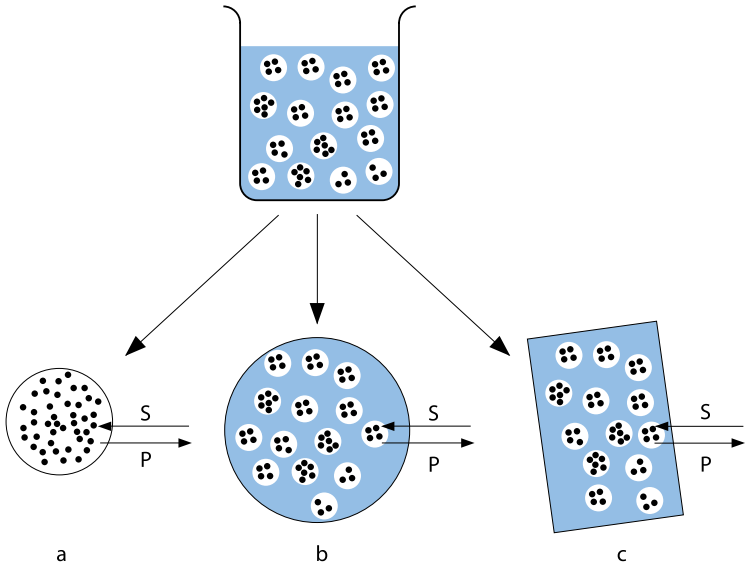
Antrasis būdas – fermento tirpalas sumaišomas su polimero tirpalu. Parinkus tam tikras salygas iš polimerų formuojasi gelio matrica, o baltymo molekulės į ją įsiterpia (25 pav., b). Paprastai naudojami poliakrilamido, polietilenglikolmetakrilato, polisacharidų, polijonitų bei įvairūs natūralūs (želatina, kolagenas, agaras, kalcio alginatas) geliai. Šis būdas tinkamesnis nestabiliems fermentams imobilizuoti.

**Fermentų imobilizacija naudojant puslaidę membraną**. Pagrindinis šio metodo principas – fermento vandeninis tirpalas puslaide membrana atskirtas nuo substrato vandeninio tirpalo. Membrana praleidžia nedidelės molekulinės masės substrato molekules į mikrokapsulės vidų, bet nepraleidžia fermento makromolekulių. Yra keli imobilizacijos būdai: mikrokapsulių, kapiliarų, liposomų sudarymas ir dvigubas emulgavimas.

Mikrokapsulių susidarymo metu fermento vandeninį tirpalą apsupa polimero plėvelė ir gaunama sferinė pūslelė (mikrokapsulė), kurios dydis gali būti nuo kelių dešimčių iki kelių šimtų mikrometrų (priklauso nuo imobilizacijos sąlygų; 26 pav., a).




**25 pav.** Fermentų įterpimas į gelį: a – gelio matrica sintetinama iš monomerų, b – iš polimerų.



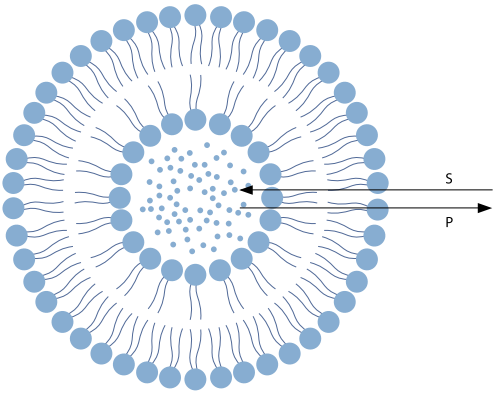

**26 pav.** Fermentų imobilizacija naudojant puslaidę membraną: a – mikrokapsulių

Mikrokapsulės gaunamos dviem būdais. Pirmasis – nuolat maišant fermento vandeninis tirpalas disperguojamas dietileterio tirpale, kuriame yra emulsiklių. Į gautą emulsiją pilamas polimero eterinis tirpalas (pvz., nitroceliuliozės). Liečiantis emulsijos lašeliams ir vandenyje netirpiam polimerui susidaro mikrokapsulės. Jos atskiriamos centrifuguojant ar filtruojant. Antrasis būdas – dviejų komponentų fazių sąlyčio riboje vyksta polikondensacijos reakcija. Vienas iš komponentų ištirpintas vandeninėje fazėje (vandeniniai emulsijos lašeliai), o kitas – organiniame tirpiklyje. Dažnai naudojamas 1,6-heksametilendiaminas (vandeninės fazės komponentas). Šis mikrokapsuliavimo būdas tinka tik tiems fermentams, kurie yra patvarūs šarminėje terpėje.

Mikrokapsulėms formuoti gali būti naudojamas ir dvigubo emulgavimo būdas. Pirmiausia ruošiama fermento vandeninio tirpalo emulsija polimero organiniame tirpale. Gauta emulsija disperguojama vandenyje – susidaro vandeninė emulsija su polimero organinio tirpalo lašeliais, kuriuose yra dar mažesni fermento tirpalo lašeliai. Stingstant polimero organiniam tirpalui susidaro sferinės dalelės (iš polimero) su viduje imobilizuotu fermentu (26 pav., b).

Fermentas imobilizuojamas kapiliaruose sumaišius fermento vandeninį tirpalą ir polimero organinį tirpalą. Susidaro emulsija, iš kurios formuojamos skaidulos (kapiliarai). Dėl porėtos tuščiavidurių kapiliarų struktūros fermentas sugaudomas jų viduje (26 pav., c).

Liposomos – tai sferinės mikrokapsulės, kurių sieneles sudaro lipidai, o viduje yra imobilizuotas fermentas (fermento vandeninis tirpalas; 27 pav.).




**27 pav.** Fermentų imobilizacija liposomose: S – substratas, P – produktas.

Liposomos gaunamos keliais būdais. Pirmasis būdas – lipidų organinį tirpalą išgarinus vakuume susidaro plona lipidų plėvelė, kuri padengia kolbos sieneles. Į tą pačią kolbą įpilama fermento vandeninio tirpalo ir kratoma, kol lipidų plėvelė visiškai pašalinama nuo sienelių – susidaro lipidų dispersija vandeniniame tirpale. Tokiame tirpale liposomos formuojasi savaime, o jų viduje sugaudomas fermentas.

Kitas liposomų gamybos būdas – tai fermento vandeninio tirpalo paviršiaus padengimas plonu lipidų sluoksniu. Leidžiant inertines dujas išgarinamas organinis tirpiklis. Fermento vandeninio tirpalo paviršiuje susidariusi lipidų plėvelė disperguojama vandeniniame tirpale. Šio būdo trūkumas – fermentas gali inaktyvintis dėl sąlyčio su organiniu tirpikliu. Liposomos nuo neimobilizuoto fermento tirpalo atskiriamos centrifuguojant ir suspenduojant jas buferiniame tirpale.

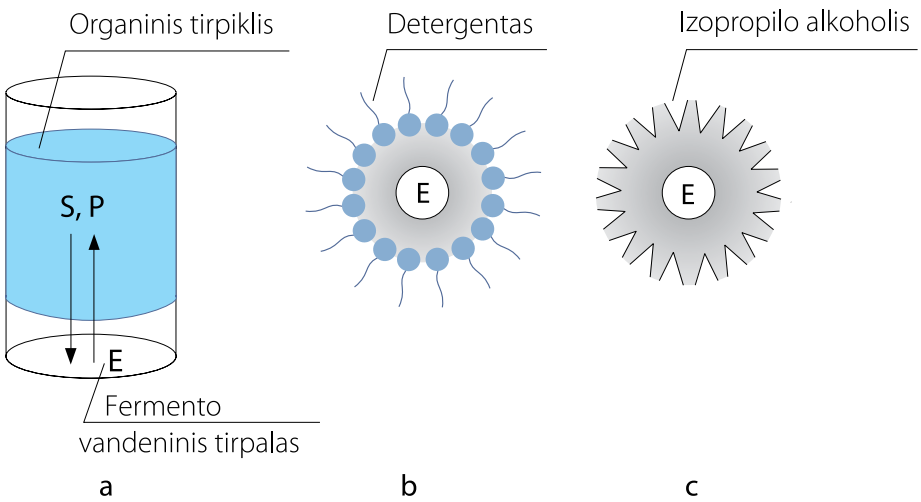
**Fermentų imobilizacija dvifazėje sistemoje.** Šis fermentų imobilizacijos būdas ypatingas tuo, kad fermentas negali laisvai judėti ne dėl sąveikos su nešik-

liu (adsorbentu, geliu ar membrana), o dėl fermento savybės ištirpti tik vienoje dvifazės sistemos fazėje. Substratas ir susidaręs produktas skiriasi tirpumu vienoje iš fazių, todėl pasiskirsto dvifazėje sistemoje. Fazės parenkamos taip, kad produktas pereitų į tą fazę, kurioje nėra fermento. Reakcijai pasibaigus fazės viena nuo kitos atskiriamos. Fazė su fermentu panaudojama dar kartą, o iš kitos išskiriamas gautas produktas.

Dvifazės sistemos pavyzdys – sistema, sudaryta iš vandens ir su vandeniu nesimaišančio organinio tirpiklio. Jei naudojama tokia sistema, fermentas būna ištirpęs vandenyje (nepoliniuose organiniuose tirpikliuose fermentai netirpsta). Fermentinė reakcija vyksta taip pat vandeninėje fazėje, o susidaręs produktas pereina į organinę fazę (28 pav., a). Metodo trūkumas – dėl nedidelio fazių sąlyčio paviršiaus ploto procesas vyksta lėtai, be to, fermentas gali inaktyvintis.

Mikroemulsijos gaunamos sumaišius fermento vandeninį tirpalą su detergento organiniu tirpalu. Stipriai maišant keletą minučių gaunamas skaidrus homogeninis tirpalas. Susiformuoja mikrolašeliai arba micelės, kurių viduje yra fermento molekulės (28 pav., b). Detergento sluoksnis apsaugo fermentą nuo inaktyvacijos, kurią gali sukelti sąlytis su organiniu tirpikliu. Sferinių lašelių arba micelių dydis priklauso nuo pasirinkto organinio tirpiklio, detergento ir vandens kiekio.

Atskirti produktą nuo detergento dažnai būna sunku, todėl gali būti naudojamos mikroemulsijos be detergentų. Tokios sistemos ruošiamos iš trijų komponentų: heksano/izopropilo alkoholio/vandens arba tolueno/izopropilo alkoholio/vandens. Esant tam tikram komponentų santykiui vanduo sistemoje būna 5–30 nm dydžio sferinių lašelių pavidalo. Vandens lašelius stabilizuoja aplink juos išsidėsčiusios izopropilo alkoholio molekulės. Fermentas




**28 pav.** Fermentų imobilizacija dvifazėje sistemoje: a – dvifazė sistema: vanduo ir su vandeniu nesimaišantis organinis tirpiklis; b – detergento micelė, kurios viduje imobilizuotas fermentas, c – fermentas, imobilizuotas vandens mikrolašelio viduje, kurį stabilizuoja izopropilo alkoholio molekulės.

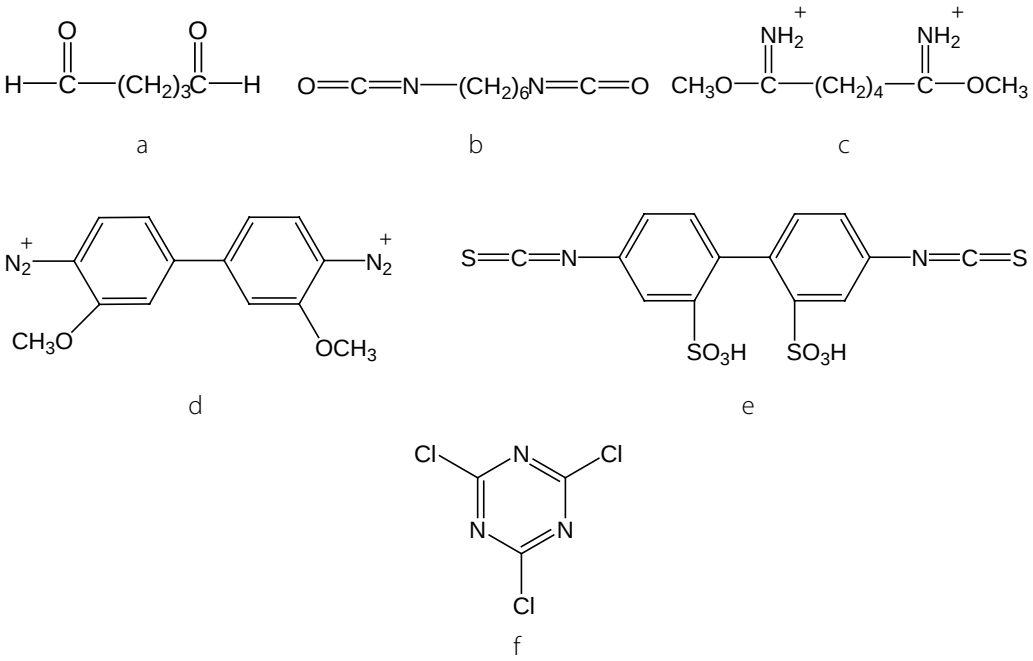
imobilizuojamas vandens lašelio viduje ir taip išsaugomas jo katalizinis aktyvumas (28 pav., c). Pakeitus sistemą sudarančių komponentų santykį išsisluoksniuoja vandeninė (su fermentu) ir organinė (su susidariusiu produktu) fazės. Taip fermentas atskiriamas nuo reakcijos mišinio. Fermentinės reakcijos, kai reakcijoje dalyvaujantis substratas netirpsta vandenyje, bet tirpsta organiniame tirpiklyje, vykdomos dvifazėje sistemoje (vanduo/organinis tirpiklis).

## 6.2. Cheminiai imobilizacijos būdai

**Surišimas bifunkciniais reagentais.** Šiuo būdu gaunamos membranos dažnai naudojamos biojutikliuose. Paveikus fermento tirpalą reagentu, turinčiu dvi ar daugiau funkcinių grupių, galinčių dalyvauti reakcijoje, baltymo globulė susijungia su juo sudarydama erdvinį tinklelį. Dažniausiai naudojami bifunkciniai reagentai – glutaro dialdehidas, heksametilendiizocianatas, adipimidatas, 4,4´-diazobenzidin-3,3´-dianizidinas, 4,4´-diizotiacianatdifenil-2,2´-disulfonrūgštis, 2,4,6-trichlortriazinas (29 pav.).

Fermentų surišimo su bifunkciniais reagentais būdai: fermentai surišami su inertiškais baltymais, fermentai adsorbuojami ant vandenyje netirpaus nešiklio, paveikto bifunkciniu reagentu, ir fermentai imobilizuojami suaktyvinus nešiklį bifunkciniu reagentu.

Fermentams surišti su inertiškais baltymais (pavyzdžiui, albuminu) naudojamas glutaro dialdehidas. Į fermento ir albumino




**29 pav.** Bifunkciniai reagentai: glutaro dialdehidas (a), heksametilendiizocianatas (b), adipimidatas

buferinių tirpalų mišinį įpilama tam tikros koncentracijos glutaro dialdehido tirpalo. Gautas mišinys kruopščiai išmaišomas ir laikomas šaltai. Imobilizuotas fermentas praplaunamas buferiniu tirpalu bei vandeniu. Membranoms paruošti gautas mišinys paskleidžiamas ant plokščių stiklinių paviršių ir laikoma šaltai, kol susidaro plonas imobilizuoto fermento sluoksnis. Nuo stiklinio paviršiaus nuimta plėvelė praplaunama. Taip imobilizuoti fermentai naudojami bioanalizės sistemose.

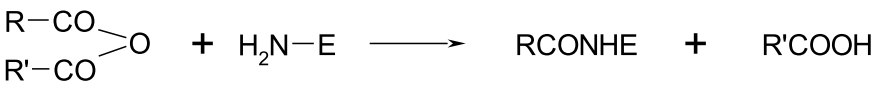
Naudojant kolageną gaunamos aktyvios membranos su adsorbuotu fermentu. Tokias membranas galima suformuoti trimis būdais: 1. kolageno membrana veikiama rūgštimi arba šarmu, mirkoma fermento vandeniniame tirpale ir galiausiai išdžiovinama, 2. fermento tirpalas sumaišomas su kolageno vandeniniu tirpalu, o gauta suspensija džiovinama ir 3. kolageno ir fermento suspensija nusodinama ant kietų paviršių (elektronusodinimas). Paveikus kolageno membraną glutaro dialdehidu fermentas surišamas tvirčiau.

Prieš fermentus imobilizuojant ant vandenyje netirpaus nešiklio (celofano, kolageno ir kt.), nešiklis aktyvinamas bifunkciniu reagentu (pvz., glutaro dialdehidu, 4,4´-diazobenzidin-3,3´-dianizidinu). Imobilizuojamas fermentas jungiasi su aktyviomis bifunkcinio reagento grupėmis.

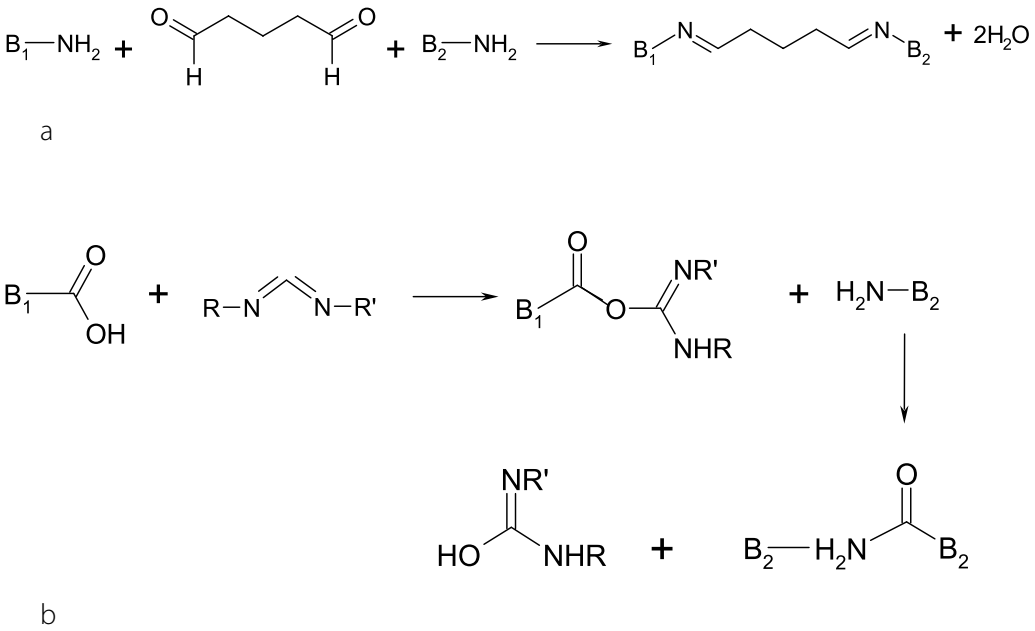
Populiarus tampa cheminis baltymų kristalų „susiuvimas" bifunkciniais reagentais. Taip stabilizuojama baltymo struktūra, kristalai nebetirpsta vandenyje, o kanalais tarp atskirų fermento molekulių iki fermento aktyviojo centro atkeliauja substratai.

**Kovalentinis prijungimas**. Šis imobilizacijos būdas dažnai taikomas biokatalizės procesuose, kai ypač svarbu mechaninis matricos tvirtumas bei fermento stabilumas. Tarp fermento ir nešiklio funkcinių grupių susidaro kovalentinis ryšys. Imobilizacijos metu svarbu, kad aminorūgščių liekanos, esančios fermento aktyviajame centre, nereaguotų su nešiklio funkcinėmis grupėmis, todėl kiekvienam fermentui būtina parinkti imobilizacijos metodą. Nešikliai, turintys su fermentais galinčių reaguoti funkcinių grupių, gaunami sintetinant kopolimerus iš maleino rūgšties anhidrido ir etileno ar akrilo rūgšties. Fermento aminogrupė reaguoja su šių kopolimerų anhidridinėmis grupėmis (30 pav.).

Į organinius ir neorganinius nešiklius, neturinčius funkcinių grupių, galinčių reaguoti su fermentu, šios grupės įterpiamos. Organiniai polimerai (dekstranas, sefarozė, celiuliozė, chitozanas), turintys –OH liekaną, aktyvinami bromcianu ir 2-amino-4,6-dichlortriazinu. Neorganiniai nešikliai (stiklas, silikagelis, smėlis, metalų paviršiai) aktyvinami silanais (3-aminopropiltrimetoksisilanu, 3-aminopropiltrietoksisilanu). Į nešiklį įterpus amino- ar karboksigrupę, jis aktyvinamas atitinkamai glutaro dialdehidu arba 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidu (31 pav.).




**30 pav.** Fermento aminogrupės reakcija su anhidridine grupe.




**31 pav.** Sorbento ($B_1$) aktyvinimas glutaro dialdehidu (a) ir 1-etil-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidu (b) bei baltymo ($B_2$) prijungimas.

Silikagelis yra vienas iš dažniausiai imobilizacijai naudojamų nešiklių. Jo adsorbcines savybes labai sustiprina paviršiaus modifikacija silanais (3-aminopropiltrimetoksisilanu, 3-aminopropiltrietoksisilanu). Sąveika tarp silanais modifikuoto silikagelio paviršiaus ir adsorbuojamo biokatalizatoriaus gali būti elektrostatinė arba kovalentinė. Magnetinės 50–80 nm skersmens sferinės silicio dalelės, modifikuotos amino-silanu, taip pat sėkmingai naudojamos fermentams imobilizuoti. Šie neorganiniai dariniai, pasižymintys paramagnetinėmis savybėmis, yra mechaniškai atsparūs, neagreguoja, jiems būdingas biosuderinamumas. Šis imobilizacijos būdas perspektyvus imunochemijoje, ypač antikūnams gryninti, imunoanalizėje ląstelėms išskirti.

# 7. Tyrimo metodai ir praktikos darbai

## 7.1. *Escherichia coli* auginimo terpės

**Darbo tikslas** – paruošti terpę *Escherichia coli* ląstelėms auginti.

Yra daug terpių, tinkamų *Escherichia coli* ląstelėms auginti. Kokią terpę naudoti, priklauso nuo eksperimento, – pavyzdžiui, rekombinantinių baltymų sintezei dažnai naudojamos kompleksinės Luria-Bertani (LB) ar Terrific Broth (TB) terpės, mutantų tyrimams galima naudoti sintetines terpes, pavyzdžiui, M9. Kietos terpės gaunamos pridėjus agaro.

**Reagentai**

- gliukozė
- $MgSO_4$
- NaCl
- $NH_4Cl$
- $KH_2PO_4$
- $K_2HPO_3$
- $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$
- triptozė
- mielių ekstraktas
- triptonas
- glicerolis
- agaras
- etanolis
- antibiotikai (ampicilinas, kanamicinas, chloramfenikolis, tetraciklinas)

**Aparatūra**

- autoklavas
- svarstyklės
- magnetinė maišyklė
- pH-metras

**Darbo eiga**

1. Vienam litrui M9 terpės paruošti reikia 50 ml sterilaus 20 × M9 druskų tirpalo, 20 ml 20 % gliukozės, 1 ml 1 M $MgSO_4$, 0,5 g NaCl ir 930 ml $H_2O$.
2. 20 × M9 druskų tirpalui paruošti reikia: 20 g $NH_4Cl$, 60 g $KH_2PO_4$, 120 g $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$ (vienam litrui vandens). Tirpalas sterilizuojamas autoklave.
3. Vienam litrui LB terpės paruošti reikia 10 g triptozės, 5 g mielių ekstrakto, 10 g NaCl, pH 7,5 (jei reikia, įpilama NaOH tirpalo).
4. Vienam litrui TB terpės paruošti reikia 12 g triptono, 24 g mielių ekstrakto, 4 ml glicerolio, 2,31 g $KH_2PO_4$, 12,54 g $K_2HPO_3$.
5. Jei ruošiama kieta terpė, papildomai dedama 15 g/l agaro ir tuomet sterilizuojama autoklave.
6. Jei reikia antibiotikų, jų pridedama į po sterilizacijos pravėsusią terpę. Koncentruotiems antibiotikų tirpalams ruošti paprastai naudojamas sterilus dejonizuotas vanduo (ampicilino 50 mg/ml, kanamicino 30 mg/ml). Chloramfenikolis (4 mg/ml) ir tetraciklinas (12 mg/ml) tirpinami etanolyje ir laikomi –20 °C temperatūroje. Į terpę paprastai dedama 50 µg ampicilino, 30 µg kanamicino, 30 µg chloramfenikolio ir 10–20 µg tetraciklino vienam mililitrui terpės.

## 7.2. Substratą naudojančių bakterijų atranka

**Darbo tikslas** – išskirti norimą junginį (substratą) naudojančius mikroorganizmus.

Gamtoje egzistuoja daugybė mikroorganizmų, kurių vienintelis anglies ir energijos šaltinis, reikalingas jų augimui, yra įvairūs cheminiai junginiai, pvz., lipidai, fenolis, naftalenas, laktozė, piridinas. Tokių mikroorganizmų paieška svarbi naujiems substratą skaidantiems fermentams aptikti. Norimiems mikroorganizmams iš aplinkos išskirti paprastai naudojamos sintetinės terpės, kuriose vienintelė maisto medžiaga yra tiriamasis junginys (substratas). Tokios terpės vadinamos selektyviomis. Yra daug selektyvių terpių, tinkamų tam tikriems mikroorganizmams išskirti.

### Reagentai

- Kozero mineralinė terpė (KT): 5 g/l NaCl, 1 g/l $NH_4H_2PO_4$, 1 g/l $K_2HPO_4$, 0,4 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 ml/l druskų tirpalo, pH 7,2 (jei reikia, įpilama koncentruoto KOH).
- Kozero agaro terpė (KAT) gaunama į KT terpę pridėjus 15 g/l agaro.
- EFA terpė: 10 g/l $K_2HPO_4$, 4 g/l $KH_2PO_4$, 1 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,5 g/l mielių ekstrakto, 10 ml/l druskų tirpalo, pH 7,2 (jei reikia, įpilama koncentruoto KOH).
- Agaro EFAA terpė gaunama į EFA terpę pridėjus 15 g/l agaro.
- Druskų tirpalas: 2 g/l $CaCl_2 \times 2H_2O$, 1 g/l $MnSO_4 \times 4H_2O$, 0,5 g/l $FeSO_4 \times 7H_2O$. Druskos tirpinamos 0,1 N HCl ir jų tirpalo į KT bei EFA terpes įpilama po pastarųjų sterilizavimo autoklave.

### Aparatūra

- autoklavas
- inkubatoriai
- svarstyklės
- magnetinė maišyklė
- pH-metras
- kratyklė

### Darbo eiga

1. Norimą junginį skaidančių mikroorganizmų paieškai galima pasirinkti dirvožemio pavyzdžius, surinktus skirtingose vietovėse. Pavyzdžiui, jei bandoma išskirti benzeną ar fenolį skaidančius mikroorganizmus, pavyzdžius reikėtų rinkti netoli chemijos gamyklos, automobilių kelių ar pesticidų sandėlių.
2. Po 2 g dirvožemio dedama į kūginę 200 ml tūrio kolbą, kurioje yra 20 ml mineralinės KT ar EFA terpės ir 0,01–0,5 % norimo junginio.
3. Kolbos su dirvožemio mėginiais inkubuojamos kratyklėje aeruojant 1–7 paras 25–37 °C temperatūroje.
4. Po inkubacijos 50 µl kultūros pasėjama Petri lėkštelėje ant Kozero agaro terpės.
5. Lėkštelės inkubuojamos 25–37 °C temperatūroje ir atrenkamos geriausiai augančios bei morfologiškai besiskiriančios kolonijos.
6. Atskiros kolonijos persėjamos ant kompleksinės terpės grynumui patikrinti.
7. Norint įsitikinti, kad atrinkti mikroorganizmai tikrai naudoja tiriamąjį junginį augimui, jie pasėjami tuo pačiu metu ant dviejų terpių: Kozero agaro ar EFA terpės be anglies šaltinio (tiriamojo junginio) ir su anglies šaltiniu. Kontrolinė terpė yra be junginio. Tolesniam darbui atrenkami mikroorganizmai, kurie augo terpėje su tiriamuoju junginiu, bet neaugo kontrolinėje terpėje. Norint įsitikinti, kad atrinkti mikroorganizmai tikrai naudoja tiriamąjį junginį augimui, tą patį eksperimentą galima pakartoti naudojant skystas terpes.

## 7.3. Chromosominės DNR išskyrimas

**Darbo tikslas** – išskirti DNR iš pasirinkto mikroorganizmo.

### Reagentai

- terpės mikroorganizmams auginti
- TNE buferinis tirpalas (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM NaCl)
- TNE buferinis tirpalas su Tritonu X-100 (2 % Tritono X-100 (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA)
- Tritonas X-100
- lizocimas
- proteinazė K
- fenolis
- chloroformas
- izoamilo alkoholis
- kalio acetatas
- 96 % etanolis

### Aparatūra

- autoklavas
- inkubatoriai
- svarstyklės
- mikrocentrifuga
- magnetinė maišyklė
- pH-metras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- kratyklė

### Darbo eiga

1. Bakterijos auginamos 5 ml TB ar kitoje joms tinkamoje terpėje per naktį aeruojant 30 °C temperatūroje termostatinėje kratyklėje.
2. Ląstelės centrifuguojamos (6000 *g*, 15 min.).
3. Nusodintos ląstelės praplaunamos 1 ml TNE buferiniu tirpalu, o gauta ląstelių suspensija centrifuguojama (10 000 *g*, 5 min.).
4. Nusodintos ląstelės suspenduojamos 135 µl TNE buferiniame tirpale ir papildomai įpilama dar 135 µl TNE buferinio tirpalo su Tritonu X-100 ir 30 µl (5 mg/ml) lizocimo. Viskas gerai išmaišoma ir inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje kratyklėje.
5. Po inkubavimo įpilama 15 µl proteinazės K tirpalo (20 mg/ml), gerai sumaišoma 3–5 kartus apverčiant mėgintuvėlį ir inkubuojama 2 val. 65 °C temperatūroje kratyklėje.
6. Po centrifugavimo (10 000 *g*, 15 min.) gautas supernatantas[1] perpilamas į naują mėgintuvėlį ir gryninamas įpylus 300 µl fenolio, chloroformo, izoamilo alkoholio tirpalų mišinio santykiu 25:24:1. Tirpalas gerai sumaišomas apverčiant mėgintuvėlį 5–10 kartų ir centrifuguojamas (10 000 *g*, 5 min.). Viršutinis sluoksnis atsargiai nusiurbiamas į švarų mėgintuvėlį ir įpilama 300 µl chloroformo, gerai sumaišoma ir vėl centrifuguojama.
7. Į surinktą viršutinį sluoksnį įpilama 30 µl 5 M kalio acetato ir 660 µl 96 % etanolio. Geresniam DNR nusodinimui mišinys paliekamas 2 val. arba per naktį –20 °C temperatūroje.
8. Po centrifugavimo (10 000 *g*, 10 min.) supernatantas nupilamas, o nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos 150 µl distiliuoto vandens.

[1] Skystis virš nuosėdų.

## 7.4. Šarminis plazmidinės DNR išskyrimo metodas

**Darbo tikslas** – iš *E. coli* ląstelių išskirti plazmidinę DNR.

### Reagentai

- sterilios agaro terpės
- sterilios skystos terpės
- *E. coli* kamienas DH5α, BL21(DE3) arba kiti kamienai su plazmidėmis
- etanolis
- izopropanolis
- gliukozė
- Tris-OH
- EDTA
- natrio dodecilsulfatas (SDS)
- NaOH
- amonio acetatas

### Aparatūra

- termostatas bakterijoms auginti
- termostatas
- pH-metras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- ledo vonia
- mikrocentrifuga
- Petri lėkštelės ir kolbos mikroorganizmams auginti
- šaldiklis

### Darbo eiga

Bakterijų ląstelės auginamos per naktį aeruojant tinkamoje terpėje 30 °C temperatūroje. 1 ml suspensijos centrifuguojama (10 000 *g*, 1 min.), po to skystis nupilamas, o gauta ląstelių masė suspenduojama 100 µl I tirpalo ir laikoma 15–20 min. kambario temperatūroje. Po to įpilama 200 µl II tirpalo ir laikoma 10–15 min. kambario temperatūroje. Kai tirpalas pasidaro skaidrus, įpilama 150 µl III tirpalo ir laikoma 20 min. ledo vonioje, po to centrifuguojama (10 000 *g*, 5 min.). Į vieną tūrį supernatanto įpilami 2 tūriai etanolio arba 1 tūris izopropanolio ir paliekama šaltai (–20 °C). Susidarius nuosėdoms tirpalas centrifuguojamas (10 000 *g*, 5 min.). Nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos nedideliame kiekyje vandens.

**I tirpalas**

| | |
|---|---|
| 50 mM | gliukozės |
| 25 mM | Tris-OH (pH 8,0) |
| 10 mM | EDTA |

**II tirpalas**

| | |
|---|---|
| 0,2 N | NaOH |
| 1 % | SDS |

**III tirpalas**

| | |
|---|---|
| 7,5 M | amonio acetatas |

DNR tirpalus laikyti –20 °C (arba –80 °C saugant ilgiau) temperatūroje.

## 7.5. Genetinės medžiagos išskyrimas iš aplinkos pavyzdžių

**Darbo tikslas** – iš aplinkos pavyzdžių išskirti plazmidinę DNR.

Reikia mokėti išskirti nekultivuojamų mikroorganizmų DNR iš įvairių šaltinių – dirvožemio, vandens telkinių vandens, žarnyno ir kt. Šiuo metu sukurta nemažai rinkinių, skirtų DNR išskirti iš įvairių aplinkos pavyzdžių, pvz., Meta-G-Nome™ DNA Isolation Kit, EPICENTRE, UltraClean® Soil DNA Isolation Kit, MO BIO, ZR Soil Microbe DNA Kit™, ZYMO RESEARCH. Toliau aprašyti tiesioginis ir netiesioginis DNR išskyrimo metodai. Jei metagenominė biblioteka kuriama naudojant rinkinius, viskas atliekama pagal gamintojų rekomendacijas.

### Reagentai

- sterilios agaro terpės
- sterilios skystos terpės
- *E. coli* kamienas DH5α, BL21(DE3) arba kiti kamienai su plazmidėmis
- etanolis
- Tris-HCl
- EDTA
- SDS
- CTAB
- NaOH
- NaCl
- proteinazė K
- lizocimas
- chloroformas
- 7,5 M amonio acetatas
- izopropanolis
- TE buferinis tirpalas (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5)

### Aparatūra

- sūkurinė kratyklė (VORTEX) arba maišytuvas
- termostatas
- pH-metras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- ledo vonia
- mikrocentrifuga
- Petri lėkštelės ir kolbos mikroorganizmams auginti
- šaldiklis
- membrana (0,45 µm poros; GE WHATMAN)

### Darbo eiga

### Švelnios lizės metodas

Prieš darbą paruošiami šie tirpalai:

- lizės buferinis tirpalas (100 mM Tris-HCl, 100 mM Na-EDTA, 1,5 M NaCl, 1 % CTAB, pH 8)
- TE buferinis tirpalas.

1. Į 2 ml mėgintuvėlį įberiama 1 g dirvožemio.
2. Užpilama 750 µl lizės buferinio tirpalo ir intensyviai maišoma 5 min. sūkurinėje kratyklėje didžiausiu greičiu.
3. Pridedama 40 µl lizocimo (50 mg/ml) ir 10 µl proteinazės K (10 mg/ml) ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 30 min.
4. Pridedama 200 µl SDS (20 %) ir inkubuojama 65 °C temperatūroje 2 val., kas pusvalandį pamaišoma.
5. Po centrifugavimo (6000 *g*, 10 min.) supernatantas perpilamas į kitą mėgintuvėlį, o ant nuosėdų užpilama 500 µl lizės buferinio tirpalo. Kelias sekundes pamaišoma, inkubuojama 65 °C temperatūroje 10 min. ir vėl centrifuguojama.

6. Abu supernatantai sumaišomi ir ekstrahuojami chloroformu (ant jų užpilamas toks pat tūris chloroformo). Sumaišoma ir centrifuguojama (6000 *g*, 5 min.). Viršutinė vandeninė fazė nupilama į švarų mėgintuvėlį.
7. Į tirpalą įpilama 0,6 tūrio izopropanolio ir inkubuojama 4 °C temperatūroje per naktį.
8. DNR nuosėdos nusodinamos centrifuguojant (16 000 *g*, 10 min.) ir ištirpinamos 50 µl TE buferiniame tirpale.

**Netiesioginis DNR ekstrakcijos metodas**

Prieš darbą paruošiami šie tirpalai:

- maišymo buferinis tirpalas (100 mM Tris-HCl, 100 mM Na-EDTA, 0,1 % SDS, 1 % CTAB, pH 8)
- plovimo buferinis tirpalas (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)
- lizės buferinis tirpalas (100 mM Tris-HCl, 100 mM Na EDTA, 1,5 M NaCl, 1 % CTAB, 20 % SDS, lizocimas, proteinazė K)

1. 50 g aplinkos pavyzdžio suspenduojama 100 ml maišymo buferinio tirpalo ir homogenizuojama maišytuve (3 min.) arba sūkurinėje kratyklėje (15 min.).
2. Likę žemių gumulėliai centrifuguojami (1000 *g*, 10 min.), tada ant nuosėdų užpilama 100 ml maišymo buferinio tirpalo ir vėl maišoma. Taip kartojama 3 kartus.
3. Supernatantai, gauti po visų trijų centrifugavimų, sumaišomi. Bakterijų ląstelės nusodinamos centrifuguojant (10 000 *g*, 30 min.).
4. Surinktos bakterijos praplaunamos plovimo buferiniu tirpalu.
5. Nuosėdos suspenduojamos 8 ml lizės buferinio tirpalo pridėjus 160 µl lizocimo (50 mg/ml) bei 40 µl proteinazės K (10 mg/ml) ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 30 min.
6. Į tirpalą įpilama 1 ml 20 % SDS ir inkubuojama 2 val. 65 °C temperatūroje kratant (200 rpm).
7. Toliau ekstrahuojama chloroformu ir DNR nusodinima izopropanoliu, kaip ir švelnios lizės metodu, o nuosėdos tirpinamos 250 ml TE buferiniame tirpale.

**DNR išskyrimas iš jūros vandens**

Prieš darbą paruošiami šie tirpalai:

- STE buferinis tirpalas (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl)
- 10 % SDS tirpalas
- etanolis
- amonio acetatas
- TE buferinis tirpalas

1. Bakterijų ląstelės iš vandens (apie 10 l) surenkamos filtruojant per membraną, kurios poros 0,45 µm. Membrana vėliau nuplaunama STE buferiniu tirpalu.
2. Nuo membranos nuplautos ląstelės centrifuguojamos (12 000 *g*, 15 min.). Po to ant ląstelių užpilama STE buferinio tirpalo.
3. Į vieną tūrį bakterijų suspensijos įpilama 0,1 tūrio 10 % SDS tirpalo ir mėgintuvėliai 1–2 min. kaitinami verdančio vandens vonelėje.
4. Į mėgintuvėlius su DNR įpilami 3 tūriai etanolio (96 %) ir 0,1 tūrio amonio acetato (7,5 M) ir mažiausiai 2 val. laikoma –20 °C temperatūroje.
5. DNR nuosėdos centrifuguojamos (10 000 *g*, 10 min.) ir tirpinamos TE buferiniame tirpale.

## 7.6. DNR elektroforezė, DNR gryninimas ir analizė

**Darbo tikslas** – paruošti agarozės gelius DNR frakcionuoti ir gryninti, įvertinti išskirtos DNR grynumą.

### Reagentai

- agarozė (TopVision™ Agarose, THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- etidžio bromidas (SIGMA, FLUKA)
- TAE (Tris-acetato elektroforezės buferinis tirpalas (TAE × 50) – 242 g/l Tris, 57,1 ml/l acto rūgšties, 37,2 g/l EDTA, pH 8,0; skiesti 50 kartų)
- elektroforezės dažiklis (6X DNA Loading Dye, THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- DNR žymuo (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- DNR gryninimo po PGR rinkinys (GeneJET™ PCR Purification Kit, THERMO FISHER SCIENTIFIC, arba QIAquick PGR Purification Kit, QIAGEN)

### Aparatūra

- UV transiliuminatorius
- sūkurinė kratyklė (VORTEX)
- termostatas
- pH-metras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- ledo vonia
- mikrocentrifuga
- šaldiklis

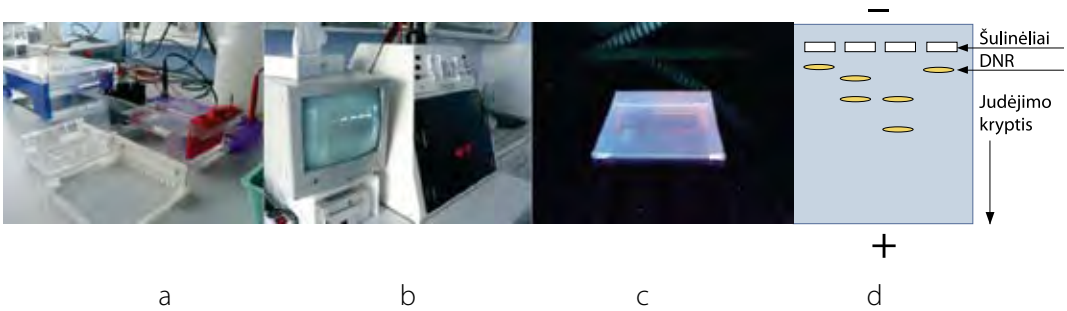
### Darbo eiga

1. 1 g agarozės sumaišoma su 100 ml TAE buferiniu tirpalu ir kaitinama, kol agarozė visiškai ištirpsta.
2. Tirpalą atvėsinus iki 60 °C temperatūros į jį įpilama 0,001 % etidžio bromido ir visa tai supilama į liejimo formas, šukelėmis padaromi šulinėliai, į kuriuos bus įleidžiami DNR pavyzdžiai.
3. Sustingus agarozės geliui šukelės ištraukiamos, o gelis panardinamas į TAE buferinį tirpalą elektroforezės aparate.
4. DNR pavyzdys sumaišomas su DNR elektroforezės dažikliu ir mišinys suleidžiamas į šulinėlius. Į gretimą šulinėlį suleidžiamas DNR žymuo.
5. Tuomet leidžiama tekėti elektros srovei.
6. Elektroforezės dažikliui nuėjus 2/3 gelio, gelis stebimas ultravioletinėje šviesoje (DNR su etidžio bromidu sudaro oranžinės spalvos UV švytintį junginį).
7. Fragmentų dydis nustatomas palyginus jų nueitą kelią su žymens nueitu keliu (32 pav.).

Kartu su DNR iš aplinkos pavyzdžių ekstrahuojasi ir humuso rūgštys, kurios yra pagrindinė DNR priemaiša. Šie junginiai sugeria 230 nm bangos ilgio šviesą, DNR – 260 nm, o baltymai 280 nm. DNR švarumui įvertinti spektrofotometru tikrinamas 260 nm/230 nm (DNR ir humuso rūgščių) bei 260 nm/280 nm (DNR ir baltymų) sugerties santykis. Jei A260/A230 santykis didesnis negu 2, DNR pavyzdys pakankamai grynas ir tinkamas daugeliui genų analizės ir kūrimo metodų.

Jei DNR nepakankamai švari, paprasčiausias būdas ją gryninti yra po elektroforezės agarozės gelyje išpjauti reikiamo dydžio fragmentus iš gelio. Tam naudojami rinkiniai (pvz., GeneJET™ Gel Extraction Kit, THERMO FISHER SCIENTIFIC, arba QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) pagal gamintojų rekomendacijas.

Po PGR DNR gryninama naudojant DNR gryninimo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.




**32 pav.** Elektroforezės aparatūra (a), transiliuminatorius (b), agarozės gelis su DNR fragmentais, apšviestas UV šviesa (c), ir agarozės gelio schema (d).

## 7.7. Imliosios kultūros paruošimo metodas

**Darbo tikslas** – paruošti imliąsias *E. coli* ląsteles ir transformuoti jas DNR molekulėmis.

### Reagentai

- sterilios agaro terpės
- sterilios skystos terpės
- antibiotikai
- *E. coli* kamienas DH5α, BL21(DE3) arba kiti kamienai
- sterilūs $MgCl_2$ ir $CaCl_2$ tirpalai
- glicerolis

### Aparatūra

- termostatas bakterijoms auginti
- termostatas
- spektrofotometras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- ledo vonia
- mikrocentrifuga
- Petri lėkštelės ir kolbos mikroorganizmams auginti

### Darbo eiga

### Cheminis imliosios kultūros paruošimo metodas

1. *E. coli* DH5α arba kitoks kamienas auginamas LB terpėje 15–16 h 37 °C temperatūroje aeruojant.
2. 500 µl kultūros persėjama į 50 ml LB terpės ir auginama, kol optinis tankis ($A_{600}$) pasiekia 0,3–0,5 (apie 3 val.).
3. Suspensija ledu šaldoma 10–15 min. ir centrifuguojama (5000 *g*, 15 min.).
4. Nusėdusios ląstelės suspenduojamos 10 ml 100 mM $MgCl_2$ tirpalo ir šaldomos 10 min. ledo vonioje.
5. Tirpalas dar kartą centrifuguojamas ir ląstelių nuosėdos suspenduojamos 20 ml 100 mM $CaCl_2$, šaldoma 10 min. ledo vonioje.

6. Tirpalas dar kartą centrifuguojamas ir ląstelių nuosėdos suspenduojamos 1 ml 85 mM $CaCl_2$, 15 % glicerolio tirpale.

100 µl taip paruoštų ląstelių sumaišoma su DNR pavyzdžiu (DNR vektorius, ligavimo mišinys ar kita) ir 30 min. šaldoma ledo vonioje. Po inkubacijos ląstelės paveikiamos 45 s trukmės karščio šoku 42 °C temperatūros vandens vonioje. DNR ir ląstelių mišinys atšaldomas ir pasėjamas ant agaro terpės su ampicilinu arba kitu reikiamu antibiotiku.

**Imliųjų ląstelių ruošimas ir transformacija elektroporacijos metodu**

1. *Escherichia coli* DH5α ląstelės pasėjamos į 5 ml kompleksinės terpės ir auginamos per naktį (15–16 val.) aeruojant 30 °C temperatūroje.
2. 1 ml kultūros pasėjama į 200 ml TB terpės. Auginama aeruojant 37 °C temperatūroje, kol optinis tankis ($A_{600}$) pasiekia 0,5–0,9.
3. Ląstelės 15 min. laikomos ledo vonioje.
4. Po centrifugavimo (3000 *g*, 10 min.) šaldant pašalinamas supernatantas. Ląstelės du kartus praplaunamos 40 ml šalto vandens: ląstelės resuspenduojamos, surenkamos centrifuguojant anksčiau minėtomis sąlygomis.
5. Užpilama 10 ml 10 % šalto glicerolio tirpalo ir ląstelės resuspenduojamos. Dar kartą centrifuguojama ir ląstelės suspenduojamos 1 ml 10 % šalto glicerolio tirpalo.
6. Elektroporacijai naudojamos ląstelės ir kiuvetės atšaldomos ledo vonioje.
7. Į 100 µl imliųjų ląstelių dedama 1 µg DNR ir inkubuojama kelias minutes ledo vonioje.
8. Ląstelių suspensija su DNR perpilama į atšaldytą kiuvetę. Ši įdedama į elektroporacijos aparatą, elektroporacija vykdoma esant 20 kV/cm įtampai. Elektros impulso trukmė 4–5 ms.
9. Po elektroporacijos nedelsiant ant ląstelių užpilama 200 µl TB terpės, suspensija perpilama į mėgintuvėlį.
10. Ląstelės inkubuojamos 30 min. 37 °C temperatūroje ir pasėjamos ant LB terpės su antibiotiku.

## 7.8. DNR fragmento įterpimas į DNR vektorių (klonavimas)

**Darbo tikslas** – įterpti DNR fragmentą į vektorių.

**Reagentai**

- restrikcijos endonukleazės, ligazė ir jų buferiniai tirpalai (THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- DNR gryninimo rinkinys (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)
- tinkamas klonavimui plazmidinis vektorius (pUC19, pTZ57R, pET21a ar kitokie)
- *E. coli* kamienas DH5α, BL21(DE3) arba kiti kamienai
- PEG 4000

**Aparatūra**

- termostatas
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- šaldiklis
- mikrocentrifuga

**Darbo eiga**

**DNR karpymas (restrikcija)**

Paprastai DNR karpoma laikantis gamintojo pateiktų rekomendacijų, optimalioje temperatūroje (dažniausiai 37 °C), tam tikrą laiką (10–60 min.). Fermentai inaktyvinami inkubuojant 10–20 min. 65–80 °C temperatūroje arba gryninant DNR. Tokiomis pačiomis restriktazėmis veikiamas DNR fragmentas ir plazmidinis vektorius. Po karpymo rekomenduojama DNR gryninimo rinkiniais išgryninti vektorių.

**Ligavimas**

Sukarpytos DNR fragmentai sujungiami laikantis gamintojo pateiktų rekomendacijų T4 DNR ligaze. Ligavimo mišinį dažniausiai sudaro: 10–20 µl DNR fragmento (priklauso nuo koncentracijos), 1–3 µl perkirpto plazmidinio vektoriaus (priklauso nuo koncentracijos), 4 µl ATP turinčio 10 × ligavimo buferinio tirpalo, 1 µl ligazės (5 U/µl), 4 µl PEG 4000 (jei liguojama bukais galais), iki 40 µl vandens. Reakcijos mišinys laikomas kambario temperatūroje vieną valandą, po to inkubuojamas 10 min. 65 °C temperatūroje ir atvėsinamas. O vėliau ligavimo mišiniais transformuojamos *E. coli* ląstelės.

DNR tirpalus, ligavimo mišinius laikyti –20 °C (arba –80 °) temperatūroje.

## 7.9. Atsitiktinė mutagenezė klaidinančios PGR metodu

**Darbo tikslas** – pakeisti DNR fragmento nukleotidų seką.

**Reagentai**

- *Taq* DNR polimerazė (5 U/µl, pvz., THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- 10 × *Taq* buferinis tirpalas su KCl
- 25 mM $MgCl_2$
- 1 M $MnCl_2$
- dNTP mišinys (po 2 mM kiekvieno dNTP)
- vanduo be nukleazių
- plazmidė su klonuotu genu
- PGR pradmenys, komplementarūs genų galams su įterptomis restriktazių kirpimo sekomis, kurios bus naudojamos klonavimui

**Aparatūra**

- termocikleris (33 pav.)
- termostatas
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- šaldiklis
- mikrocentrifuga

**33 pav.** Termocikleris

## Darbo eiga

### Reakcijos mišinio paruošimas

Trijuose mėgintuvėliuose paruošiami skirtingų koncentracijų $MnCl_2$ tirpalai: 0,1 mM, 1 mM, 10 mM. Reakcijos mišinį (50 µl) turi sudaryti:

| | | |
|---|---|---|
| 10×*Taq* buferinis tirpalas | 5 µl | |
| dNTP mišinys (2 mM kiekvieno) | 5 µl | 0,2 mM |
| tiesioginis pradmuo (100 µM) | 0,5 µl | 1 µM |
| atvirkštinis pradmuo (100 µM) | 0,5 µl | 1 µM |
| 25 mM $MgCl_2$ | 5 µl | 2,5 mM |
| DNR | 1–10 µl | 10 ng |
| *Taq* DNR polimerazė (5 U/µl) | 0,4 µl | 2 U |
| $MnCl_2$ | | 0,1–10 mM |
| $H_2O$ | iki 50 µl | |

Reakcijos mišinio įpilama į mėgintuvėlius, kurie prieš reakciją laikomi ledo vonioje.

### PGR pradmenų kūrimas

Paprastai pradmenys būna sudaryti iš 15–35 nukleotidų. Jie turi būti komplementarūs norimo padauginti DNR fragmento galams, be to, gali turėti įterptas restriktazių atpažinimo sekas, patogias tolesniam klonavimui. Optimalus GC kiekis turėtų būti 40–60 %, gerai, jei pradmuo 3´ gale turi 1 ar 2 G arba C nukleotidus. $T_m$ tarp dviejų pradmenų neturėtų skirtis daugiau nei 5 °C. $T_m$ pradmenims, kurių ilgis apie 20 nukleotidų, galima apskaičiuoti pagal formulę: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$, kur A, C, G, T – atitinkamų nukleotidų skaičius pradmenyje. Jei į pradmenį įtraukiama karpymui ir klonavimui reikalinga restrikcijos endonukleazės atpažinimo seka, pradmens 5´ gale prieš šias sekas reikėtų pridėti 2 ar 3 nukleotidus. Pradmenis galima užsakyti juos gaminančiose bendrovėse (SIGMA, METABION).

### Ciklinimo reakcija. Sukuriama PGR programa iš 30 ciklų:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 min., 94 °C, pradinė denatūracija | | | |
| 15–60 s* | 94 °C | denatūravimo | 30 ciklų |
| 15–60 s | 45–65 °C** | pradmenų prilydymo | |
| 1–2 min.*** | 72 °C | grandinės ilginimo | |
| 5 min., 72 °C, nebaigtų grandinės galų ilginimas | | | |

* priklauso nuo termociklerio gamintojo rekomendacijų.

** $T_a$ temperatūra priklauso nuo pradmenų lydymosi temperatūros $T_m$ ir turėtų būti 5 °C žemesnė, nei žemiausia apskaičiuota $T_m$ pradmenims.

*** laikas priklauso nuo gaunamo fragmento ilgio ir polimerazės greičio, pvz., *Taq* polimerazė mažesnį nei 2 kb DNR fragmentą prailgina per 1 min., ilgesniems fragmentams gauti reikėtų pridėti po 1 min/1 kb, *Pfu* polimerazė per 1 min. prailgina apie 0,5 kb ilgio fragmentus.

Mėgintuvėliai su paruoštais reakcijos mišiniais sudedami į termociklerį ir pradedama reakcija. Susidaręs PGR produktas patikrinamas elektroforezės metodu, gryninamas, karpomas restriktazėmis ir įterpiamas į ekspresijos vektorių.

## 7.10. Cheminė mutagenezė *in vitro*

**Darbo tikslas** – DNR fragmento mutagenezė cheminiais junginiais.

### Reagentai

- *Taq* DNR polimerazė (5 U/µl, pvz., THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- 10× *Taq* buferinis tirpalas su KCl
- 25 mM $MgCl_2$
- 1 M $MnCl_2$
- dNTP mišinys (2 mM kiekvieno dNTP)
- vanduo be nukleazių
- plazmidė su klonuotu genu
- PGR pradmenys, komplementarūs genų galams su įterptomis restriktazių kirpimo sekomis, kurios bus naudojamos klonavimui
- nitrito rūgštis (modifikuoja C, A ir G nukleotidus; 1,25 M natrio nitrito tirpinama 0,3 M Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,3)
- 15 M skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas (modifikuoja G ir A), 75 % hidrazino vandeninis tirpalas (modifikuoja C ir T)
- 7,5 M amonio acetato tirpalas
- 96 % etanolis

### Aparatūra

- termocikleris
- termostatas
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- šaldiklis
- mikrocentrifuga

### Darbo eiga

1. 20 µl (apie 1 µg/µl) plazmidinės DNR sumaišoma su 80 µl mutageno tirpalo ir inkubuojama 20 °C temperatūroje 1 val. Kas 15 min. reikia imti po 15 µl pavyzdžio.
2. Į pavyzdžius įpilti po 10 µl amonio acetato ir 600 µl etanolio ir 1 val. palikti –20 °C temperatūroje.
3. DNR nuosėdos centrifuguojamos (12 000 *g*, 5 min.), etanolis nupilamas, o nuosėdos ištirpinamos 20 µl distiliuoto vandens.
4. 1 µl taip paruoštos DNR naudojamas PGR reakcijai.

Reakcijos mišinį (50 µl) turi sudaryti:

| | | |
|---|---|---|
| 10 × *Taq* buferinis tirpalas | 5 µl | |
| dNTP mišinys (2 mM kiekvieno dNTP) | 5 µl | 0,2 mM |
| tiesioginis pradmuo (100 µM) | 0,5 µl | 1 µM |
| atvirkštinis pradmuo (100 µM) | 0,5 µl | 1 µM |
| 25 mM $MgCl_2$ | 5 µl | 2,5 mM |
| DNR | 1–10 µl | 10 ng |
| *Taq* DNR polimerazė (5 U/µl) | 1 µl | 1 U |
| $H_2O$ | iki 50 µl | |

Ciklinimo reakcija. Sukuriama PGR programa iš 30 ciklų:

| | | |
|---|---|---|
| 15–60 s | 94 °C | denatūravimo |
| 15–60 s | 45–65 °C | pradmenų prilydymo |
| 1–2 min. | 72 °C | grandinės ilginimo |

Susidaręs PGR produktas tikrinamas elektroforezės metodu, gryninamas, karpomas restriktazėmis ir įterpiamas į ekspresijos vektorių.

## 7.11. Mutagenezė ir rekombinacija PGR metodu

**Darbo tikslas** – sukurti geno mutantų biblioteką.

### Reagentai

- *Pfu* DNR polimerazė (5 U/µl, pvz., THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- 10 × buferinis tirpalas su $MgSO_4$
- dNTP mišinys
- vanduo be nukleazių
- plazmidė su klonuotu genu
- PGR pradmenys, komplementarūs genų galams su įterptomis restriktazių kirpimo sekomis, kurios bus naudojamos klonavimui, vidiniai pradmenys su pageidaujamais pakeitimais
- DNR gryninimo iš agarozės gelio rinkinys (pvz., GeneJET™ Gel Extraction Kit, THERMO FISHER SCIENTIFIC, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)

### Aparatūra

- termocikleris
- termostatas
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- šaldiklis
- mikrocentrifuga

### Darbo eiga

Atliekamos dvi PGR reakcijos:

1 – pradmenys A ir C,

2 – pradmenys B ir D.

50 µl PGR reakcijos mišinio sudėtis:

| | |
|---|---|
| 10 × *Pfu* buferinis tirpalas su $MgSO_4$ | 5 µl |
| dNTP mišinys (2 mM kiekvieno dNTP) | 5 µl |
| tiesioginis pradmuo (A arba B) | 1 µM |
| atvirkštinis pradmuo (C arba D) | 1 µM |
| DNR | 50 pg – 1 µg |
| *Pfu* DNR polimerazė | 1,25–2,5 U |
| $H_2O$ | iki 50 µl |

PGR programa tokia, kaip jau aprašyta anksčiau, tik polimerizacijos ciklas turėtų būti 2 min/kb.

| | | |
|---|---|---|
| 94 °C | 3 min. | 1 ciklas |
| 94 °C | 1 min. | 30 ciklų |
| 45–65 °C | 1 min. | |
| 72 °C | 2 min. | |
| 72 °C | 5 min. | 1 ciklas |

Po šio PGR ciklo atliekama DNR elektroforezė ir abu gauti fragmentai išpjaunami iš gelio ir išgryninami, kaip rekomenduoja gamintojas.

Antrajai PGR reikia:

- 10 µl fragmento AC ir 10 µl fragmento BD
- polimerazės buferinio tirpalo
- dNTP
- *Pfu* polimerazės, kaip ir pirmajam PGR ciklui
- pradmenų A ir D

Vykdoma antroji PGR. Jei po šios reakcijos susidaro labai mažai produkto, antrąją PGR reakciją galima pradėti neįdėjus jokių pradmenų (A ir D), o juos sudėti tik po 4 ar 5 ciklų.

Susidaręs PGR produktas gryninamas, karpomas restriktazėmis ir įterpiamas į ekspresijos vektorių.

## 7.12. Genų maišymas

**Darbo tikslas** – naudojant homologinius genus sukurti geno mutantų biblioteką.

**Reagentai**

- plazmidės su klonuotu genu
- DNazė ir jos buferinis tirpalas (DNase I, RNase-free (supplied with $MnCl_2$), THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- PGR reagentai
- pradmenys, komplementarūs geno galams

**Aparatūra**

- termostatai (15 °C ir 90 °C) arba termocikleris
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- šaldiklis
- mikrocentrifuga

**Darbo eiga**

1. Plazmidėse esantys genai, kurie bus maišomi, padauginami PGR metodu arba, jei yra galimybė, iškerpami iš plazmidės, gauti fragmentai išgryninami. Fragmentai sumaišomi santykiu 1:1. DNR kiekis turėtų būti ne mažesnis nei 1 µg.
2. DNR mišinys (45 µl) ir 5 µl 10 × DNazės buferinio tirpalo (100 mM Tris-HCl (pH 7,5, kai temperatūra 25 °C), 100 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) 5 min. inkubuojama 15 °C temperatūroje, po to įdedama 0,3 U DNazės ir karpoma 2 min.
3. DNazė inaktyvinama reakcijos mišinį kaitinant 10 min. 90 °C temperatūroje.
4. Fragmentų dydis nustatomas DNR elektroforezės metodu. DNR gryninama.
5. Fragmentai surenkami PGR metodu, tačiau į reakcijos mišinį nededama pradmenų.
6. Sukuriama PGR programa:

| | | |
|---|---|---|
| 94 °C | 3 min. | 1 ciklas |
| 94 °C | 1 min. | 40 ciklų |
| 55 °C | 1 min. | |
| 72 °C | 2 min. | |
| 72 °C | 5 min. | 1 ciklas |

1 µl šio reakcijos mišinio vėliau naudojama PGR iš 25 ciklų įdėjus pradmenis.

Toliau vykdoma DNR elektroforezė, susidarę fragmentai gryninami, karpomi ir įterpiami į plazmidinį vektorių (žr. kitus metodus).

## 7.13. Rekombinantinių baltymų biosintezės indukcija ir gryninimas

**Darbo tikslas** – išskirti rekombinantinį baltymą, turintį poliHis inkarą, iš *E. coli* ląstelių.

**Reagentai**

- sterilios agaro terpės
- sterilios skystos terpės

- *E. coli* kamienas DH5α, BL21(DE3) arba kiti kamienai, transformuoti su raiškos vektoriuose klonuotais genais
- Izopropiltiogalaktopiranozidas (IPTG)
- Tris-HCl
- imidazolas

**Aparatūra**

- termostatas
- Petri lėkštelės ir kolbos mikroorganizmams auginti
- pH-metras
- automatinės pipetės
- automatinių pipečių antgaliai
- mikromėgintuvėliai
- ledo vonia
- mikrocentrifuga
- chromatografas
- HiTrap™ chelating HP kolonėlė
- spektrofotometras
- ultragarsinis dezintegratorius

**Darbo eiga**

1. Į skystą terpę persėjamos vienos kolonijos ląstelės.
2. *E. coli* bakterijos auginamos kompleksinėje arba sintetinėje terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant per naktį (16–18 val.).
3. 250 µl kultūros perkeliama į 25 ml terpės. Bakterijų kiekis skystoje terpėje nustatomas spektrofotometriškai – matuojama 600 nm ilgio šviesos bangų sugertis, o kontrolei naudojama sterili terpė. Kultūra tinka, kai sugertis yra nuo 0,6 iki 1,3.
4. Rekombinantinių baltymų sintezei naudojamas induktorius, IPTG – 0,05–1 mM. Temperatūra 15–30 °C.
5. Po indukcijos ląstelės auginamos 4–20 valandų.
6. Ląstelės centrifuguojamos (3000 *g*, 15 min.), nusodintos ląstelės resuspenduojamos 5 ml 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 7,5) ir suardomos ultragarsu aušinant ledo vonioje.
7. Prieš gryninant ląstelių fragmentai pašalinami centrifuguojant (10 000 *g*, 30 min.).
8. Beląstelinis ekstraktas gryninamas vienu afininės chromatografijos metodu – naudojant nikelio chelatų sorbentą (pvz., 1 ml HiTrap™ chelating kolonėlę).
9. Kolonėlės iš anksto praplaunamos 50 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 7,5).
10. Visi neprikibę baltymai išplaunami tuo pačiu buferiniu tirpalu.
11. Baltymai, turintys 6 histidinų inkarą, išplaunami didinant imidazolo koncentraciją nuo 0 iki 0,5 M.

## 7.14. Antikūnų gryninimas afininės chromatografijos metodu

**Darbo tikslas** – sukoncentruoti ir išgryninti antikūnų preparatą naudojant afininės chromatografijos metodą.

**Reagentai**

- $(NH_4)_2SO_4$
- PBS buferinis tirpalas (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l $KH_2PO_4$, 1,5 g/l $Na_2HPO_4$ (pH 7,0–7,3)
- 0,1 M kalio citrato buferinis tirpalas (pH 3,0)
- 1 M Tris buferinis tirpalas (pH 9,0)

**Aparatūra**

- AKTA Purifier chromatografijos sistema

- 5 ml Protein A kolonėlė (GE HEALTHCARE)
- magnetinė maišyklė
- dializės maišeliai
- centrifuga
- ultrafiltravimo aparatas su 30 000 Da pralaidumo membrana

**Darbo eiga**

1. Antikūnų tirpalas (serumas) prieš afininę chromatografiją koncentruojamas ir dalinai gryninamas nusodinant amonio sulfatu.
2. Į ledo vonioje maišomą 30 ml antikūnų tirpalą įpilama amonio sulfato (iki 50 % sotumo tirpalo) ir laikoma 30 min. 4 °C temperatūroje, kad susidarytų nuosėdos.
3. Nuosėdos centrifuguojamos (8000 *g*, 20 min.), ištirpinamos 10–15 ml PBS buferinio tirpalo ir dializuojamos 4 °C temperatūroje 17–20 val.
4. 5 ml Protein A kolonėlė praplaunama PBS buferiniu tirpalu ir joje sorbuojamas antikūnų tirpalas.
5. Neprikibę baltymai išplaunami tuo pačiu buferiniu tirpalu, o sorbuoti antikūnai išplaunami 0,1 M citrato buferiniu tirpalu (pH 3,0).
6. Frakcijos renkamos po 0,5 ml. Kad antikūnai nedenatūruotų dėl labai rūgščios terpės, į mėgintuvelius iš anksto įpilama po 0,2 ml 1 M Tris buferinio tirpalo (pH 9,0).
7. Kolonėlė po antikūnų išplovimo nedelsiant praplaunama PBS buferiniu tirpalu. Frakcijos su antikūnais surenkamos ir koncentruojamos ultrafiltravimo metodu bei dializuojamos 17–20 val. 4 °C temperatūroje.

## 7.15. Imobilizacija ant silanu modifikuoto silikagelio

**Darbo tikslas** – modifikuoti silikagelį silanu, turinčiu aminogrupę, ir kaip rišiklį naudojant glutaro dialdehidą ant jo imobilizuoti baltymą.

**Reagentai**

- silikagelis (sferinis 0,035–0,045 mm, porų skersmuo 260–340 Å, FLUKA)
- 3-aminopropiltrietoksisilanas (APTS; FLUKA)
- glutaro dialdehidas
- distiliuotas vanduo
- 100 mM natrio fosfato buferinis tirpalas (pH 7,0)
- liofilizuotas fermentas
- 1 M metilamino tirpalas
- acetonas
- reakcijos mišinys fermento aktyvumui nustatyti

**Aparatūra**

- grįžtamasis šaldytuvas
- magnetinė maišyklė
- spektrofotometras
- centrifuga
- termostatuojama kratyklė

## Darbo eiga

Darbo schema

$Silikagelis\text{-}(Si–OH)_3 + (CH_3–CH_2–O)_3–Si–(CH_2)_3–NH_2$

↓silanizacija 90 °C, 1 val.

$Silikagelis–(Si–O)_3–Si–(CH_2)_3–NH_2 + (CH_3–CH_2–OH)_3$

$Silikagelis–(Si–O)_3–Si–(CH_2)_3–NH_2 + OHC–(CH_2)_3–CHO$

↓aktyvacija 30 °C, 0,5 val.

$Silikagelis–(Si–O)_3–Si–(CH_2)_3–N=CH–(CH_2)_3–CHO + H_2O$

$Silikagelis–(Si–O)_3–Si–(CH_2)_3–N=CH–(CH_2)_3–CHO + NH_2–baltymas$

↓imobilizacija 30 °C, 0,5 val.

$Silikagelis–(Si–O)_3–Si–(CH_2)_3–N=CH–(CH_2)_3–CH=N–baltymas + H_2O$

1. 3 g silikagelio supilama į kolbą su grįžtamuoju šaldytuvu, įpilama 20 ml 1 % APTS tirpalo (pH 3,5). Kolba verdančio vandens vonioje kaitinama nuolat pamaišant 1 val.
2. Modifikuotas silikagelis praplaunamas 500 ml distiliuoto vandens, po to 50 ml acetono ir vėl kelis kartus praplaunamas distiliuotu vandeniu.
3. Silikagelis suspenduojamas vandenyje iki 10 ml. 0,05 ml tokios suspensijos yra apie 15 mg modifikuoto silikagelio.
4. Suspensija laikoma 4 °C temperatūroje.
5. Liofilizuotas fermentas ištirpinamas 100 mM natrio fosfato buferiniame tirpale (pH 7,0) iki 15 mg/ml baltymo koncentracijos. Patikrinama baltymo koncentracija ir nustatomas fermento aktyvumas.
6. 0,25 ml silikagelio suspensijos praplaunama 100 mM natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,0), pridedama 0,005 ml 5 % glutaro dialdehido vandeninio tirpalo ir aktyvuojama 30 min. 30 °C temperatūroje maišant 1000 aps./min. greičiu kratyklėje.
7. Laisvas glutaro dialdehidas pašalinamas aktyvintą silikagelį kelis kartus praplovus 1–2 ml 100 mM natrio fosfato buferinio tirpalo (pH 7,0).
8. Suspensija praskiedžiama buferiniu tirpalu iki 0,25 ml ir pridedama 0,1 ml fermento tirpalo (koncentracija 15 mg/ml).
9. Imobilizacijai imama 10 µg fermento vienam mg silikagelio. Esant kitokiai fermento koncentracijai, svarbu išlaikyti tokį patį baltymo ir silikagelio santykį.

10. Fermentas imobilizuojamas 30 min. 30 °C temperatūroje maišant 1000 aps./min. greičiu kratyklėje.
11. Reakcija sustabdoma pridėjus į reakcijos mišinį 0,02 ml 1 M metilamino tirpalo.
12. Silikagelis su imobilizuotu fermentu kelis kartus praplaunamas 1–2 ml 100 mM natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,0) ir įpilama buferinio tirpalo iki 0,25 ml.
13. Suspensija laikoma 4 °C temperatūroje.

**Imobilizuoto fermento aktyvumo ir imobilizacijos efektyvumo įvertinimas**

Intensyviai maišant iš suspensijos paimama 0,01 ml imobilizuoto fermento ir įpilama 1 ml reakcijos mišinio, skirto fermento aktyvumui nustatyti. Reakcija vykdoma 30 °C temperatūroje 1–5 min. intensyviai reakcijos mišinį maišant termostatuojamoje kratyklėje. Pavyzdys su reakcijos mišiniu centrifuguojamas (5000 *g*, 7–10 s), supernatantas nupilamas ir matuojama jo sugertis tinkamoje srityje, kuri priklauso nuo tiriamo fermento, substrato ir susidariusio produkto. Kontrolei naudojamas reakcijos mišinys be fermento.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{aktyvumas (vienetai/ml)} = A \times V \times 1000/t \times n \times L \times \varepsilon,$$

čia:
$A$ – sugerties pokytis *xx* nm srityje,
$\varepsilon$ – ekstinkcija ($M^{-1} \times cm^{-1}$),
$L$ – kiuvetės storis (cm),
$V$ – reakcijos mišinio tūris (ml),
$t$ – reakcijos laikas (min.),
$n$ – imobilizuoto fermento suspensijos tūris (ml).

Imobilizacijos efektyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{efektyvumas (\%)} = A_1 \times V_1 \times 100/A_2 \times V_2,$$

čia:
$A_1$ – imobilizuoto fermento suspensijos aktyvumas (vienetai/ml),
$V_1$ – imobilizuoto fermento suspensijos tūris (ml),
$A_2$ – natūraliosios struktūros fermento aktyvumas (vienetai/ml),
$V_2$ – imobilizacijai paimto fermento tūris (ml).

*Visos iliustracijos autorių*

# Literatūra

Ausubel F. M. et al. (eds.), *Short protocols in molecular biology*, 4 ed., John Willey & Sons, 1999.

Bonner P. L. R., *Protein purification*, Taylor & Francis, 2007.

Burlage R. S. et al. (eds.), *Techniques in microbial ecology*, Oxford University Press, 1998.

Cao L., *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design*, Wiley-VCH, 2005.

Cold Spring Harbor Protocols (http://cshprotocols.cshlp.org).

Lutz S., Bornscheuer U. T. (eds.), *Protein engineering handbook*, vol. 1–2, Wiley-VCH, 2009.

McNeil B., Harvey L. M. (eds.), *Practical fermentation technology*, John Wiley & Sons, 2008.

Sambrook J., Russell D. W., *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3 ed., vol. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Scopes R. K., *Protein purification: principles and practice*, Springer, 1994.

Virtualūs įrankiai (http://www.fermentas.lt/lt/produktu-vartotojams/eksperimentu-planavimui).

Yeh W.-K. et al. (eds.), *Enzyme technologies: metagenomics, evolution, biocatalysis and biosynthesis*, John Wiley & Sons, 2010.

# Kai kurios sąvokos

**Aeracija** – prisotinimas oro.

**Alosteriniai fermentai** – fermentai, kurių katalizuojamos reakcijos greitis reguliuojamas mažos molekulinės masės junginiais, paprastai besirišančiais su tam tikra fermento struktūros vieta, nesutampančia su aktyviuoju centru.

**Atviro skaitymo rėmelis** – DNR segmentas su dviem tame pačiame skaitymo rėmelyje esančiais STOP kodonais kraštuose, neturintis STOP kodono viduryje.

**Buferinis tirpalas** – tirpalas, palaikantis tam tikrą terpės pH.

**Chaotropiniai junginiai** – junginiai, gerinantys baltymų ir kitų makromolekulių tirpumą. Paprastai chaotropiniai junginiai veikia vandens struktūrą, bet neardo (nedenatūruoja) makromolekulės struktūros.

**Chromatofokusavimas** – baltymų skirstymas keičiant eliuavimo buferinio tirpalo pH.

**Denatūracija** – biopolimerų, pvz., baltymų, natūralių savybių praradimas dėl aukštos temperatūros, rūgščių, šarmų, organinių tirpiklių poveikio.

**Deoksiribonuklеazė** (DNazė) katalizuoja dvigrandės ir viengrandės DNR skaldymą, skelia molekulės viduryje, susidaro nukleozidų 5´- arba 3´-fosfatai ir 5´- arba 3´-fosfooligonukleotidai.

**Diferenciacija** – ląstelių prisitaikymas tam tikroms funkcijoms atlikti, todėl jos ima skirtis nuo kitų ląstelių.

**DNR ligazė** sujungia, „susiuva“ dvi nutrauktas dvigrandės DNR grandines, kai trūkiai yra komplementariose grandinėse.

**Domenas** – baltymo dalis, turinti savitą struktūrą.

**Eliuentas** – tirpalas ar tirpiklis, kuriuo išplaunamos medžiagos, pvz., iš chromatografinės kolonėlės.

**Emulsija** – dispersinė sistema iš smulkių skysčio lašelių, pasklidusių kitame skystyje.

**Emulsiklis** – medžiaga, padedanti susidaryti emulsijai ir ją stabilizuojanti.

**Fermento aktyvusis centras** – fermento molekulės fragmentas, prie kurio jungiasi substratas (junginys, kuris pakinta veikiamas fermento).

**Genų raiška** – informacijos, esančios DNR molekulėje, nuskaitymas (RNR ar baltymo sintezė).

**Glikozilinimas** – cheminių junginių modifikavimas angliavandenių molekulėmis.

**Hidroliziniai fermentai** – fermentai, kurių vienas iš substratų yra vandens molekulė.

**Imunoglobulinų Fc sritis** – imunoglobulinų sritis, kuria jie rišasi su juos nešančia ląstele.

**Izoelektrinis fokusavimas** – baltymų skirstymas dėl pH gradiento.

**Izoelektrinis taškas** – toks terpės pH, kai bendras baltymo krūvis lygus nuliui.

**Joninė jėga** – elektrinio lauko, kurį sukelia jonai tirpaluose, stiprumo (intensyvumo) matas.

**Kodonas** – iRNR trijų gretimų nukleotidų seka, koduojanti vieną aminorūgštį.

**Kofaktorius** – mažos molekulinės masės organinis arba neorganinis junginys, nuo kurio priklauso fermento aktyvumas.

**Kompartmentalizacija** – visumos dalies atskyrimas, izoliavimas nuo kitų dalių.

**Ligavimas** – kelių DNR arba RNR molekulių „susiuvimas“ į vieną molekulę fermentais (DNR arba RNR ligazėmis).

**Liofilizacija** – užšaldytų biologinės kilmės produktų, pvz., kraujo plazmos, audinių nuopjovų, baltymų ar DNR tirpalų, džiovinimas vakuume.

**Mejozė** – eukariotinių ląstelių dalijimosi būdas, vykstantis dviem etapais. Pirmojo ląstelės dalijimosi metu chromosomų skaičius sumažėja dvigubai. Antrojo dalijimosi metu dalijasi jau dvi ląstelės ir susidaro keturios ląstelės. Antrojo dalijimosi metu chromosomų skaičius nesikeičia.

**Metagenomas** – genomų visuma, pvz., žarnyno ar dirvožemio mikroorganizmų metagenomas.

**Mitozė** – eukariotinės ląstelės branduolio dalijimosi būdas, kurio metu chromosomų skaičius nekinta.

**Monokloniniai imunoglobulinai** – imunoglobulinai, atpažįstantys tik vieną konkretų antigeną.

**Organelės** – ląstelės struktūriniai komponentai (pagrindiniai: endoplazminis tinklas, ribosomos, Golgi kompleksas, mitochondrijos, lizosomos, peroksisomos, centriolės, citoplazmos mikrovamzdeliai, filamentai, plastidės).

**Peptidazės** – fermentai, atskeliantys galines baltymo aminorūgštis.

**Peptonas** – nevisiškos baltymo hidrolizės produktas.

**Poliklonininiai imunoglobulinai** – imunoglobulinai, atpažįstantys, pvz., vieną baltymą, bet skirtingose vietose.

**Producentas** – mikroorganizmas, efektyviai gaminantis tikslinį produktą.

**Proteinazės** – fermentai, katalizuojantys peptidinių ryšių hidrolizę tik baltymo arba peptido grandinės viduryje.

**Proteoliziniai fermentai** – baltymus skaidantys fermentai.

**Rekombinantinis baltymas** – genų inžinerijos būdu gautas baltymas.

**Replikacija** – DNR dvigubėjimas.

**Sekvenavimas** (sekoskaita) – baltymo aminorūgščių arba nukleorūgščių nukleotidų sekos nustatymas.

**Suspensija** – dispersinė sistema, sudaryta iš smulkių kietojo kūno dalelių, pasiskirsčiusių skystyje.

**Telomeras** – specializuota struktūra, esanti eukariotų chromosomų galuose.

**Transkripcija** – informacijos, esančios DNR molekulėje, nuskaitymas – RNR sintezė.

**Transliacija** – informacijos, esančios RNR molekulėje, nuskaitymas – baltymų biosintezė.

**Virionas** – subrendusi viruso dalelė arba pavienis virusas.

# Priedai

**1P lentelė.** Amonio sulfato kiekis g/l, reikalingas tam tikro sotumo (horizontaliai – galutinė koncentracija) tirpalams paruošti turint pradinės koncentracijos (vertikaliai) tirpalą.

| % | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 33 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 56 | 84 | 114 | 144 | 176 | 196 | 209 | 243 | 277 | 313 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 610 | 662 | 713 |
| 10 | | 28 | 57 | 86 | 118 | 137 | 190 | 183 | 216 | 251 | 288 | 326 | 365 | 406 | 449 | 494 | 540 | 592 | 640 |
| 15 | | | 28 | 57 | 88 | 107 | 120 | 153 | 185 | 220 | 256 | 294 | 333 | 373 | 415 | 459 | 506 | 556 | 605 |
| 20 | | | | 29 | 59 | 78 | 91 | 123 | 155 | 189 | 225 | 262 | 300 | 340 | 382 | 424 | 471 | 520 | 569 |
| 25 | | | | | 30 | 49 | 61 | 93 | 125 | 158 | 193 | 230 | 267 | 307 | 348 | 390 | 436 | 485 | 533 |
| 30 | | | | | | 19 | 30 | 62 | 94 | 127 | 162 | 198 | 235 | 273 | 314 | 356 | 401 | 449 | 496 |
| 33 | | | | | | | 12 | 43 | 74 | 107 | 142 | 177 | 214 | 252 | 292 | 333 | 378 | 426 | 472 |
| 35 | | | | | | | | 31 | 63 | 94 | 129 | 164 | 200 | 238 | 278 | 319 | 364 | 411 | 457 |
| 40 | | | | | | | | | 31 | 63 | 97 | 132 | 168 | 205 | 245 | 285 | 328 | 375 | 420 |
| 45 | | | | | | | | | | 32 | 65 | 99 | 134 | 171 | 210 | 250 | 293 | 339 | 383 |
| 50 | | | | | | | | | | | 33 | 66 | 101 | 137 | 176 | 214 | 256 | 302 | 345 |
| 55 | | | | | | | | | | | | 33 | 67 | 103 | 141 | 179 | 220 | 264 | 307 |
| 60 | | | | | | | | | | | | | 34 | 69 | 105 | 143 | 183 | 227 | 269 |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | 34 | 70 | 107 | 147 | 190 | 232 |
| 70 | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 72 | 110 | 153 | 194 |
| 75 | | | | | | | | | | | | | | | | 36 | 74 | 115 | 155 |
| 80 | | | | | | | | | | | | | | | | | 38 | 77 | 117 |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 39 | 77 |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 38 |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**2P lentelė.** Buferiniai tirpalai jonų mainų chromatografijai.

| **Buferiniai tirpalai katijonų mainų chromatografijai** | | | |
|---|---|---|---|
| pH intervalas | Junginys | Koncentracija (mM) | Konkuruojantis jonas |
| 1,5–2,5 | maleino rūgštis | 20 | $Na^+$ |
| 2,38–3,38 | malono rūgštis | 20 | $Na^+/Li^+$ |
| 2,63–3,63 | citrinų rūgštis | 20 | $Na^+$ |
| 3,6–4,3 | pieno rūgštis | 50 | $Na^+$ |
| 3,8–4,3 | skruzdžių rūgštis | 50 | $Na^+/Li^+$ |
| 4,3–4,8 | butano dirūgštis | 50 | $Na^+$ |
| 4,8–5,2 | acto rūgštis | 50 | $Na^+/Li^+$ |
| 5,0–6,0 | malono rūgštis | 50 | $Na^+/Li^+$ |
| 6,7–7,6 | fosfatai | 50 | $Na^+$ |
| 7,6–8,2 | HEPES | 50 | $Na^+/Li^+$ |
| 8,2–8,7 | BICINE | 50 | $Na^+$ |
| **Buferiniai tirpalai anijonų mainų chromatografijai** | | | |
| 4,5–5,0 | *N*-metilpiperazinas | 20 | $Cl^-$ |
| 5,0–6,5 | piperazinas | 20 | $Cl^-/HCOO^-$ |
| 5,5–6,0 | L-histidinas | 20 | $Cl^-$ |
| 5,8–6,4 | bis-tris | 20 | $Cl^-$ |
| 6,4–7,3 | bis-tris propanas | 20 | $Cl^-$ |
| 7,3–7,7 | trietanolaminas | 20 | $Cl^-/CH_3COO^-$ |
| 7,8–8,0 | tris | 20 | $Cl^-$ |
| 8,0–8,5 | *N*-metil-dietanolaminas | 50 | $Cl^-/SO_2^-/CH_3COO^-$ |
| 8,4–8,8 | dietanolaminas | 20 (pH 8,4), 50 (pH 8,8) | $Cl^-$ |
| 8,5–9,0 | 1,3-diaminopropanas | 20 | $Cl^-$ |
| 9,0–9,5 | etanolaminas | 20 | $Cl^-$ |
| 9,5–9,8 | piperazinas | 20 | $Cl^-$ |
| 9,8–10,3 | 1,3-diaminopropanas | 20 | $Cl^-$ |
| 10,6–11,6 | piperidinas | 20 | $Cl^-$ |
| 11,8–12,0 | fosfatai | 20 | $Cl^-$ |

**3P lentelė.** Baltymo gryninimo eiga.

| Eilės Nr. | Gryninimo stadija | Bendras tūris, ml | Bendras akt., vnt. | Bendras baltymas, mg | Specifinis akt., u/mg | Išgryninimo laipsnis | Išeiga, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | beląstelinis ekstraktas | | | | | | |
| 2 | frakcionavimas amonio sulfatu | | | | | | |
| 3 | chromatografija xx | | | | | | |
| 4 | chromatografija xx | | | | | | |

# Šešiakojo roboto judėjimo tyrimas

Tomas Luneckas

# Turinys

Įvadas ..... 127

1. Tyrimų aktualumas ..... 128

2. Ką turi išmanyti robotų kūrėjas ..... 129

3. Tyrimo tikslas ir uždaviniai ..... 130

4. Įranga ir priemonės ..... 130

5. Žingsniuojančių robotų konstrukcija ..... 131
   5.1. Kojų konfigūracija ir stabilumas ..... 131
   5.2. Žingsniuojančių robotų tipai ..... 132
   5.3. Žingsniuojančių robotų judėjimo optimizavimo metodai ..... 137
   5.4. Šešiakojų robotų rūšys ..... 137

6. Roboto kūrimas ..... 139
   6.1. Roboto konstrukcijos parinkimas ..... 139
   6.2. Valdymo schemos sudarymas ..... 141
   6.3. Vienos kojos atvirkštinės kinematikos uždavinys ..... 142
   6.4. Geometrinis atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendimo metodas ..... 145
   6.5. Servomechanizmų valdymo būdai ..... 146

7. Roboto judėjimo ypatybių tyrimas ..... 148
   7.1. Kompiuterinio roboto modelio tyrimas ..... 148
   7.2. Fizinio roboto modelio judėjimo tyrimas ..... 150

8. Roboto modelio tobulinimas ..... 157
   8.1. Roboto korpuso kinematikos skaičiavimai ..... 158
   8.2. Pėdų trajektorijų generavimas ..... 161
   8.3. Roboto modeliavimas *MATLAB* ..... 163

9. O kas toliau? . . . . . 165

Literatūra . . . . . 166

Kai kurios sąvokos. . . . . 167

# Įvadas

Žodį „robotas“ pirmą kartą paminėjo čekų rašytojas Karelas Čapekas pjesėje „Universalūs Rosumo robotai“ 1920 m. Šis žodis kilęs iš čekų kalbos žodžio „robota“, reiškiančio – „labai sunkus, vergiškas darbas“.

Robotika yra labai jauna, sparčiai besivystanti mokslo ir technikos šaka. Robotai tampa vis sudėtingesni ir tobulesni, todėl atsiranda vis daugiau jų taikymo sričių. Sparčiausiai tobulinami pramoniniai, mobilieji (ypač humanoidai) ir įvairūs buitiniai robotai.

Mobiliųjų robotų tyrimai yra labai svarbūs, nes tokie robotai nėra „įkalinti“ nuolatinėje darbo vietoje. Dauguma mobiliųjų robotų turi ratus. Jų konstrukcija labai paprasta (todėl jie pigūs) ir juos nesudėtinga valdyti. Ratuotiems robotams, kad jie galėtų dirbti, reikia gana lygaus paviršiaus. Ši sąlyga tenkinama, pavyzdžiui, gamykloje. Tačiau akmeninga ar kalnuota vietovė visiškai netinka robotams su ratais. Todėl labai svarbu, kad robotai judėdami sugebėtų prisitaikyti prie paviršiaus nelygumų. Vaikštantys robotai gali judėti daug nelygesniu paviršiumi už važinėjančius ir lengviau prisitaikyti prie jo. Nepažįstamu paviršiumi einančio roboto valdymas sudėtingas, todėl juos suprojektuoti ir pagaminti gana sunku. Tačiau dabartiniai maži ir galingi bei gana lengvai programuojami mikroprocesoriai gali valdyti tokias sudėtingas sistemas.

# 1. Tyrimų aktualumas

Robotai, daugeliu atveju galintys atlikti darbus geriau, pigiau, greičiau už žmogų,ypač naudingi darbams neprieinamose vietose. Tačiau iki šiol robotai dar nepasiekė net pačių primityviausių gyvybės formų išsivystymo lygio. Siekiant jų tobulumo reikia atlikti dar daug tyrimų. Robotų užduotys yra labai įvairios, taigi jie turi mokėti judėti labai skirtingais paviršiais, prisitaikyti prie aplinkos, teisingai nuspręsti, kaip judėti (ką daryti) susidarius keblioms situacijoms. Dėl galimybės keisti darbo aplinką vis labiau plinta mobilūs robotai, todėl jų tyrimai tampa vis aktualesni.

Mobilūs robotai su ratais negali lipti laiptais, važiuoti per nuolaužas, dideles duobes. Kitaip tariant, važinėjantys robotai gali dirbti tik ten, kur paviršius sąlyginai lygus. Dėl šių priežasčių juos ne visur galima naudoti. Visų šių trūkumų neturi žingsniuojantys robotai. Jau šiuo metu daugelis žingsniuojančių robotų geba patenkinamai judėti nelygiu pagrindu. Tačiau dar nesukurtas žingsniuojantis robotas, galintis laisvai judėti bet kokiu paviršiumi. Nors tokie robotai yra kur kas sudėtingesni nei važinėjantys tiek konstrukcijos, tiek valdymo požiūriu, jų vystymas yra itin svarbus robotikai. Nes būtent žingsniuojantys robotai galės geriausiai prisitaikyti prie žmonių arba patekti į tokią aplinką, į kurią nei žmogus, nei važinėjantis robotas patekti negali, – pvz., į griuvėsius, nepravažiuojamas mūsų planetos vietas, netgi kai kurias povandenines ar kitų planetų vietoves.

Vienos svarbiausių žingsniuojančių robotų tyrimo krypčių yra jų prisitaikymo prie įvairių paviršių metodų kūrimas bei tobulinimas. Žingsniuojantis robotas turi mokėti atpažinti paviršių, kuriuo eina, – tai užtikrina jo judėjimo stabilumą ir greitį bet kokiomis sąlygomis. Kai žingsniuojantys robotai mokės gerai prisitaikyti prie įvairių paviršių, o paprasčiau sakant, kai jie bus išmokyti laisvai judėti bet kokiu pagrindu, labai tikėtina, kad robotų ratus pakeis kojos.

# 2. Ką turi išmanyti robotų kūrėjas

Robotika susijusi su mechanika, matematika, elektronika, programavimu. Robotą paprastai kuria kelių žmonių komanda ir nors dažniausiai kiekvienas jos narys rūpinasi savo sritimi, tačiau robotikos specialistui tenka daug ką išmanyti. Robotų kūrėjui būtinas erdvinis mąstymas – jis turi gerai įsivaizduoti roboto judesius erdvėje, nes juos reikia numatyti iš anksto, ir suprasti, kuris vykdiklis kaip turi pasisukti, kad konkreti galūnė atliktų reikiamą judesį. Neretai tenka numatyti kelių galūnių sinchronizuotus judesius.

Robotų matematiniam aprašymui būtina išmanyti kinematiką. Tai pagrindinis dalykas, su kuriuo reikėtų susipažinti pradedant nagrinėti robotų judesius. Sprendžiami du svarbiausi uždaviniai: tiesioginės kinematikos (angl. *Forward kinematics*)[1] uždavinys, kai žinomos roboto vykdiklių padėtys ir reikia apskaičiuoti jo galūnės erdvinę padėtį roboto korpuso koordinačių sistemoje, bei priešingas, atvirkštinės kinematikos (angl. *Inverse kinematics*)[2] uždavinys, – šiuo atveju žinoma roboto galūnės padėtis korpuso koordinačių sistemoje ir reikia apskaičiuoti, kokioje padėtyje turi būti kiekvienas roboto vykdiklis, kad galūnė užimtų reikiamą padėtį. Šis uždavinys robotikoje taikomas labai dažnai ir yra kur kas sudėtingesnis už pirmąjį uždavinį. Galimi atvejai, kai atvirkštinės kinematikos uždavinys yra neišsprendžiamas ir labai dažnai pasitaiko, kai jis turi kelis sprendinius. Taip pat pageidautina mokėti apskaičiuoti, pvz., mechanines jėgas, sukimo momentus.

Kuriant roboto valdymo sistemą neišvengiamai susiduriama su elektronika: reikia išmanyti ne tik skirtingų elektronikos komponentų funkcijas, bet ir mokėti iš jų sudaryti elektros grandines, ieškoti elektros grandinių klaidų naudojant multimetrą ar oscilografą. Taigi būtina įvaldyti paprasčiausius elektros grandinių analizės metodus. Prie elektronikos žinių priskirtinos ir žinios apie skirtingus vykdiklius ir jų valdymo būdus.

Retai kurį robotą šiais laikais valdo ne programa, todėl mokėjimas programuoti yra tiesiog privalomas. Netgi kuriant neautonominį (žmogaus valdomą) robotą dažniausiai reikia sukurti jo valdymo programą. Taigi reikalingi geri, ypač mikroprocesorių, programavimo įgūdžiai.

[1] http://www.learnaboutrobots.com/forwardKinematics.htm

[2] http://www.learnaboutrobots.com/inverseKinematics.htm

# 3. Tyrimo tikslas ir uždaviniai

**Darbo tikslas** – sukonstruoti šešiakojį robotą ir ištirti jo judėjimo ypatybes.

**Pirmasis uždavinys** – sukurti ir išbandyti šešiakojo roboto prisitaikymo prie nelygaus paviršiaus metodą.

**Antrasis uždavinys** – sukurti šešiakojo roboto kompiuterinį modelį ir ištirti judėjimo įvairiais paviršiais ypatybes.

**Trečiasis uždavinys** – sukurti šešiakojį robotą ir palyginti jo ir jo kompiuterinio modelio judėjimo ypatybes.

# 4. Įranga ir priemonės

Tyrimui sukonstruosime šešiakojį robotą – toliau išvardytos reikalingos priemonės ir įranga tokiam darbui atlikti.

Visų pirma, reikalingas multimetras – paprasčiausia priemonė elektros grandinių patikrai ir analizei. Elektriniams signalams tikrinti pravartu turėti oscilografą. Jis gerokai palengvina tiek elektros grandinių, tiek programavimo klaidų paiešką (pvz., juo galima stebėti valdymo impulsus). Taip pat reikia turėti mikroprocesorių programuotuvą. Roboto erdviniam modeliui braižyti reikalinga 3D braižymo programa (pvz., *AutoCAD*, *SolidWorks*). Braižomas trimatis roboto vaizdas ir visų reikiamų dalių dvimatės išklotinės, pagal kurias iš pasirinktos medžiagos (aliuminio, plastiko, anglies pluošto ar kt.) išpjaunamos (pvz., lazeriu) roboto dalys.

Roboto matematinis modelis yra tiesiog daugybė formulių, kurios apibūdina robotą (jo kinematiką, dinamiką ir kita), todėl naudinga roboto matematinį modelį paversti kompiuteriniu. Šiam tikslui naudojama programa *MATLAB*. Roboto kompiuterinį modelį ir jo brėžinį, nubraižytą programa *SolidWorks*, galima susieti ir tada *SolidWorks* roboto brėžinys tampa *MATLAB* modelio vaizdu.

Robotui valdyti reikalingas valdiklis. Dažniausiai robotams valdyti naudojamas mikroprocesorius. Mikroprocesoriaus programai rašyti ir testuoti reikalinga programinė įranga. Programuojant *Atmel* mikroprocesorius galima naudoti programą *AVR Studio* (nemokama), kurią pasitelkus galima rašyti, testuoti, kompiliuoti ir įrašinėti programas, taip pat galima naudoti ir *WinAVR*, tačiau ji negali patikrinti rašomos programos. Iš mokamos programinės įrangos vieni iš didžiausių yra *IAR* bei *KEIL* bendrovių programų paketai.

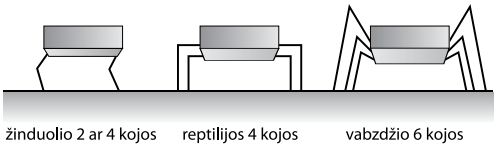
# 5. Žingsniuojančių robotų konstrukcija

Nors vaikštantys robotai yra lėtesni ir naudoja daugiau energijos, bet jie kliūtis įveikia lengviau negu važinėjantys robotai. Žingsniuojantis robotas gali peržengti duobę ar gilų plyšį žemėje, jei tik jo žingsnio plotis yra didesnis už kliūties plotį, be to, sąveikauti su aplinkos daiktais. Būtent tokių robotų gebėjimas judėti nelygiu paviršiumi ir patraukė mokslininkų dėmesį. Robotas gali stabiliai eiti nelygiu paviršiumi, jei jo judesiai teisingi ir sklandūs, todėl tai – svarbiausia problema, kurią reikia išspręsti kuriant žingsniuojančio roboto valdymo sistemą. Žingsniuojančio roboto trūkumas yra didokas suvartojamos energijos kiekis, jo konstrukcijos ir valdymo sudėtingumas. Roboto koja, turinti keletą laisvės laipsnių, turi sugebėti palaikyti dalį roboto svorio ir iškelti jį aukštyn ar nuleisti žemyn. Robotas yra manevringas, jei koja turi pakankamai laisvės laipsnių tam, kad perduotų jėgą į skirtingas puses [1].

Pagrindinis žingsniuojančio roboto valdymo uždavinys – generuoti teisingą kojos judesį ir tuo pat metu užtikrinti, kad kojų judesiai būtų gana sklandūs ir jos galėtų prisitaikyti prie paviršiaus, kuriuo eina, bei užtikrinti roboto stabilumą.

## 5.1. Kojų konfigūracija ir stabilumas

Norint kurti žingsniuojančius robotus reikia išanalizuoti, kaip vaikšto gyvūnai. Vabzdžiai turi šešias ir daugiau kojų. Vabzdžiai ir vorai vaikščioti geba tik gimę ar išsiritę. Kai kurie žinduoliai turi keturias kojas, kai kurie iš jų ištobulino sugebėjimą vaikščioti tik dviem kojomis, o žmogaus vestibulinis aparatas išsivystė taip gerai, kad jis gali šokinėti ir viena koja.




**1 pav.** Įvairių gyvūnų kojų išdėstymas.

Žinduoliai su keturiomis kojomis iš pradžių nemoka vaikščioti, tačiau nedaug laiko reikia, kol jie išmoksta atsistoti, o vėliau ir vaikščioti. Tai gali trukti nuo minučių iki valandų. Kūdikiui išmokti vaikščioti reikia kelių mėnesių, ir dar daugiau laiko praeina, kol jis išmoksta bėgioti, šokinėti ar stovėti ant vienos kojos. Gyvūnui, turinčiam tris kojas, būdinga statiška stabili stovėsena, nes jo masės centras yra trikojo viduje. Pusiausvyros palaikymas nereikalauja jokio judesio.

Robotui reikia mažiausiai šešių kojų, kad jis galėtų judėti ir palaikyti statiškai sta-

bilią būseną. Tik tokiu atveju galima trikojė eisena, kurios metu trys kojos nuolat liečia paviršių. Žingsniuojančio roboto kojai reikia mažiausiai dviejų laisvės laipsnių, kad jis ją pakeltų ir perkeltų pirmyn. Dažniausias variantas yra trijų laisvės laipsnių koja, atliekanti sudėtingesnius judesius. Naujausi sėkmingi dvikojų žingsniuojančių robotų tyrimai suteikė ketvirtą laisvės laipsnį – pėdos lankstui. Atitinkamai pakreipiant pėdos padą sudaromas geresnis kontaktas su paviršiumi. Kitaip tariant, didesnis roboto kojos laisvės laipsnių skaičius padidina roboto manevringumą ir skirtingų roboto eisenų skaičių, todėl eidamas jis gali geriau prisitaikyti prie nelygaus paviršiaus. Papildomi kojų lankstai ir vykdikliai reikalauja papildomos energijos ir sudėtingesnio valdymo, padidina kojų masę, o tai padidina esamų vykdiklių apkrovas ir energijos sąnaudas. Daugiakojų robotų kojų judesių koordinavimas ir eisenos valdymas konstruktoriui sukelia įvairių rūpesčių, pvz., kaip valdyti kiekvienos kojos judesius, kad robotas eitų stabiliai ir greitai.

Galimų eisenų skaičius priklauso nuo roboto kojų skaičiaus. Eisena yra kojų pakėlimo ir nuleidimo veiksmų seka. Žingsniuojančiam robotui, turinčiam $k$ kojų, didžiausias galimų veiksmų skaičius $N$ yra toks: $N = (2k - 1)!$ Dvikojui ($k = 2$) žingsniuojančiam robotui galimų veiksmų skaičius $N = (2 \cdot 2 - 1)! = 3! = 6$. Šie šeši skirtingi veiksmai yra tokie:

- pakelti dešinę koją;
- pakelti kairę koją;
- nuleisti dešinę koją;
- nuleisti kairę koją;
- pakelti abi kojas kartu;
- nuleisti abi kojas kartu.

## 5.2. Žingsniuojančių robotų tipai

Žingsniuojančius robotus galima sugrupuoti pagal kojų skaičių, pradedant viena ir baigiant begalybe. Dažniausiai kuriami dvikojai (*angl. bipedal*), keturkojai (*angl. quadruped*) ir šešiakojai (*angl. hexapod*) robotai. Daugiausia dėmesio pastaruoju metu sulaukia dvikojai robotai, nes jie savo išvaizda panašūs į žmones ir jiems būtų kur kas lengviau prisitaikyti prie žmogaus aplinkos.

**Vienakojai robotai [1].** Vienakojo roboto masė yra mažesnė nei daugiakojo. Jei robotas turi daugiau kojų, būtinas jų judesių tarpusavio koordinavimas, o vienakojui robotui to nereikia. Tačiau visų svarbiausia, kad vienakojų robotų kojos su paviršiumi liečiasi tik vieninteliame taške. Taigi vienakojui robotui tereikia vienos galūnės kontaktų su paviršiumi sekos, todėl jis gali judėti labai nelygiu paviršiumi. Be to, šokčiojantis robotas gali peršokti, pavyzdžiui, plyšį, kuris yra platesnis už jo žingsnio ilgį, o daugiakojis žingsniuojantis robotas negali kirsti už jo žingsnio ilgį platesnio plyšio. Robotui su viena koja sunku išlaikyti pusiausvyrą, jis nejudėdamas negali stovėti stabiliai. Vienakojis robotas yra tik dinamiškai stabilus: pusiausvyrą gali išlaikyti tik nuolat keisdamas masės centro padėtį arba kurdamas papildomas, pusiausvyrą palaikančias jėgas.

**Dvikojai robotai [1].** Per pastaruosius metus buvo sukurta daugybė dvikojų robotų. Jie bėgiojo, šokinėjo, lipo laiptais aukštyn ir žemyn ir netgi darė triukus ore, pavyzdžiui, salto. *Honda* ir *Sony* sukūrė nepaprastai daug gebančius dvikojus robotus. Abi kompanijos sukūrė mažus vykdiklius su puikiomis galios ir svorio santykio

charakteristikomis. Šie nauji „protingi“ savo jutiklius ir valdiklius turintys vykdikliai pasižymi didele keliamąja galia bei lengvu valdymu.

Svarbus dvikojų robotų bruožas yra jų panašumas į žmogų (pvz., ASIMO, 2 pav.), jie gali būti žmogaus dydžio. Labai tinka žmogaus ir roboto sąveikai tirti. Dvikojai robotai statiškai stabilūs gali būti tik tada, kai stovi ramiai. Tačiau daugeliu atvejų jie turi nuolat daryti pusiausvyrą palaikančius judesius – net ir tada, kai stovi. Be to, kiekviena roboto koja turi išlaikyti visą roboto svorį. Daugiakojai robotai išlaiko pusiausvyrą paskirstydami apkrovą kojoms.

**2 pav.** Honda humanoidas ASIMO (Vlado Vansevičiaus nuotrauka).

**Keturkojai robotai.** Nors keturkojo roboto stovėsena yra stabili, jam einant stabilumui palaikyti roboto masės centras turi būti nuolat perkeliamas. Keturkojai robotai taip pat gali būti naudojami tiriant žmogaus ir roboto sąveiką. Žmonės šuniuką robotą (3 pav.) gali laikyti kaip naminį augintinį, tarp jų gali atsirasti emocinis ryšys, panašus į žmogaus ir šuns. Kai tik bus išspręstos energijos šaltinių ir vykdiklių technologijos problemos, labai tikėtina, kad keturkojų draugų robotų žmonės turės daugiau. Ypač tobulas yra *Boston Dynamics* sukurtas keturkojis karinis robotas *BigDog* (4 pav., a pavaizduota koncepcija). Jis puikiai juda raižyta vietove, neša didelį krovinį, įveikia kalvų šlaitus (4 pav., b) ir yra atsparus išoriniams trikdžiams.

**3 pav.** Šuniukas robotas (Vlado Vansevičiaus nuotrauka).

a

b

**4 pav.:** a – Vieno tobuliausių keturkojų robotų *BigDog* koncepcija, b – *BigDog*, lipantis šlaitu (© *Boston Dynamics* nuotraukos, skelbiamos *Boston Dynamics* leidus).

**Šešiakojai robotai [1].** Šešių kojų konfigūracija (5 pav.) plačiai naudojama savaeigiuose robotuose dėl savo statinio stabilumo ėjimo metu. Dėl to jų valdymas paprastesnis. Dažniausiai kiekviena roboto koja turi tris laisvės laipsnius: klubo (angl. *coxa*), šlaunikaulio (angl. *femur*) ir blauzdikaulio (angl. *tibia*). Tokiam robotui, kuris turi tik du laisvės laipsnius: klubų ir šlaunikaulių, sunkiau manevruoti nelygiu paviršiumi, bet jis gana gerai manevruoja lygiu pagrindu.

Vabzdžių judėjimo bet kokiu paviršiumi šešiomis kojomis (netgi aukštyn kojomis) galimybės nepranokstamos. Šiuo metu šešiakojų vabzdžių ir dabartinių šešiakojų robotų judėjimo galimybių skirtumas vis dar labai didelis. Taip yra todėl, kad judėdami vabzdžiai derina nedidelį aktyvių laisvės laipsnių skaičių su pasyvių darinių galimybėmis: jų mikroskopiniai kabliukai ir nelygios pėdos gerokai padidina kiekvienos kojos sukibimo su paviršiumi jėgą. Šiuo metu yra sukurta robotų su tokiomis kojomis, pvz., Stanfordo universiteto robotas *Stickybot* [2] imituoja lipnias gekono pėdas. Taigi galima teigti, kad žingsniuojančius robotus reikia dar smarkiai patobulinti, kad jų vaikščiojimo galimybės bent iš dalies prilygtų vabzdžių galimybėms. Jau nemažai padaryta kuriant reikiamus vykdiklius. Varomųjų įrenginių, panašių į būdingus gyvūnams, ir specialių energijos šaltinių kūrimas yra pagrindinė žingsniuojančių robotų tyrimų kryptis.

**5 pav.** *Micromagic systems* šešiakojis robotas (© Matt Denton nuotrauka – *Micromagic systems Ltd*.).

## 5.3. Žingsniuojančių robotų judėjimo optimizavimo metodai

Žingsniuojančių robotų optimalaus judėjimo užtikrinimas įvertinant jo stabilumą, greitį, energijos sąnaudas ar kitus svarbius parametrus reikalauja daug pastangų ir darbo. Judėjimas optimizuojamas ieškant tinkamos eisenos ir jos generavimo metodo.

Daugiakojų robotų eisenos projektavimas yra sudėtingas dalykas. Reikia išspręsti eisenos valdymo uždavinį įvertinant roboto masės centro padėtį, trintį kojų ir paviršiaus sąlyčio vietose. Šešiakojo roboto eisenos projektavimo esmė – visų šešių kojų judesių sinchroniškas koordinavimas [3]. Yra du eisenos generavimo būdai – statinis ir dinaminis. Statine eisena vaikštantis robotas neprisitaiko prie kintamo paviršiaus, kadangi šios eisenos judesiai yra nekintami – iš anksto užprogramuoti. Dinaminei eisenai būdingas prisitaikymas – šiuo atveju robotas pats generuoja savo eiseną ir gali ją esant reikalui keisti.

Vienas iš geriausių dvikojų robotų eisenos generavimo metodų yra nulinio momento taško metodas (angl. *Zero Moment Point*; ZMP) [4], arba iš anksto apskaičiuotų trajektorijų sekimo metodas. Roboto galūnių trajektorijos generuojamos kompiuteriu, pavyzdžiui, sprendžiant dinaminę judesio lygtį. Valdiklis valdo einančio roboto judesius taip, kad jo galūnės judėtų pagal apskaičiuotas trajektorijas ir robotas judėtų kaip numatyta [5].

Dar viena svarbi roboto judėjimo optimizavimo priemonė – tinkamiausios ėjimo trajektorijos paieška. Trajektorija planuojama siekiant rasti geriausią kelią. Jo ieškant svarbu ne tik žinoti roboto kinematinius ir dinaminius parametrus, bet ir turėti tikslų roboto ir jo aplinkos paviršiaus geometrinį aprašą. Yra daug trajektorijos generavimo metodų, pavyzdžiui, dinaminis programavimas (angl. *dynamic programming*), dirbtinių potencialų metodas (angl. *artificial potential method*), taip pat metodų, pagrįstų harmoninėmis funkcijomis (angl. *harmonic function*), baudos funkcijomis (angl. *penalty function*), euristiniu planavimu (angl. *heuristic planning*) ir kt. [6].

## 5.4. Šešiakojų robotų rūšys

Šešiakojo roboto kiekviena koja dažniausiai turi tris laisvės laipsnius, todėl visas šešiakojis robotas yra mechaninė sistema su 18 laisvės laipsnių. Nors mechaniškai jie sudėtingi, bet jų valdymo sistemos yra sąlyginai paprastos, nes šešiakojai robotai yra statiškai stabilūs ir jiems nereikia papildomos įrangos stabilumui užtikrinti. Dėl to ir valdymo sistema, ir valdymo programa yra paprastesnės, tiesa, kartais reikalingos ir sudėtingos valdymo programos. Labai svarbu ir sudėtinga laiko požiūriu suderinti (sinchronizuoti) visų šešių roboto kojų judesius. Kuo daugiau kojų, tuo daugiau elementarių judesių sekų gali būti. Šešiakojai robotai teoriškai gali turėti $N = (2 \cdot 6 - 1)! = 11! = 39916800$ judesių sekų, tačiau praktiškai naudojamos tik trys pagrindinės šešiakojų robotų kojų judesių sekos, vadinamos eisena (angl. *gait*). Taigi valdymo sistema turi gebėti pagal aplinkos sąlygas parinkti tinkamiausią roboto eiseną. Šešiakojai robotai turi tris pagrindines eisenas: trikoję (angl. *tripod*), banguojančią (angl. *wave*) ir pulsuojančią (angl. *ripple*).

Žingsniuojančius robotus galima surūšiuoti ne tik pagal kojų skaičių, bet ir pagal tai, kiek kojos turi laisvės laipsnių. Pagal kojų laisvės laipsnių skaičių šešiakojus robotus galima suskirstyti į tris pagrindines grupes:

- kojos turi po 1 laisvės laipsnį;
- kojos turi po 2 laisvės laipsnius;
- kojos turi po 3 laisvės laipsnius.

Pagal kojų išdėstymą ant roboto korpuso galima išskirti dvi robotų grupes:

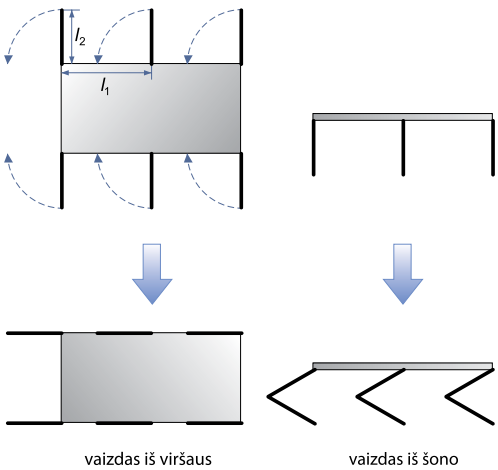
- kojos išdėstytos simetriškai išilginei horizontaliajai roboto korpuso ašiai;
- kojos išdėstytos apie centrinę roboto korpuso ašį.

*Tipiniai šešiakojai Lynxmotion bendrovės robotai. Extreme Hexapod I* yra šešiakojis robotas su 3 servomechanizmais (vykdikliais). Kiekvienas servomechanizmas valdo dvi kojas suteikdamas joms po 1 laisvės laipsnį. Tai vienas paprasčiausių žingsniuojančių robotų. Dėl savo paprastos konstrukcijos jis negali staigiai pakeisti judėjimo krypties, iškelti aukščiau kojų, keisti korpuso padėties. *Extreme Hexapod II* yra šešiakojis robotas su 12 servomechanizmų. Kiekvieną šio roboto koją valdo 2 servomechanizmai ir suteikia joms po 2 laisvės laipsnius. Vienas iš servomechanizmų pakelia koją aukštyn arba žemyn, kitas ją pastumia pirmyn arba atgal. Šis robotas yra kiek manevringesnis už *Extreme Hexapod I*, tačiau jis taip pat negali staigiai pakeisti judėjimo krypties, bet gali lengvai reguliuoti kojų pakėlimo aukštį. Šis robotas gali keisti ir korpuso padėtį. *Phoenix* ir *CH3-R* šešiakojai robotai turi 18 servomechanizmų. Kiekvieną roboto koją valdo 3 servomechanizmai, tai suteikia joms po 3 laisvės laipsnius. Būtent 3 laisvės laipsniai ir įgalina robotus greičiau keisti judėjimo kryptį, taip pat bet kaip keisti korpuso padėtį erdvėje. *CH3-R* nuo *Phoenix* skiriasi tik kojų išdėstymu aplink korpusą: jos išdėstytos apie centrinę jo ašį, todėl šis robotas gali staigiai keisti judėjimo kryptį, jam net nereikia pasisukti į tą pusę, į kurią nori judėti, nes jis neturi nei priekio, nei galo.

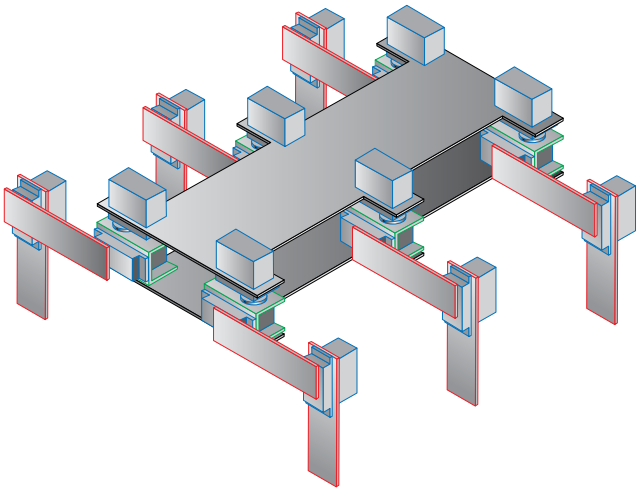
# 6. Roboto kūrimas

## 6.1. Roboto konstrukcijos parinkimas

Pasirinkime tokią konstrukciją: roboto kojos išdėstytos simetriškai išilgai roboto korpuso. Toks kojų išdėstymas supaprastins roboto kinematiką. Roboto dalis darysime iš 2 mm storio aliuminio plokščių. Parinkime tokius matmenis: korpusas – 300×100 mm, kojos blauzdikaulis– 110×30 mm, šlaunikaulis– 120×30 mm. Tokių matmenų roboto konstrukcinių dalių masė bus apie 550 g, todėl vykdikliai gali būti arba pneumatiniai cilindrai, arba servomechanizmai. Pneumatiniams cilindrams reikia kompresoriaus, bet jis labai padidintų roboto svorį, o naudojant suspausto oro rezervuarą gerokai sutrumpėtų roboto veikimo trukmė (oras rezervuare greitai pasibaigtų), todėl geriau naudoti servomechanizmus. Konstrukcija turėtų būti kintamos konfigūracijos, kad robotas galėtų priglausti kojas prie korpuso (išilgai). Taip sumažėja roboto plotis (6 pav.) ir jis gali praeiti pro siauresnius tarpus. Norint užtikrinti tokią roboto funkciją, tarpai tarp kojų turi būti didesni už kojų blauzdikaulių ilgį: $l_1 > l_2$. 7 pav. pateikiamas suprojektuoto roboto modelis.




**6 pav.** Šešiakojo roboto transformacijos pavyzdys.

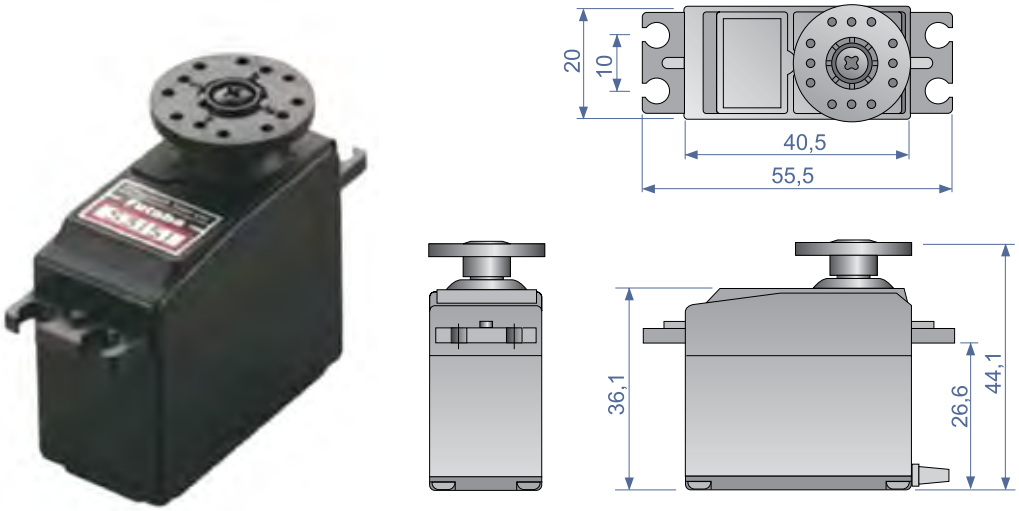


**7 pav.** Šešiakojo roboto modelio kompiuterinis brėžinys (autoriaus).

Tokios konstrukcijos roboto vykdikliai turi pasisukti ne mažesniu kaip 180° kampu. Kitas esminis reikalavimas roboto vykdikliams – pakelti visą robotą. Šešiakojam robotui žygiuojant mažiausiai trys kojos visada remiasi į paviršių, taigi trijų kojų vykdikliai turi būti pakankamai galingi, kad galėtų nesunkiai išlaikyti robotą. Tinkamiausi vykdikliai parenkami robotui stovint ant trijų kojų. Renkama kelis kartus. Taip daroma todėl, kad kol nežinomi konkretūs vykdikliai, nežinomas ir tikslus roboto svoris, o kol jis nežinomas, negalima parinkti reikalingo vykdiklių galingumo, – tai tarsi užburtas ratas. Pradžioje parenkami iš pažiūros tinkamiausi vykdikliai, tada nustatoma, ar jie yra tiek galingi, kad išlaikytų robotą. Jei ne, viskas kartojama iš naujo, bet antra ir tolesnės iteracijos atliekamos turint vis daugiau informacijos, t. y. parenkami vis tinkamesni vykdikliai. Optimalūs vykdikliai yra tie, kurių sukimo momentas (galia) yra pakankamas (su pasirinkta atsarga) robotui pakelti.

Servomechanizmą sudaro variklis, reduktorius ir valdymo grandinė. Servomechanizmai yra maži, lengvi, būna didelio sukimo momento ir sąlyginai paprastai valdomi. Būtent dėl šių savybių jie plačiai naudojami robotikoje. Lietuvoje galima įsigyti tinkamų parametrų ir palyginti nebrangių *Futaba S3151* servomechanizmų (8 pav.). Šių servomechanizmų sukimo momentas[3] yra 0,392 N·m, masė – 43 g. Jie pasisuka daugiau kaip 180° kampu. Taigi roboto su šiais servomechanizmais masė 18 · 43 g + 550 g = 1324 g. Robotą laiko du kiekvienos kojos servomechanizmai (9 pav.). Todėl robotui stovint ant trijų kojų jį laiko šeši servomechanizmai. Kadangi

[3] Dažnai servomechanizmų sukimo momentas nurodomas kg·cm.

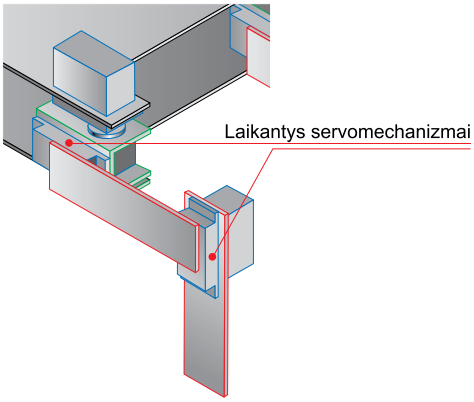



**8 pav.** *Futaba S3151* skaitmeninis servomechanizmas ir jo matmenys.

servomechanizmai nuo laikymo taško yra per roboto blauzdikaulio ilgį $l_2$ = 10 cm, tai jų apkrova tuose taškuose yra mažesnė,

$$F = \frac{0{,}392\ \mathrm{N} \cdot \mathrm{m}}{0{,}1\ \mathrm{m}} = 3{,}92\ \mathrm{N}.$$

Taigi visi laikantys servomechanizmai gali pakelti 400 g · 6 = 2400 g masės objektą. O tai daugiau nei bendra roboto masė. Tad servomechanizmai yra tinkami.




**9 pav.** Robotą laikantys servomechanizmai.

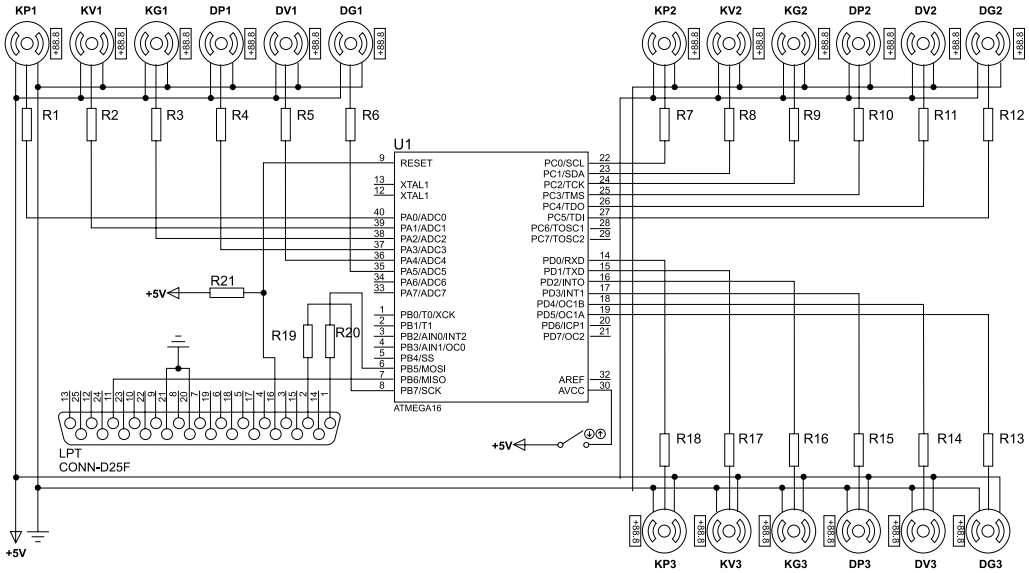
## 6.2. Valdymo schemos sudarymas

Pagrindinis roboto valdymo sistemos elementas yra mikroprocesorius. Jis valdo visus roboto judesius, atlieka skaičiavimus, priima sprendimus ir kita. Sudarant roboto valdymo schemą ir renkantis tinkamą mikroprocesorių būtina numatyti, kiek reikės mikroprocesoriaus įėjimų ir išėjimų, per kuriuos bus valdomas robotas. Kuriame robotą be jokių jutiklių, todėl mikroprocesorius turi turėti mažiausiai 18 išėjimų valdymo signalams siųsti į visus 18 servomechanizmų. Jų valdymo signalai yra 5 V amplitudės impulsai, taigi mikroprocesoriaus išėjimų loginio vieneto lygis turi būti 5 V. Pagal šiuos duomenis išsirenkamas *Atmel* bendrovės mikroprocesorius *Atmega16*. Jis turi 32 įėjimus / išėjimus, o tai užtikrina ne tik galimybę prijungti visus vykdiklius, bet ir galimybę vėliau modifikuoti robotą.

Galimos dvi valdymo sistemos: paprastesnė ir sudėtingesnė. Paprastesnei pakanka tik vieno mikroprocesoriaus ir jokių papildomų elektroninių įtaisų robotui valdyti. Tokios sistemos valdymo programa yra sudėtingesnė ir labiau apkrauna procesorių, bet jos kaina maža. Sudėtingesnei valdymo sistemai reikia numatyti daugiau įtaisų, kurie kontroliuotų kitų roboto sistemų, pvz., servomechanizmų, valdymą. Tai paskirstytojo valdymo sistema. Jos valdymo programa yra paprastesnė, tačiau tokios sistemos kaina gerokai didesnė. Kurią valdymo sistemą projektuoti, daugiausia lemia kaina, taip pat gali lemti ir kūrėjo elektronikos bei programavimo žinių lygis. Pasirenkame paprastesnį ir pigesnį valdymo sistemos variantą (10 pav.). Sudarome tokią principinę elektrinę schemą, kad servomechanizmus būtų paprasčiau valdyti. Tam jie sugrupuojami po 6 ir prijungiami prie skirtingų mikroprocesoriaus prievadų. Servomechanizmai grupuojami taip:

- 6 servomechanizmai, esantys prie pagrindo ir sukiojantys kojas pirmyn ir atgal, jungiami prie prievado PA;
- 6 servomechanizmai, esantys prie pagrindo ir kilnojantys kojas aukštyn ir žemyn, jungiami prie prievado PC;
- 6 servomechanizmai, esantys ant kojų sujungimų, jungiami prie prievado PD.

Prievadas PB naudojamas mikroprocesoriui programuoti.

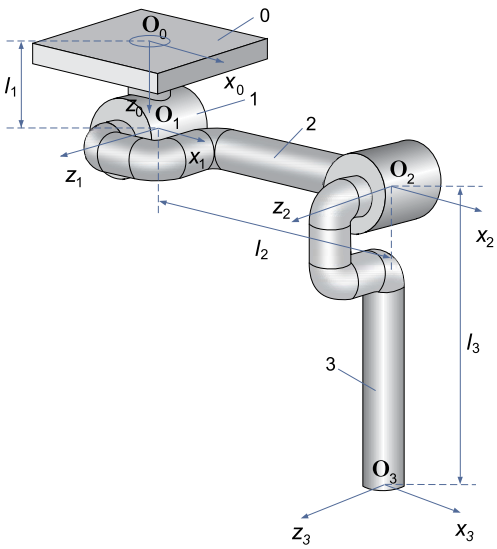



**10 pav.** Roboto valdymo elektrinė principinė schema: KP – kairioji priekinė koja, KV – kairioji vidurinė koja, KG – kairioji galinė koja, DP – dešinioji priekinė koja, DV – dešinioji vidurinė koja, DG –

## 6.3. Vienos kojos atvirkštinės kinematikos uždavinys

Šešiakojo roboto judėjimas yra visų šešių kojų sinchronizuotas judėjimas. Jei jo eisena yra, pvz., trikojė, tai trys kojos perkeliamos pirmyn, o kitos trys kojos, stovinčios ant paviršiaus, stumiamos atgal ir taip visas robotas stumiamas į priekį. Tokie judesiai cikliškai kartojami ir robotas juda pirmyn. Kad kojos būtų judinamos norimu dėsniu ir robotas eitų numatyta trajektorija, būtini kinematiniai skaičiavimai. Kadangi žinoma, kur reikia pastatyti koją, kitaip tariant, yra žinomos kojos pėdos koordinatės, reikia suskaičiuoti, kokiais kampais turi pasisukti kojos servomechanizmai, kad pėda atsidurtų reikiamoje vietoje. Šis uždavinys sprendžiamas Denavito ir Hartenbergo metodu.

*Denavito ir Hartenbergo metodas*. Pirmiausia reikia sudaryti tikslų roboto kojos kinematinį modelį (11 pav.). Sistemą sudaro keturios grandys (11 pav. pažymėta skaičiais 0, 1, 2 ir 3) ir trys kinematinės poros. Kiekvienai jų taikant Denavito ir Hartenbergo taisykles yra priskiriamos koordinačių sistemos. Tada sudaroma Denavito ir Hartenbergo parametrų lentelė [7] (1 lentelė).




**11 pav.** Roboto kojos kinematinis modelis [7].

**1 lentelė.** Denavito ir Hartenbergo parametrai

| Kinematinė pora | Kinematinės poros tipas | Grandies numeris | Parametrai | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | θ | *d* | *a* | α |
| 0,1 | Posūkio | 1 | $\theta_1$ | $l_1$ | 0 | –90° |
| 1,2 | Posūkio | 2 | $\theta_2$ | 0 | $l_2$ | 0 |
| 2,3 | Posūkio | 3 | $\theta_3$ | 0 | $l_3$ | 0 |

Pagal 1 lentelę sudaromos trys posūkio matricos [7]:

$$\mathbf{T}_{0,1} = \begin{bmatrix} \cos\theta_1 & 0 & -\sin\theta_1 & 0 \\ \sin\theta_1 & 0 & \cos\theta_1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & -l_1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{T}_{1,2} = \begin{bmatrix} \cos\theta_2 & -\sin\theta_2 & 0 & l_2 \cdot \cos\theta_2 \\ \sin\theta_2 & \cos\theta_2 & 0 & l_2 \cdot \sin\theta_2 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix};$$

$$\mathbf{T}_{2,3} = \begin{bmatrix} \cos\theta_3 & -\sin\theta_3 & 0 & l_3 \cdot \cos\theta_3 \\ \sin\theta_3 & \cos\theta_3 & 0 & l_3 \cdot \sin\theta_3 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

Kiekviena transformacijos matrica aprašo, kaip yra susijusios gretimų grandžių koordinačių sistemos. Norint rasti, kaip roboto pėdos koordinačių sistema yra susijusi su roboto korpuso koordinačių sistema, reikia rasti visų šių matricų sandaugą: $T = T_{0,1} \cdot T_{1,2} \cdot T_{2,3}$. Sprendinio ieškoma naudojant programą *MATLAB*. Programos tekstas:

```
syms l1 l2 l3
syms t1 t2 t3

T1=[cos(t1) 0 -sin(t1) 0; sin(t1) 0 cos(t1) 0; 0 -1 0 -l1; 0 0 0 1]

T1 =
[  cos(t1),     0,  -sin(t1),       0]
[   sin(t1),    0,   cos(t1),       0]
[         0,   –1,          0,    –l1]
[         0,    0,          0,      1]

T2=[cos(t2) – sin(t2) 0 l2*cos(t2); sin(t2) cos(t2) 0 l2*sin(t2); 0 0 1 0; 0 0 0 1]

T2 =
[   cos(t2),  -sin(t2),        0,     l2*cos(t2)]
[    sin(t2),  cos(t2),        0,      l2*sin(t2)]
[          0,         0,        1,               0]
[          0,         0,        0,               1]

T3=[cos(t3) -sin(t3) 0 l3*cos(t3); sin(t3) cos(t3) 0 l3*sin(t3); 0 0 1 0; 0 0 0 1]

T3 =
[   cos(t3),  -sin(t3),        0,     l3*cos(t3)]
[    sin(t3),  cos(t3),        0,      l3*sin(t3)]
[          0,         0,        1,               0]
[          0,         0,        0,               1]

T=T1*T2*T3
```

Gauta transformacijos matrica susieja roboto kojos koordinačių sistemą $O_3x_3y_3$ (11 pav.) su jo korpuso koordinačių sistema [7]:

$$\mathbf{T} = \begin{bmatrix} C\theta_1 C\theta_2 C\theta_3 - C\theta_1 S\theta_2 S\theta_3 & -C\theta_1 C\theta_2 S\theta_3 - C\theta_1 S\theta_2 C\theta_3 & -S\theta_1 & C\theta_1 C\theta_2 l_3 C\theta_3 - C\theta_1 S\theta_2 l_3 S\theta_3 + C\theta_1 l_2 C\theta_2 \\ S\theta_1 C\theta_2 C\theta_3 - S\theta_1 S\theta_2 S\theta_3 & -S\theta_1 C\theta_2 S\theta_3 - S\theta_1 S\theta_2 C\theta_3 & C\theta_1 & S\theta_1 C\theta_2 l_3 C\theta_3 - S\theta_1 S\theta_2 l_3 S\theta_3 + S\theta_1 l_2 C\theta_2 \\ -S\theta_2 C\theta_3 - C\theta_2 S\theta_3 & S\theta_2 S\theta_3 - C\theta_2 C\theta_3 & 0 & -S\theta_2 l_3 C\theta_3 - C\theta_2 l_3 S\theta_3 - l_2 S\theta_2 - l_1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

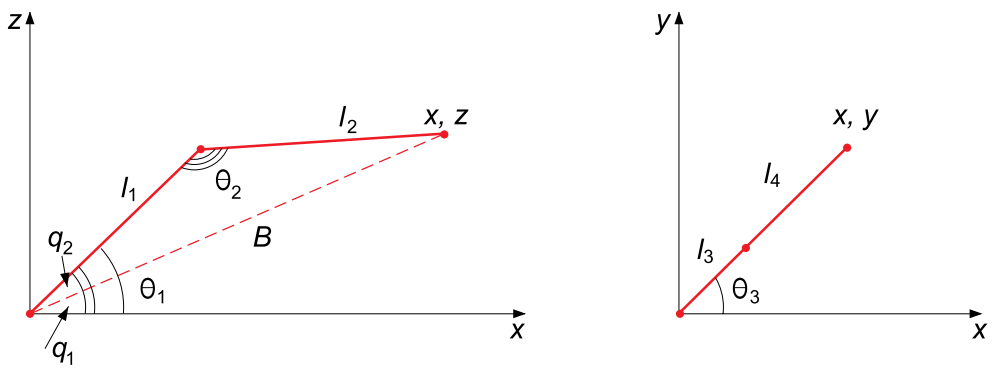
čia S = sin, C = cos. Paskutinio šios matricos stulpelio pirmieji trys elementai išreiškia pėdos koordinates korpuso koordinačių sistemoje. Todėl:

$$x = \cos\theta_1 \cos\theta_2 l_3 \cos\theta_3 - \cos\theta_1 \sin\theta_2 l_3 \sin\theta_3 + \cos\theta_1 l_2 \cos\theta_2 ,$$
$$y = \sin\theta_1 \cos\theta_2 l_3 \cos\theta_3 - \sin\theta_1 \sin\theta_2 l_3 \sin\theta_3 + \sin\theta_1 l_2 \cos\theta_2 ,$$
$$z = -\sin\theta_2 l_3 \cos\theta_3 - \cos\theta_2 l_3 \sin\theta_3 - l_2 \sin\theta_2 - l_1 .$$

Šios išraiškos iš tikrųjų yra tiesioginės kinematikos uždavinio sprendiniai. Norint gauti atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendinį, iš šių formulių reikia išreikšti kampus $\theta_1$, $\theta_2$ ir $\theta_3$. Tačiau ši užduotis yra labai sudėtinga, jei išvis įgyvendinama, todėl ieškoma paprastesnio atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendimo metodo. Santykinai paprastas yra geometrinis sprendimo būdas [8].

## 6.4. Geometrinis atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendimo metodas

Norint šiuo metodu rasti reikiamus servomechanizmų posūkių kampus, reikia nustatyti kojos projekcijas *xy* ir *xz* plokštumose (12 pav.).




**12 pav.** Roboto kojos projekcijos *xz* ir *xy* plokštumose [9]. $\theta_1$ – klubo servomechanizmo posūkio kampas, $\theta_2$ – šlaunikaulio servomechanizmo kampas, $\theta_3$ – blauzdikaulio servomechanizmo kampas, *B* – menamoji linija, jungianti šlaunikaulio pradžią su blauzdikaulio pabaiga, $q_1$ – kampas tarp *x* ašies ir menamosios linijos *B*, $q_2$ – kampas tarp menamosios linijos *B* ir šlaunikaulio, $l_1$ – šlaunikaulio ilgis, $l_2$ – blauzdikaulio ilgis, $l_3$ – atstumas tarp klubo ir šlaunikaulio servomechanizmo ašių, $l_4$ – *B* projekcija *xy* plokštumoje.

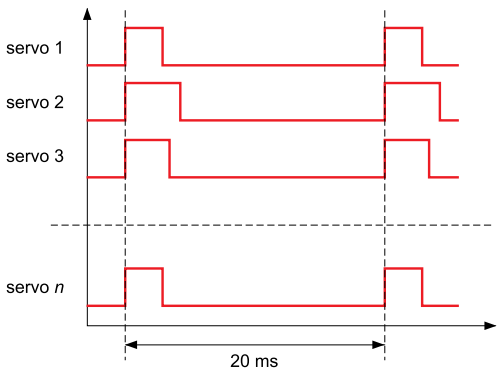
Pagal Pitagoro teoremą apskaičiuojami $l_4$ ($l_4 = \sqrt{x^2 + y^2} + l_3$) ir menamosios linijos $B$ ($B = \sqrt{(l_4 - l_3)^2 + z^2}$) ilgiai. Klubo servomechanizmo posūkio kampas $\theta_1 = \arctan\left(\frac{y}{x + l_3}\right)$ ir pagalbinis kampas $q_1 = \arcsin\left(\frac{z}{B}\right)$ apskaičiuojami remiantis trigonometriniais sąryšiais, o kampas $q_2 = \arccos\left(\frac{l_1^2 - l_2^2 + B}{2 \cdot l_1 \cdot B}\right)$ pagal kosinusų teoremą. Šlaunikaulio servomechanizmo posūkio kampas lygus $q_1$ ir $q_2$ kampų sumai: $\theta_2 = q_1 + q_2$. Blauzdikaulio servomechanizmo posūkio kampas apskaičiuojamas taip pat pagal kosinusų teoremą: $\theta_3 = \arccos\left(\frac{l_1^2 + l_2^2 - B}{2 \cdot l_1 \cdot l_2}\right)$.

Taigi gautos kampų $\theta_1$, $\theta_2$ ir $\theta_3$ išraiškos ir yra atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendiniai.

## 6.5. Servomechanizmų valdymo būdai

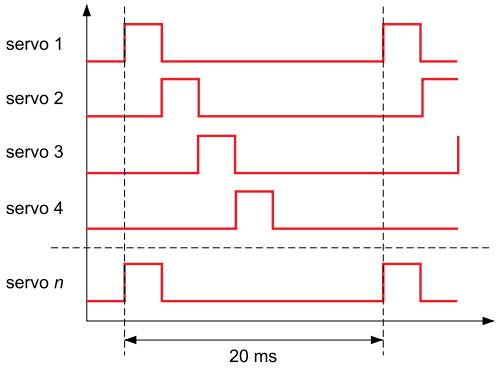
Jie valdomi impulsų pločio moduliacija (angl. *Pulse Width Modulation*, PWM). Nuo impulso pločio, arba impulso trukmės, priklauso servomechanizmo padėtis. 1,5 ms impulsai atitinka neutralią jo padėtį, 1 ms – +45°, o 2 ms – –45° kampą. Impulsai servomechanizmams turi būti siunčiami 50 Hz dažniu (kas 20 ms) [9]. Servomechanizmų savybė yra užimti naują padėtį per kiek galima trumpesnį laiką. Taigi, jo greitis tiesiogiai priklauso nuo posūkio kampo dydžio, kuris lygus esamo kampo ir būsimo kampo skirtumui. Nustačius didelius posūkio kampus, roboto judesiai tampa pernelyg staigūs ir atsiranda nepageidaujamų inercinių smūgių. Jų galima išvengti keičiant kiekvieno servomechanizmo greitį. Vienintelis būdas tam greičiui reguliuoti yra toks: posūkio kampą reikia skaidyti į pasirinkto skaičiaus mažų posūkio kampų seką. Tai atliekama didinant arba mažinant servomechanizmo valdymo impulso plotį nuo esamo iki reikiamo dydžio. Nuo šio impulso pločio padidinimo (sumažinimo) priklauso servomechanizmo sukimosi greitis. Impulso plotis gali būti didinamas dažniausiai kas 20 ms. Mažiausias impulso pločio padidinimas lygus 1 μs, intervale nuo 1 ms iki 2 ms. Tai užtikrina 0,09° servomechanizmo ašies posūkio kampo tikslumą [9]. Galimi du impulsų sekų generavimo būdai: lygiagretusis ir nuoseklusis.

*Lygiagretusis valdymo impulsų sekos generavimas*. Lygiagrečiojo valdymo impulsų sekos generavimo atveju visi reikiami procesoriaus išvadai įjungiami vienu metu ir kiekvienas išvadas išjungiamas tam tikru laiku (13 pav.). Šiuo atveju vienu metu reikia sekti visų impulsų trukmę, o tai apsunkina mikroprocesoriaus darbą.




**13 pav.** Lygiagretusis valdymo impulsų generavimas [9].

*Nuoseklusis valdymo impulsų sekos generavimas.* Nuosekliojo valdymo impulsų generavimo atveju mikroprocesoriaus išvadai junginėjami nuosekliai. Įjungiamas pirmasis išvadas, tada laukiama, kol praeis laikas, kuris atitinka impulso plotį (trukmę), ir tada jis išjungiamas. Tuo pat metu įjungiamas kitas išvadas, laukiama nustatytą laiką ir t. t. (14 pav.). Impulsai turi kartotis kas 20 ms, o didžiausias kiekvieno impulso plotis gali būti 2 ms – taigi nuosekliai galima generuoti 10 impulsų. Vienu metu reikia generuoti dvi nuoseklių valdymo impulsų sekas, nes robotas turi 18 vykdiklių [9].



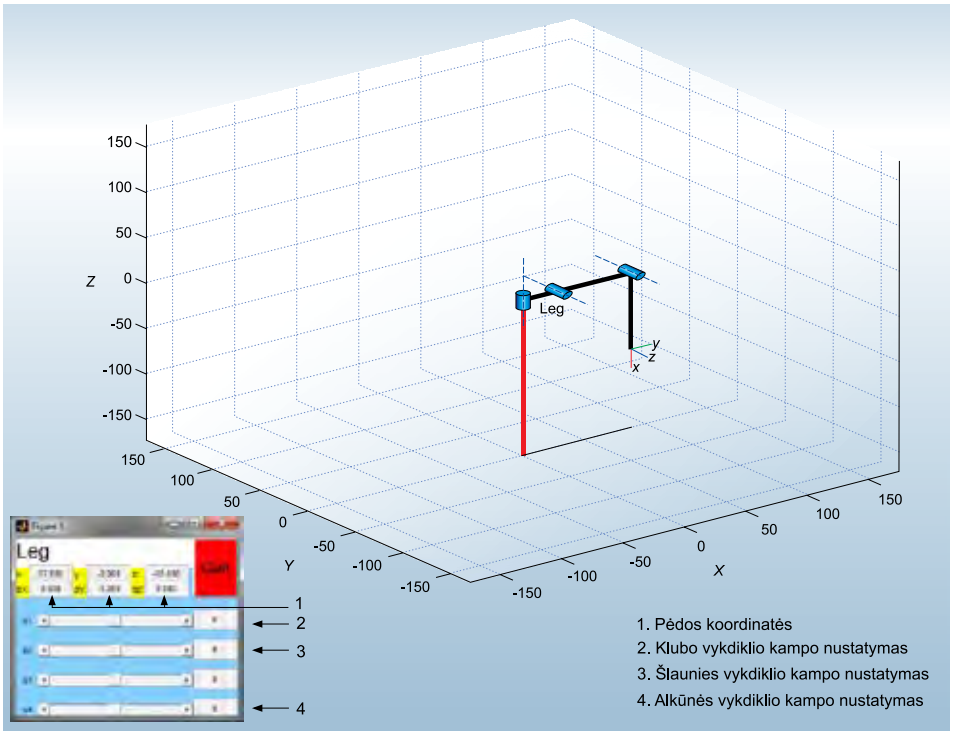

**14 pav.** Nuoseklusis valdymo impulsų generavimas [9].

# 7. Roboto judėjimo ypatybių tyrimas

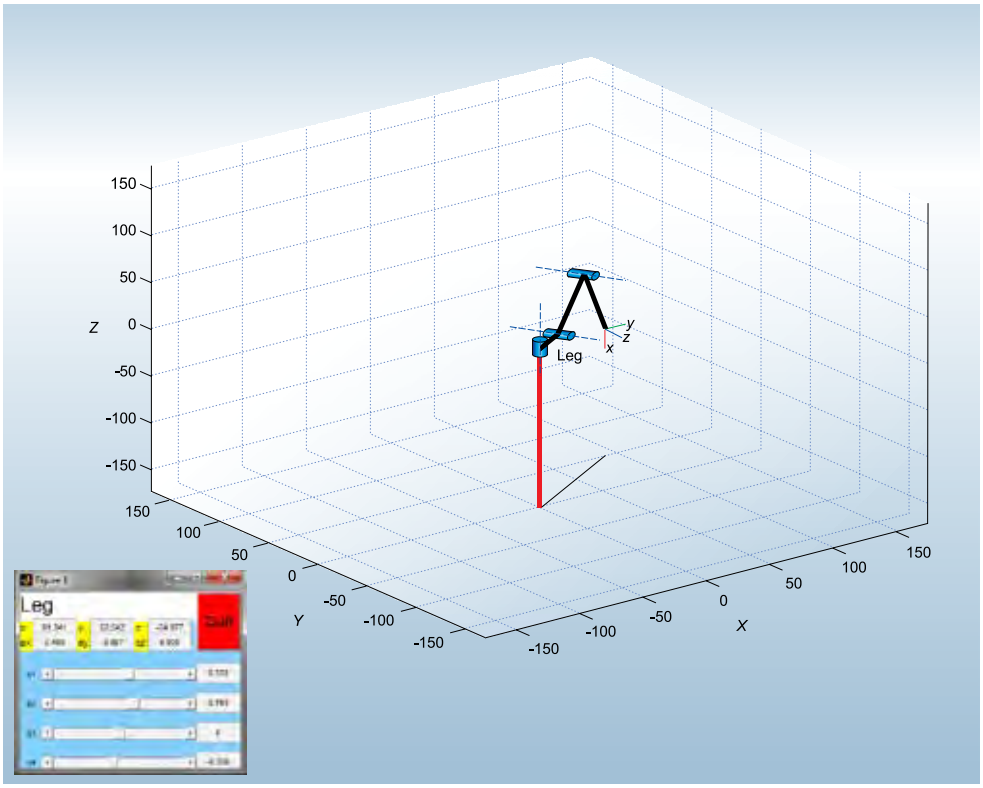
## 7.1. Kompiuterinio roboto modelio tyrimas

Atlikus kinematinius roboto kojos skaičiavimus reikia patikrinti jų teisingumą. Tą padaryti galima sudarius tikslų kompiuterinį roboto kojos kinematinį modelį. Kojos modelis sudarytas naudojantis kompiuterinės programos *MATLAB* papildomu moduliu *Robot Toolbox* [10], įgalinančiu išbandyti kinematines robotų sistemas. Toliau pateikiamas *MATLAB* programos *robot_leg.m* tekstas roboto kojos modeliui sukurti, o 15 pav. parodytas bandymo programos langas su paaiškinimais:

```
qr=[0 0 0 0];
L1=link([pi/2 28 0 0 0], 'standart');
L2=link([0 59  0 0], 'standart');
L3=link([0 0 -pi/2 0 2], 'standart');
L4=link([0 85 0 0 0], 'standart');
leg=robot({L1 L2 L3 L4});
leg.name='Leg';
%plot(leg, qr);      %vaizduoti roboto kojos kinematine schema
drivebot(leg);       %atlikti bandymus
```




**15 pav.** Roboto kojos kinematinio modelio bandymų langas.




**16 pav.** Roboto kojos kinematinio modelio bandymas.

Apskaičiavus reikiamus servomechanizmų kampus nustatytai kojos padėčiai, kampai radianais įvedami į vykdiklių kampų nustatymo laukus ir programa pavaizduoja roboto koją bei pateikia apskaičiuotas pėdos koordinates (16 pav.). Jei apskaičiuotos modelio pėdos koordinatės sutampa su nustatytomis, reiškia, kojos kinematiniai skaičiavimai yra teisingi.

*Trikojės eisenos būsenų diagrama* (17 pav.). Trikojė eisena paremta dviejų besikeičiančių trikojų perstatymu [11]. Pirmąjį trikojį sudaro kairioji priekinė ir galinė (KP ir KG) kojos ir dešinioji vidurinė (DV) koja. Antrąjį trikojį sudaro dešinioji priekinė ir galinė (DP ir DG) kojos ir kairioji vidurinė (KV) koja. Trikoje eisena vieną žingsnį galima atlikti keturiais etapais:

0 – neutrali roboto būsena;

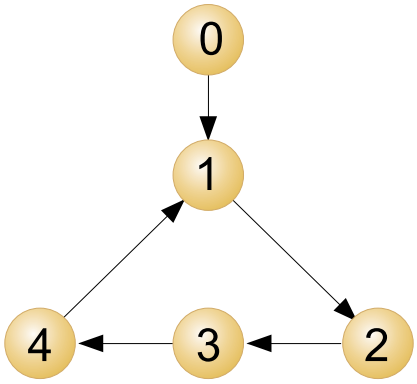
1 – pirmasis trikojis pakeliamas ir pastumiamas pirmyn, antrasis trikojis yra neutralioje padėtyje;

2 – pirmasis trikojis pastatomas ant paviršiaus, antrasis trikojis yra neutralioje padėtyje;

3 – pirmasis trikojis grąžinamas į neutralią padėtį, antrasis trikojis pakeliamas į viršų ir pastumiamas pirmyn;

4 – antrasis trikojis pastatomas ant paviršiaus.

Ciklas kartojamas nuo 1 etapo, kol reikia eiti pirmyn. Robotas pastumiamas į naują padėtį per 3 etapą ir pereinant nuo 4 į 1 etapą [9]. 18 pav. pateikta grafinė roboto judesių diagrama, atitinkanti šią trikoję eiseną.




**17 pav.** Trikojės eisenos būsenų diagrama [9].

## 7.2. Fizinio roboto modelio judėjimo tyrimas

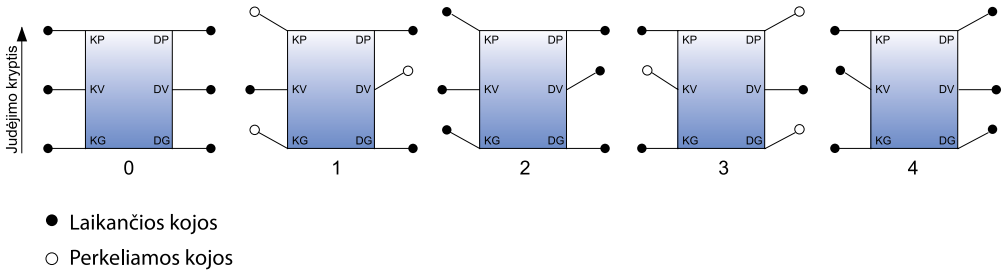
Parašome dvi roboto judėjimo programas, grindžiamas skirtingais valdymo būdais. Šias roboto valdymo programas įrašome į fizinio roboto modelio atmintį ir atliekame roboto judėjimo tyrimą, taikydami minėtą trikojės eisenos būdą.

Pirmasis bandymas daromas naudojant lygiagretųjį impulsų generavimo būdą bei tiesiogiai skaitant ir rašant mikroprocesoriaus laikmačio turinį. Šiuo atveju procesoriaus programa labai apkraunama, nes tikrina laikmačio turinį ir negali atlikti kitų užduočių. Taigi, nelieka laiko stebėti kiekvieno impulso plotį bei pasirinktu žingsniu jį keisti [9].

Antrąjį bandymą atliekame naudodami procesoriaus laikmačio persipildymo pertrauktį[4]. Laikmačio turinį tikrina pats procesorius, tai sumažina valdymo programos apkrovą. Pertrauktis[5] yra iškviečiama tik kas tam tikrą nustatytą laiką. Kiekvienos per-

[4] Mikroprocesoriuose naudojama speciali paprogramė (angl. *timer overflow interrupt*).

[5] Procesorius, gavęs pertraukties signalą, sustabdo atliekamą užduotį, įsimena jos vykdymo būseną, persijungia kitai užduočiai atlikti, o kai ją baigia, grįžta prie ankstesnės užduoties ir tęsia jos vykdymą. Pertrauktis iškviečiama tam tikromis programoje nustatytomis sąlygomis.

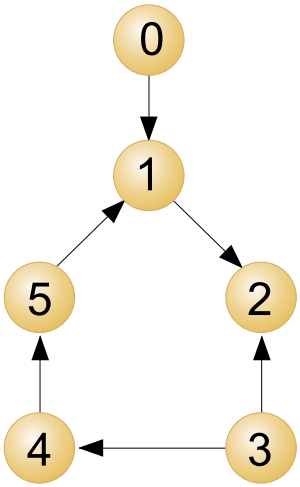



**18 pav.** Grafinis trikojės eisenos vaizdas [9].

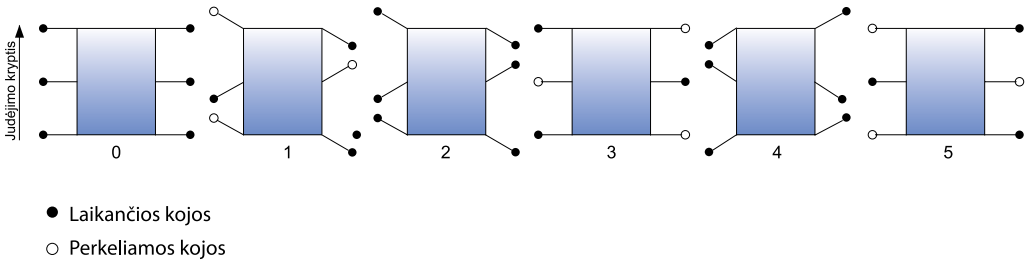
traukties metu tikrinama, ar reikia išjungti mikroprocesoriaus išvadus. Kadangi reikia tikrinti 18 verčių, pertraukties trukmė išauga, o tai apriboja kreipimosi į pertraukties paprogramę dažnį. Geriausiai valdymo impulsai generuojami, kai pertrauktis iškviečiama kas 100 µs. Tai reiškia, kad variklių valdymo impulsų plotis gali būti keičiamas tik 100 µs žingsniu. Taip pat kiekvienos pertraukties metu reikia naujai įrašyti laikmačio vertę [9].

Šie valdymo metodai neleidžia keisti variklių sukimosi greičio norimu tikslumu, todėl roboto judesiai yra staigūs ir kojai pasiekus galinę nustatytą padėtį susidaro nepageidaujamų smūgių. Atliekant pirmuosius du bandymus roboto trikojė eisena buvo generuojama pagal 17 pav. pateiktą diagramą. Pereinant nuo 2-os būsenos prie 3-ios, dešiniosios galinės kojos kampe susidaro nestabilus taškas. Dėl šios priežasties robotas tais momentais pavirsta šia kryptimi, todėl būtina koreguoti trikoję eiseną. Siekiant sumažinti tokių nestabilių būsenų skaičių sudaroma nauja trikojės eisenos generavimo seka (19 ir 20 pav.) [9]:

0 – neutrali būsena;
1 – pirmasis trikojis pakeliamas ir pernešamas pirmyn, antrasis trikojis pastumiamas atgal;
2 – pirmasis trikojis pastatomas ant paviršiaus, antrasis trikojis yra pastumtas atgal;
3 – pirmasis trikojis yra pastumiamas į neutralią padėtį, antrasis trikojis pakeliamas aukštyn ir pastumiamas į neutralią padėtį;
4 – pirmasis trikojis pastumiamas atgal, antrasis trikojis pernešamas pirmyn ir pastatomas ant paviršiaus;
5 – pirmasis trikojis pakeliamas aukštyn ir pastumiamas į neutralią padėtį, antrasis trikojis pastumiamas į neutralią padėtį;
6 – ciklas kartojamas nuo 1 etapo.



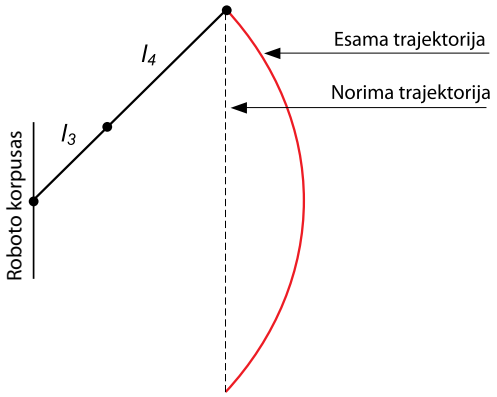

**19 pav.** Koreguotos trikojės eisenos būsenų diagrama [9].




**20 pav.** Koreguotos trikojės eisenos schema [9].

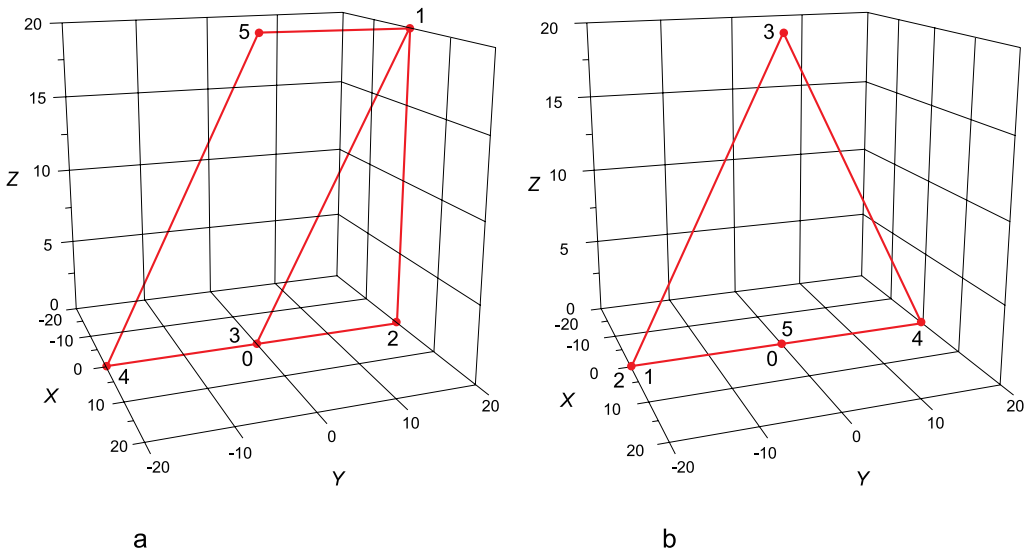
Trečiasis bandymas atliekamas taikant koreguotą trikoję eiseną ir impulsai generuojami dviem lygiagrečiomis nuoseklių impulsų sekomis. Šiuo atveju naudojama laikmačio palyginimo pertrauktis. *Atmega16* turi du laikmačio turinio palyginimo registrus, tai vienu metu galima generuoti dvi nuoseklias impulsų sekas. Kadangi vienu metu formuojami tik du lygiagretūs impulsai, o pertrauktys daromos mažiausiai kas 1 ms, tai pagrindinė procesoriaus programa apkraunama labai mažai ir gali vykdyti kitas funkcijas, pvz., keisti impulsų plotį nustatytu žingsniu, keistis duomenimis su kitais mikroprocesoriais ir pan. [9].

*Trikojės eisenos pėdų trajektorijos.* Robotui judant pirmyn, ant pagrindo stovinčios kojos stumiamos atgal sukant reikiamus servomechanizmus atitinkama kryptimi. Kadangi servomechanizmo judesys yra sukamasis, robotą laikančių ir pastumiančių kojų trajektorijos yra lanko formos (21 pav.).




**21 pav.** Nekoreguotų kojų pėdų trajektorijos *xy* plokštumoje esant stūmimo fazei.

Tokios pėdų trajektorijos nepageidautinos, nes robotui žingsniuojant kojos įsispiria į paviršių ir jis gali nugriūti. Kad pėdos judėtų kaip numatyta, sudaromos dvi trajektorijos (2 lentelė) I ir II trikojų pėdoms (22 pav.).




**22 pav.** I ir II trikojų pėdų trajektorijos: a – I trikojis, b – II trikojis. Skaitmenys 0–5 atitinka trikojės eisenos generavimo sekos etapus.

*Trajektorijos taškų pavertimas servomechanizmų valdymo signalais*. Kiekvieną trajektoriją sudaro aibė erdvės taškų, kuriuose nuosekliai turi atsidurti pėdos. Kiekvienai pėdos padėčiai apskaičiuojama kiekvienos kojos servomechanizmų padėtis ir pagal ją parenkami valdymo impulsų pločiai (3 lentelė).

**2 lentelė.** Trajektorijų taškų koordinatės

| Būsena | Koordinatės, mm | I trikojis | II trikojis |
|---|---|---|---|
| 1 | x | 0 | 0 |
| | y | 20 | –20 |
| | z | 20 | 0 |
| 2 | x | 0 | 0 |
| | y | 20 | –20 |
| | z | 0 | 0 |
| 3 | x | 0 | 0 |
| | y | 0 | 0 |
| | z | 0 | 20 |
| 4 | x | 0 | 0 |
| | y | –20 | 20 |
| | z | 0 | 0 |
| 5 | x | 0 | 0 |
| | y | 0 | 0 |
| | z | 20 | 0 |

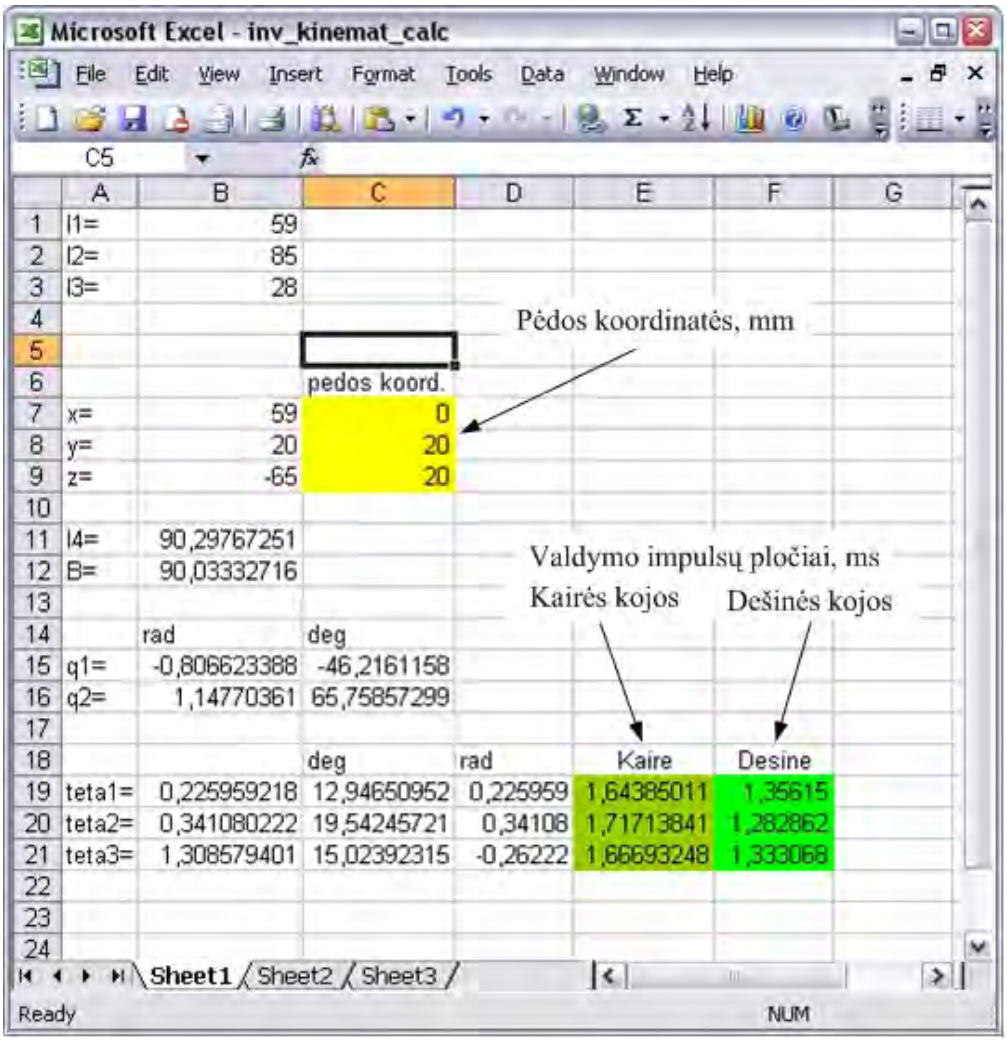
**3 lentelė.** Servomechanizmų valdymo impulsų pločiai, atitinkantys skirtingas pėdų padėtis

| Būsena | Servomechanizmas | Valdymo impulsų plotis, µs | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | I trikojis | | | II trikojis | | |
| | | KP | KG | DV | KV | DP | DG |
| 1 | 1 | 1640 | 1640 | 1360 | 1360 | 1640 | 1640 |
| | 2 | 1720 | 1720 | 1280 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 3 | 1670 | 1670 | 1330 | 1470 | 1530 | 1530 |
| 2 | 1 | 1640 | 1640 | 1360 | 1360 | 1640 | 1640 |
| | 2 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 3 | 1470 | 1470 | 1530 | 1470 | 1530 | 1530 |
| 3 | 1 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 2 | 1500 | 1500 | 1500 | 1720 | 1280 | 1280 |
| | 3 | 1500 | 1500 | 1500 | 1690 | 1310 | 1310 |
| 4 | 1 | 1360 | 1360 | 1640 | 1640 | 1360 | 1360 |
| | 2 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 3 | 1470 | 1470 | 1530 | 1530 | 1530 | 1530 |
| 5 | 1 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 2 | 1720 | 1720 | 1280 | 1500 | 1500 | 1500 |
| | 3 | 1690 | 1690 | 1310 | 1500 | 1500 | 1500 |

Taikant geometrinį atvirkštinės kinematikos uždavinio sprendimo metodą randamos roboto kiekvieno servomechanizmo padėtys reikiamai pėdų padėčiai užimti. Žinant šias padėtis, apskaičiuojami valdymo impulsų pločiai joms nustatyti. Impulsų pločiai apskaičiuojami pagal tokią formulę:

$$t_{imp} = \frac{\theta_n}{\theta} \pm 1{,}5;$$

čia $t_{imp}$ – valdymo impulso plotis (ms), $\theta_n$ – servomechanizmo padėtis (°), θ – didžiausias servomechanizmo posūkio kampas (°), šiuo atveju 90°; „+“, jei skaičiuojami kairiųjų kojų impulsų pločiai, „–“ jei dešiniųjų. Visi minėti skaičiavimai atliekami MS *Excel* programa (23 pav.). Tereikia įvesti pėdos koordinates ir programa iškart pateikia visų kojos servomechanizmų valdymo impulsų pločius.



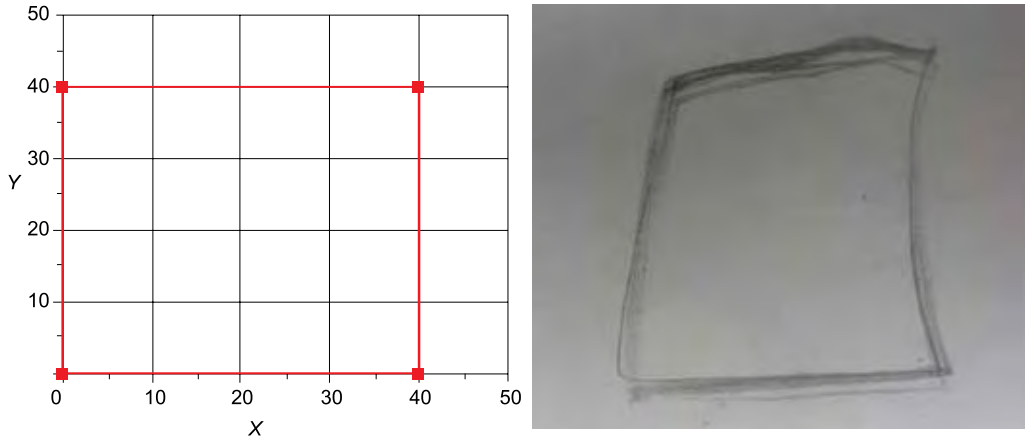

| | A | B | C | D | E | F | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | l1= | 59 | | | | | |
| 2 | l2= | 85 | | | | | |
| 3 | l3= | 28 | | | | | |
| 4 | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | |
| 6 | | | pedos koord. | | | | |
| 7 | x= | 59 | 0 | | | | |
| 8 | y= | 20 | 20 | | | | |
| 9 | z= | -65 | 20 | | | | |
| 10 | | | | | | | |
| 11 | l4= | 90,29767251 | | | | | |
| 12 | B= | 90,03332716 | | | | | |
| 13 | | | | | | | |
| 14 | | rad | deg | | | | |
| 15 | q1= | -0,806623388 | -46,2161158 | | | | |
| 16 | q2= | 1,14770361 | 65,75857299 | | | | |
| 17 | | | | | | | |
| 18 | | | deg | rad | Kaire | Desine | |
| 19 | teta1= | 0,225959218 | 12,94650952 | 0,225959 | 1,64385011 | 1,35615 | |
| 20 | teta2= | 0,341080222 | 19,54245721 | 0,34108 | 1,71713841 | 1,282862 | |
| 21 | teta3= | 1,308579401 | 15,02392315 | -0,26222 | 1,66693248 | 1,333068 | |
| 22 | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | |

**23 pav.** Valdymo impulsų pločio skaičiavimo programos langas.

Mikroprocesorius generuoja servomechanizmų valdymo impulsų seką reikiamu momentu keisdamas impulsų plotį.

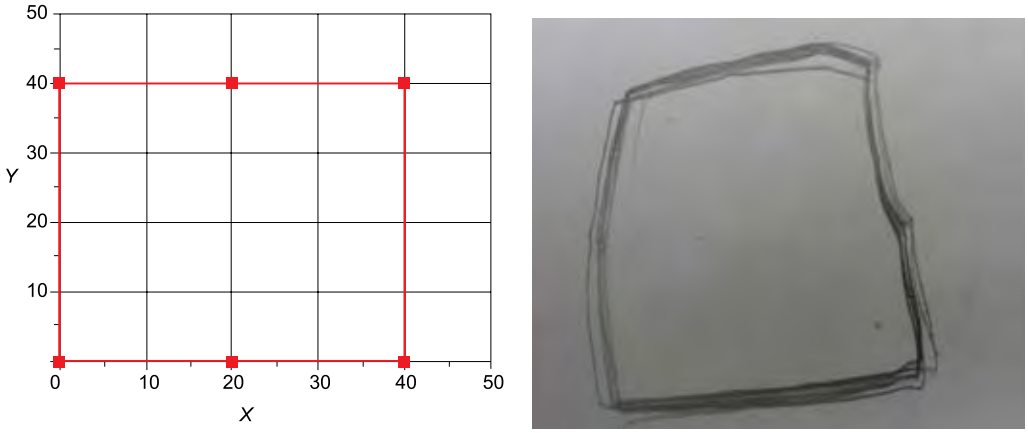
*Pėdos trajektorijos tikslumo tyrimas*. Trajektorijos tikslumas priklauso nuo taškų, sudarančių šią trajektoriją, skaičiaus. Kuo daugiau taškų, tuo trajektorija tikslesnė. Atliksime du bandymus: piešime kvadratus *xy* plokštumoje. Prie fizinio roboto modelio kairiosios priekinės kojos pritvirtinsime pieštuką (24 pav.) ir užprogramuosime robotą nupiešti du kvadratus: vieną per keturis kvadrato taškus (25 pav.), antrą – per aštuonis taškus (26 pav.).

**24 pav.** Bandymams (piešimui) paruošta roboto koja (Tomo Lunecko nuotrauka).




a b

**25 pav.** Kvadrato piešimas esant keturiems taškams: a – nustatytas kvadratas piešimui, b – nupieštas kvadratas [12] (Tomo Lunecko nuotrauka).




a b

**26 pav.** Kvadrato piešimas esant aštuoniems taškams: a – nustatytas kvadratas piešimui, b – nupieštas kvadratas [12] (Tomo Lunecko nuotrauka).

Matyti, kad koja trajektorija juda tiksliau, kai taškų yra daugiau. Tačiau didelę įtaką kojos judėjimui tarp gretimų trajektorijos taškų turi kiekvienos tarpinės padėties apskaičiavimas mikroprocesoriumi. Tarpinės padėtys apskaičiuojamos pagal tokią formulę [12]:

žingsnis = (nauja_padėtis – esama_padėtis) / (žingsnių_skaičius).

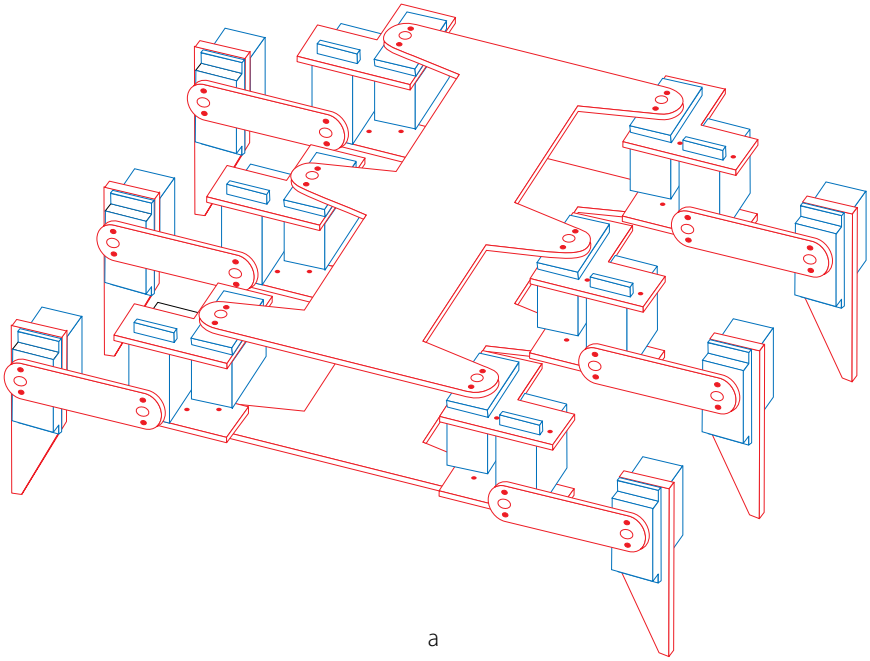
Gautas žingsnis sumuojamas su esama padėtimi ir taip gaunama kita tarpinė padėtis. Kadangi mikroprocesorius operuoja sveikaisiais skaičiais, kai kuriais atvejais susidaro netikslios tarpinės padėtys, todėl numatyta ir reali judėjimo trajektorija nevisiškai sutampa.

# 8. Roboto modelio tobulinimas

Atlikus roboto žingsniavimo ir trajektorijos tikslumo eksperimentinius bandymus su fiziniu roboto modeliu, pastebėta, kad net ir pakoregavus trikoję roboto eiseną roboto judėjimas nėra visiškai stabilus. Be to, roboto judesiai nesklandūs, o pėdų trajektorijos netikslios. Todėl reikia tobulinti ne tik patį roboto žingsniavimą, bet ir pėdų trajektorijų generavimo[6] metodą. Be to, norint užtikrinti sklandų roboto judėjimą būtina aprašyti viso roboto judesius. Sudaryta roboto valdymo programa nepatogu keisti roboto judesius, nes jie buvo atliekami tiesiogiai pakeičiant servomechanizmų valdymo signalus. O yra 18 servomechanizmų, todėl norint pakeisti roboto judesius, reikia pakeisti 18 parametrų – tai labai nepatogu ir gali būti labai painu. Todėl nusprendžiame sukurti paprastesnį roboto valdymo metodą.

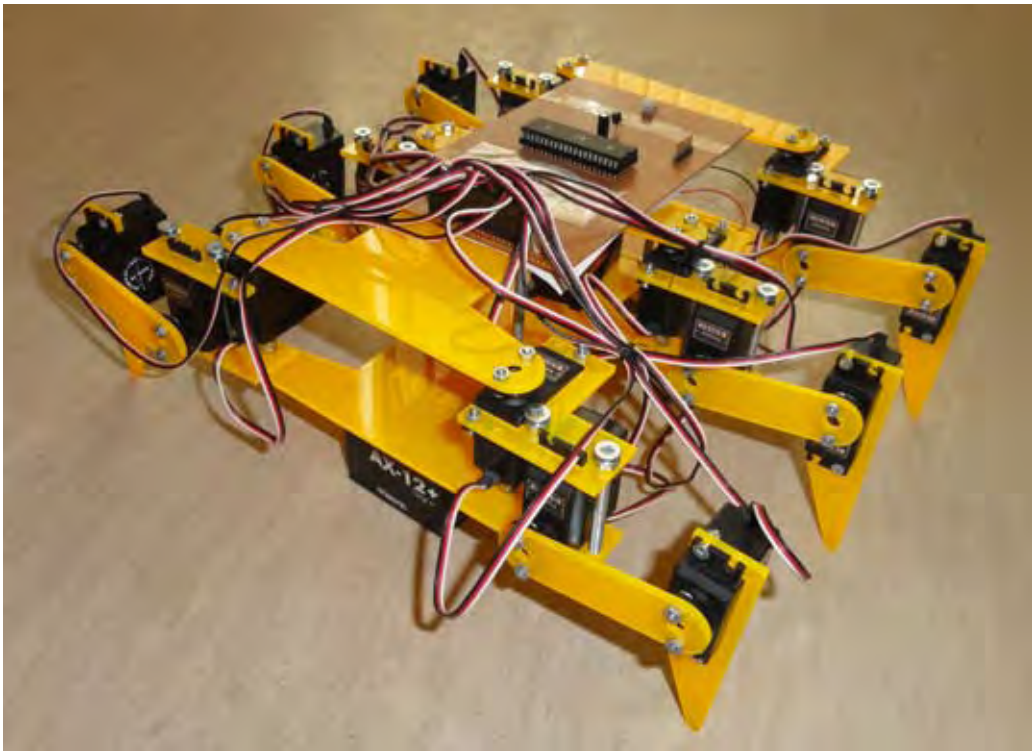
Atliekant eksperimentus su fiziniu roboto modeliu paaiškėjo, kad servomechanizmai sunkiai išlaiko robotą, be to, jie nepasisuka 180° kampu, todėl nusprendžiame perdaryti roboto mechanines dalis ir sutrumpinti šlaunikaulio ilgį (27 pav.).

[6] Trajektorija gali būti aprašyta matematiškai ir kiekvienas jos taškas skaičiuojamas realiu laiku. Arba visi trajektorijos taškai apskaičiuojami ir išsaugomi atmintyje. Kitaip tariant, trajektorijos taškai yra parenkami ne ranka, o apskaičiuojami pagal kokį nors dėsnį.



a

**27 pav., a.** Antrojo roboto kompiuterinis 3D modelis.



b

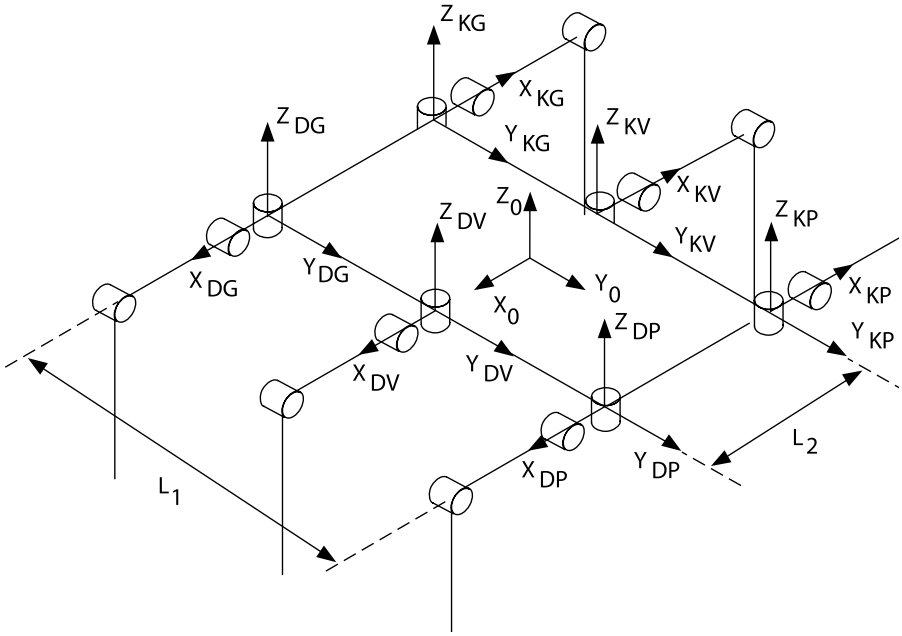
**27 pav., b.** Antrasis robotas (Tomo Lunecko nuotrauka).

Be to, šį sykį pasirenksime teisingesnį įrenginio kūrimo būdą. Jei pirmasis robotas buvo gaminamas iš karto, tai šiuo atveju nusprendžiame pirmiausia sukurti tikslų roboto kompiuterinį modelį, jį patikrinti, atlikti įvairius tyrimus ir tik tada pagaminti fizinį modelį.

## 8.1. Roboto korpuso kinematikos skaičiavimai

Šešiakojis robotas yra sudėtingas elektromechaninis įrenginys, turintis 18 laisvės laipsnių. Norint robotą pastumti į kitą padėtį ar pasukti roboto korpusą apie jo ašis, reikia pakeisti visų 18 roboto vykdiklių (servomechanizmų) kampus. Taigi, reikia spręsti atvirkštinės kinematikos uždavinį 18 laisvės laipsnių sistemai, o tai gali būti labai sudėtinga.

Tokį uždavinį galima išspręsti gana paprastai naudojant transformacijų matricas ir atvirkštinės kinematikos uždavinį vienai kojai. Pirmiausia roboto korpusui ir kojų pagrindams turi būti priskirtos atitinkamos koordinačių sistemos (28 pav.).




**28 pav.** Koordinačių sistemų priskyrimas.

Tada sudaromos posūkio bei poslinkio transformacijų matricos. Posūkio matricos sudaromos roboto korpusui, o poslinkio – kiekvienos kojos pagrindui. Posūkio matricos roboto korpusui:

$$\mathbf{R}_{x_0} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\alpha & -\sin\alpha & 0 \\ 0 & \sin\alpha & \cos\alpha & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \ \mathbf{R}_{y_0} = \begin{bmatrix} \cos\beta & 0 & \sin\beta & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\sin\beta & 0 & \cos\beta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \mathbf{R}_{z_0} = \begin{bmatrix} \cos\gamma & -\sin\gamma & 0 & 0 \\ \sin\gamma & \cos\gamma & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

Poslinkio matricos kiekvienos kojos pagrindui[7]:

$$\mathbf{T}_{\mathrm{DP}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & x_0 + L_2/2 \\ 0 & 1 & 0 & y_0 + L_1/2 \\ 0 & 0 & 1 & z_0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \mathbf{T}_{\mathrm{DV}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & x_0 + L_2/2 \\ 0 & 1 & 0 & y_0 \\ 0 & 0 & 1 & z_0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \ \mathbf{T}_{\mathrm{DG}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & x_0 + L_2/2 \\ 0 & 1 & 0 & y_0 - L_1/2 \\ 0 & 0 & 1 & z_0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

[7] Šios koordinačių sistemos yra priskiriamos toms vietoms, kur kojos jungiasi su roboto korpusu.

$$\mathbf{T}_{\mathrm{KP}}=\begin{bmatrix}1&0&0&x_0-L_2/2\\0&1&0&y_0+L_1/2\\0&0&1&z_0\\0&0&0&1\end{bmatrix};\ \mathbf{T}_{\mathrm{KV}}=\begin{bmatrix}1&0&0&x_0-L_2/2\\0&1&0&y_0\\0&0&1&z_0\\0&0&0&1\end{bmatrix};\ \mathbf{T}_{\mathrm{KG}}=\begin{bmatrix}1&0&0&x_0-L_2/2\\0&1&0&y_0-L_1/2\\0&0&1&z_0\\0&0&0&1\end{bmatrix}.$$

Sudauginus visas posūkių matricas $\mathsf{R}_{x_0}$, $\mathsf{R}_{y_0}$, $\mathsf{R}_{z_0}$ su kiekviena poslinkio matrica $\mathsf{T}_{DP}$, $\mathsf{T}_{DV}$, $\mathsf{T}_{DG}$, $\mathsf{T}_{KP}$, $\mathsf{T}_{KV}$ ir $\mathsf{T}_{KG}$ gaunamos matricos, transformuojančios kojų pagrindų koordinates į roboto korpuso koordinačių sistemą:

$$\mathsf{B}_{DP}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{DP},\ \mathsf{B}_{DV}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{DV},\ \mathsf{B}_{DG}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{DG},$$

$$\mathsf{B}_{KP}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{KP},\ \mathsf{B}_{KV}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{KV},\ \mathsf{B}_{KG}=\mathsf{R}_{x_0}\mathsf{R}_{y_0}\mathsf{R}_{z_0}\mathsf{T}_{KG}.$$

Kojų pagrindų koordinatės roboto korpuso koordinačių sistemoje:

$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{DP}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0+L_2/2)-\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\gamma(y_0+L_1/2);\\
y_{\mathrm{DP}}&=(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0+L_1/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{DP}}&=(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)+(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0+L_1/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{DV}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta-y_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0+L_2/2);\\
y_{\mathrm{DV}}&=y_0(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{DV}}&=y_0(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)+(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

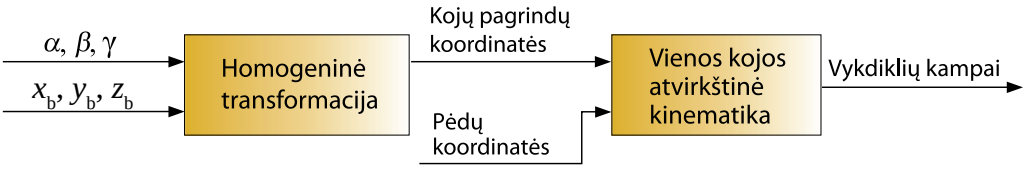
$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{DG}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0+L_2/2)-\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\gamma(y_0-L_1/2);\\
y_{\mathrm{DG}}&=(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0-L_1/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{DG}}&=(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0+L_2/2)+(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0-L_1/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{KP}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0-L_2/2)-\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\gamma(y_0+L_1/2);\\
y_{\mathrm{KP}}&=(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0+L_1/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{DP}}&=(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)+(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0+L_1/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{KV}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta-y_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0-L_2/2);\\
y_{\mathrm{KV}}&=y_0(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{KV}}&=y_0(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)+(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
x_{\mathrm{KG}}&=z_0\,\mathrm{S}\beta+\mathrm{C}\beta\,\mathrm{C}\gamma(x_0-L_2/2)-\mathrm{C}\beta\,S\gamma(y_0-L_1/2);\\
y_{\mathrm{KG}}&=(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\gamma+\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)+(\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma-\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0-L_1/2)-z_0\,\mathrm{C}\beta\,\mathrm{S}\alpha;\\
z_{\mathrm{KG}}&=(\mathrm{S}\alpha\,\mathrm{S}\gamma-\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\beta)(x_0-L_2/2)+(\mathrm{C}\gamma\,\mathrm{S}\alpha+\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{S}\beta\,\mathrm{S}\gamma)(y_0-L_1/2)+z_0\,\mathrm{C}\alpha\,\mathrm{C}\beta.
\end{aligned}$$

Taikant atvirkštinę kinematiką vienai kojai, nesunku apskaičiuoti visų vykdiklių posūkių kampus. Tiesiog reikia rasti kiekvienos pėdos padėtį pakitus roboto padėčiai: $x = l_2 + x_f - x_b$; $y = y_f - y_b$; $z = -(l_1 + l_3) + z_f - z_b$. Visus kinematinius skaičiavimus galima pavaizduoti schema (29 pav.).




**29 pav.** Roboto kinematinių skaičiavimų diagrama.

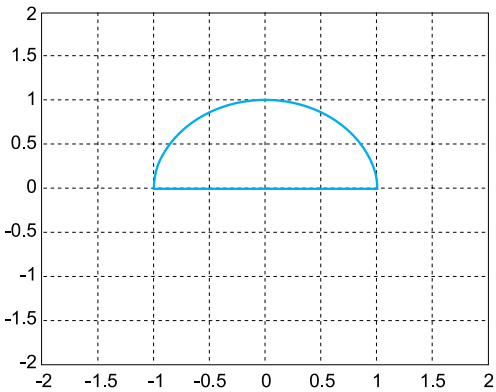
## 8.2. Pėdų trajektorijų generavimas

Iš ankstesnių eksperimentų matyti, kad pateiktos pėdų trajektorijos neužtikrina roboto ėjimo stabilumo, be to, kojų judesiai nėra sinchronizuoti, jie tiesiog daromi paeiliui. Todėl nusprendžiame taip valdyti roboto judėjimą, kad kiekvienos pėdos padėtis būtų keičiama pagal tikruoju laiku generuojamą trajektoriją. Šitoks trajektorijos generavimas taip pat leidžia nesunkiai keisti roboto eiseną.

Vienas iš būdų generuoti roboto pėdų trajektorijas yra keisti kiekvienos pėdos koordinates pagal tam tikrą dėsnį. Optimalios pėdų trajektorijos jau yra apskaičiuotos kituose darbuose [13]. Norint, kad roboto pėdos judėtų pusapskritimiu (30 pav.), pusę periodo $y$ koordinatė turi kisti pagal sinuso dėsnį, $z$ pagal kosinuso, $x$ visada lygi 0, kitą periodo pusę $y$ turi kisti pagal sinuso dėsnį, $z = 0$, $x = 0$. Reikiamas funkcijas padauginę iš kintamųjų $l$ ir $h$, galime keisti žingsnio aukštį ir ilgį.

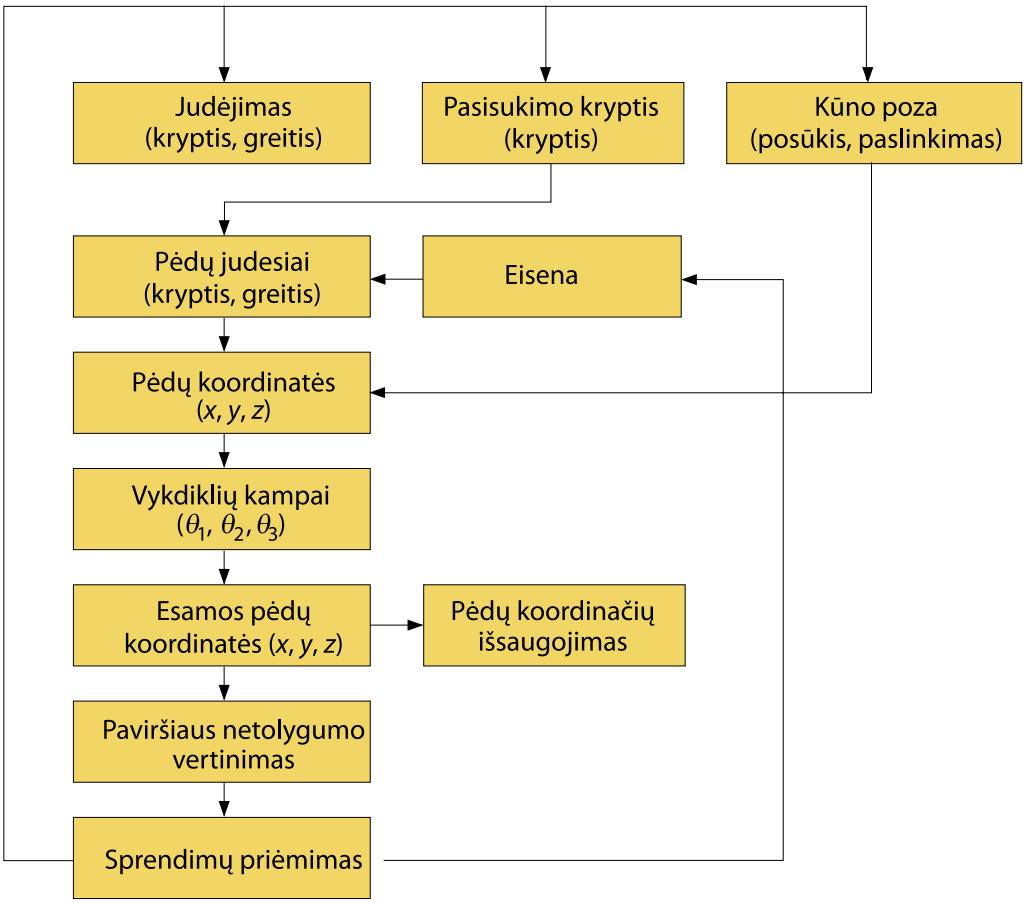
Kai $0 \le t < \pi$: $x = 0$, $y = l\sin(\pi t + \varphi)$, $z = h\cos(\pi t + \varphi)$.
Kai $\pi < t \le 2\pi$: $x = 0$, $y = 0$, $z = h\cos(\pi t + \varphi)$.

```
%DP pedos trajektorija
if (cos(pi*t+DP_ph)>=0)
    DP_y=l*sin(pi*t+DP_ph);
    DP_z=h*cos(pi*t+DP_ph);
    DP_x=DP_y*tan(alfa);
else
    DP_y=l*sin(pi*t+DP_ph);
    DP_z=0;
    DP_x=DP_y*tan(alfa);
end
```




**30 pav.** *MATLAB* pėdos trajektorijos aprašas ir pėdos trajektorija.

*Supaprastintas roboto valdymo metodas*. Kuriant naują, paprastesnį šešiakojo roboto valdymo metodą svarbu sumažinti valdymo komandų skaičių iki minimumo. Robotą galima valdyti keliomis pagrindinėmis valdymo komandomis: *Judėjimas, Pasisukimo kryptis* ir *Kūno poza* [14]. Supaprastintą roboto valdymo metodą galima pavaizduoti grafiškai (31 pav.).



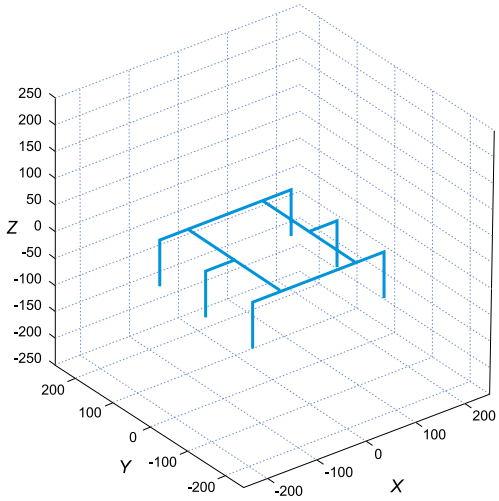

**31 pav.** Šešiakojo roboto supaprastinto valdymo algoritmas [14].

## 8.3. Roboto modeliavimas MATLAB

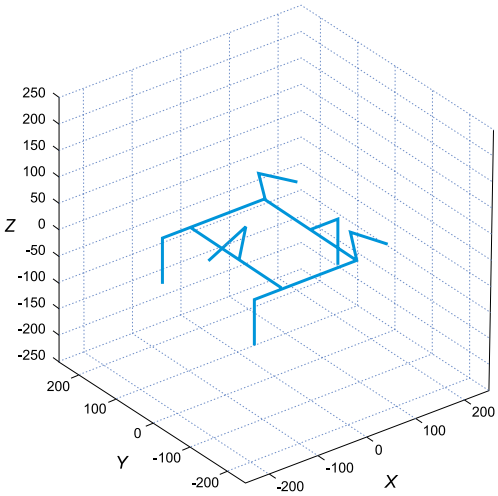
Kuriant bet kokius įrenginius, jų kompiuterinis modeliavimas yra pats geriausias būdas sužinoti, kaip jie veiks. Taip pat juos galima pigiai ir saugiai išbandyti įvairiomis sąlygomis ir atlikti reikalingus pakeitimus. Būtent todėl buvo imta kurti šešiakojo roboto kompiuterinį modelį. Roboto modelis kuriamas aprašant jį tekstine programavimo kalba. Iš tikrųjų, roboto modelis – tai visų anksčiau aptartų skaičiavimų susiejimas ir pavaizdavimas grafiškai. Taip aprašius roboto modelį nesunku sukurti fizinio roboto modelio valdymo programą. Ir laiko daug sutaupoma, nes klaidos programose lengviau pataisomos nei fiziniame modelyje, kurį kartais gali tekti ir išmesti dėl vienos ar kitos klaidos. Robotas modeliuojamas naudojant *MATLAB*, nors tai ne pati tinkamiausia programa robotų modeliavimui, tačiau jos programas galima automatiškai konvertuoti, pavyzdžiui, į C kalbą, kuria bus programuojamas robotas. *MATLAB* nesunkiai galima atlikti ir kitokius tyrimus, pvz., patikrinti trajektorijų generavimo metodus ir pan.

Kaip jau minėta, roboto modelį iš tikrųjų sudaro visų skaičiavimų (vienos kojos atvirkštinės kinematikos, viso roboto atvirkštinės kinematikos, trajektorijų generavimo ir kt.) susiejimas ir jų rezultatų grafinis pavaizdavimas. Taip modeliuojant galima laisvai keisti įvairius roboto parametrus ir stebėti, kaip keičiasi roboto kojų trajektorijos, kūno poza, roboto judėjimo greitis, kryptis ir kt.

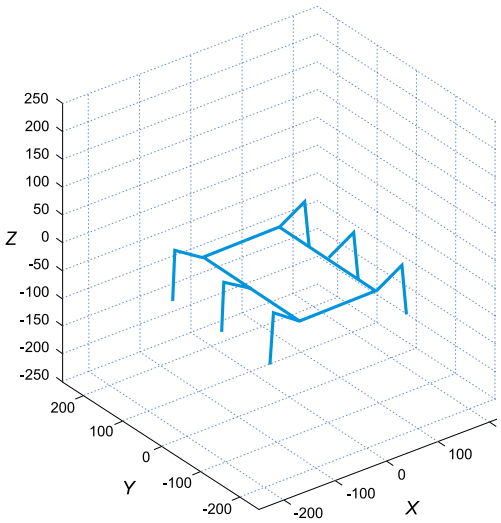
32–35 pav. parodyti keli kompiuterinio roboto modelio bandymai.



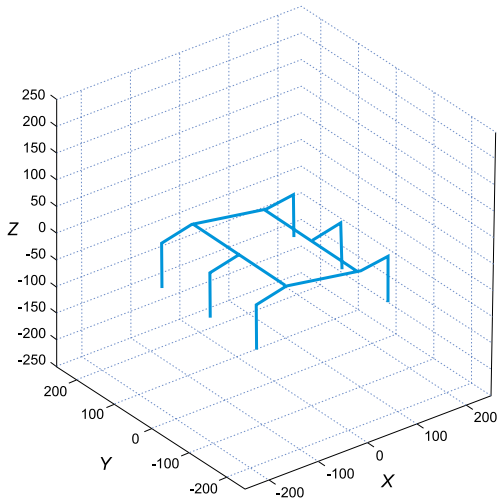

**32 pav.** Neutralios būsenos robotas.




**33 pav.** Roboto DP, DG ir KV kojos iškeltos į 100 mm aukštį.




**34 pav.** Roboto korpusas, nuleistas žemyn *z* ašimi 30 mm.




**35 pav.** Roboto korpusas, pasuktas apie *y* ašį 10°.

# 9. O kas toliau?

Tolesnis darbo tikslas – sukurti pėdų trajektorijų generavimo metodą, kuris leistų paprastai keisti roboto eiseną. Tai turėtų būti atliekama skirtingos kojos pėdų trajektorijos išraiškose įrašant skirtingas fazes, tačiau gauti tokių trajektorijų matematines išraiškas nėra paprasta. Kitas svarbus tikslas – sukurti paprastą paviršiaus netolygumų atpažinimo metodą.

Gilinantis į darbą gims vis naujų roboto tobulinimo idėjų. Vienas didžiausių šešiakojų robotų trūkumų – mažas greitis. O gal verta sekti vabzdžiais ir ... sukurti skraidantį šešiakojį robotą? Toks robotas, esant reikalui, didelį atstumą galės įveikti skrisdamas.

# Literatūra


1. Siegwart R., Nourbakhsh I. R., *Introduction to autonomous mobile robots*, London: A Bradford Book, 2004.
2. http://bdml.stanford.edu/twiki/bin/view/Rise/StickyBot
3. Currie J., Beckerleg M., Collins J. 2008, Software Evolution of A Hexapod Robot Walking Gait. *Proceedings of 15th International Conference on Mechatronics and Machine Vision in Practice*, 305–310.
4. Vukobratovic M., Borovac B. 2004, Zero-moment point – thirty five years of its life. *International Journal of Humanoid Robotics*, 1(1), 131–147.
5. Faber F., Behnke S. 2007, Stochastic Optimization of Bipedal Walking using Gyro Feedback and Phase Resetting. *Proceedings of: IEEE-RAS 7th International Conference on Humanoid Robots (Humanoids)*, 203–209.
6. Doshi F., Brunskill E., Shkolnik A. et al. 2007, Collision Detection in Legged Locomotion using Supervised Learning. *IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems,* 317–322.
7. Luneckas T., Udris D. 2009, Optimization of hexapod robot locomotion. *Proceedings of the 4th International Conference on Electrical and Control Technologies*, Kaunas: Technologija, 40–43.
8. http://www.learnaboutrobots.com/inverseKinematics.htm
9. Luneckas T. 2010, Šešiakojo roboto eisenos tyrimas. *Elektronika ir elektrotechnika*, 2, 36–39; http://www.mla.vgtu.lt/index.php/mla/article/download/mla.2010.008/106
10. http://petercorke.com/Robotics_Toolbox.html
11. Parker G. B., Braun D. W., Cyliax I. 1997, Evolving hexapod gaits using a cyclic genetic algorithm. *Proceedings of the IASTED International Conference on Artificial Intelligence and Soft Computing*, 141–144.
12. Luneckas T., Udris D. 2009, Research of hexapod robot motion in irregular terrain. *Solid State phenomena*,164, 431–434.
13. Alonso-Puig A. 2005, Application of Waves Displacement Algorithms for the Generation of Gaits in an All Terrain Hexapod. *Climbing and Walking Robots*, 343–348.
14. Luneckas T., Udris D. 2010, The simplified hexapod robot control method. *Proceedings of the 5th International Conference on Electrical and Control Technologies*, Kaunas: Technologija, 37–40.

# Kai kurios sąvokos

**Dinaminis stabilumas** – roboto būsena, kai net robotui stovint ramiai reikia papildomos įrangos ir judesių, kad jis išlaikytų pusiausvyrą.

**Grandis, mechanizmo grandis** – viena, dažniau kelios nejudamai sujungtos mechanizmo detalės.

**Kinematika** – mechanikos dalis, nagrinėjanti geometrines judėjimo savybes neatsižvelgiant į kūno masę ar jį veikiančias jėgas.

**Kinematinė grandis** – kinematinėmis poromis susietų grandžių sistema.

**Kinematinė pora** – dviejų susiliečiančių grandžių judamasis sujungimas.

**Laisvės laipsniai** – kūno ar atskiro jo mazgo galimų nepriklausomų judesių skaičius.

**Mikroprocesorius** – loginis įtaisas, apdorojantis duomenų srautą, atliekantis skaičiavimus, valdantis išorinius įtaisus pagal įrašytą programą.

**Prievadas** – mikroprocesoriaus jungtis, prie kurios jungiami kiti schemos elementai arba išoriniai įrenginiai.

**Programuotuvas** – įrenginys programoms įrašyti į mikroprocesorius.

**Servomechanizmas** – variklio, judesio perdavimo mechanizmo (reduktoriaus) ir valdymo grandinės sistema.

**Statinis stabilumas** – roboto būsena, kai jis gali stovėdamas išlaikyti pusiausvyrą be papildomos įrangos ir judesių.

**Trajektorijos generavimas** – norimos trajektorijos taškų apskaičiavimas pagal matematinį dėsnį.

**Transformacijos matrica** – speciali matrica transformacijoms tarp koordinačių sistemų 2D (dvimatėje) arba 3D (trimatėje) erdvėje apskaičiuoti.

**Valdiklis** – specialus procesorius kitiems įtaisams, įrenginiams ar sistemoms valdyti.

**Vykdiklis** – mechaninis įrenginys mechanizmų ar sistemų judesiui kurti. Vykdikliai įėjimo signalą (dažniausiai elektrinį, pneumatinį ar hidraulinį) keičia sukamuoju arba slenkamuoju mechaniniu judesiu.

**Reduktorius** – mechanizmas, kuris perduodamas judesį sumažina (padidina) išėjimo grandies sukimosi greitį ir padidina (sumažina) sukimo momentą.

Jaunojo tyrėjo vadovas ©

Projekto *Mokinių jaunųjų tyrėjų atskleidimo ir ugdymo sistemos sukūrimas leidinys*

2007–2013 m. Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 3 prioriteto „Tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ VP1-3.2-ŠMM-02-V priemonė „Žinių apie mokslą ir technologijas gilinimas ir sklaida tarp moksleivių ir jaunimo bei lyčių lygybės moksle skatinimas“

Lietuvos mokinių informavimo ir techninės kūrybos centras
Žirmūnų g. 1B, LT 09101 Vilnius

Rengiant dalyvavo UAB „EVS Group“, Ukmergės g. 369a-425, LT 12142 Vilnius

Maketavo ir spausdino UAB „Lodvila“, Sėlių g. 3A, LT 08125 Vilnius

Jaunojo tyrėjo vadovas internete: www.jaunasis-tyrejas.lt

ISBN 978-9955-899-07-5

internete

ISBN 978-9955-899-08-2

Tiražas 3000 egz.

Kuriame Lietuvos ateitį

Švietimo ir mokslo ministerija