

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

БОТАНИКА КАФЕДРАСИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ
фанидан
(Сиртқи таълим шакли 4-курс хорижий биология талабалари)

РАҚАМЛИ-УСЛУБИЙ ТАЪМИНОТ

Тайёрловчи доцент: САТТАРОВ А.С

Термиз-2021

Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги томонидан 2018 йил “7” 01 даги “1”-сонли буйруғи билан тасдиқланган фан дастури асосида ишлаб чиқилган.

Тузувчи:

Сатторов А.С Термиз давлат университети Ботаника кафедраси катта ўқитувчиси, биология фанлари номзоди.

Такризчи:

Бегматов А.М Термиз давлат университети Ботаника кафедраси доценти, биология фанлари номзоди.

Наджиев Ж.Н Тошкент давлат Аграр университети Термиз филиали кафедра мудири, Қишлоқ хужалиги фанлари доктори.

Термиз давлат университети Илмий-Услубий кенгашининг _____2021
йил даги ____-сонли баёни асосида фойдаланишга тавсия этилган.

МУНДАРИЖА

№	Ўқув-услубий мажмуа бўлимлари	бет
1.	Маърузалар матни	
1.1	Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари.(2с)	
1.2.	Ферментлар муҳандислиги.(2с)	
1.3.	Ферментларни иммобиллаш. Иммобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари.(2с)	
1.4.	Ферментлар иштирокидаги технологик жараёнлар.(2с)	
1.5.	Ген муҳандислиги. (2 с)	
1.6.	Ўсимлик ген муҳандислиги. (2 с)	
1.7.	Ҳайвон ген муҳандислиги (2 с)	
1.8.	Ҳужайра муҳандислиги. (4 с) 8.1 Ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш. Ҳужайра культуралари. 2с) 8.2 Биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш. (2с)	
1.9.	Табиий органик бирикмалар биотрансформацияси. (2 с)	
	Жами маъруза соат 20	
	Лаборатория машғулоти мавзулари	
2.1	Чиқиндисиз технология яратиш. (4с)	
2.2	Фермент фаоллигини аниқлаш (2с)	
2.3	Ферментни меъёрий кўрсаткичларини аниқлаш. (2с)	
2.4	Ферментларни ковалент иммобиллаш. (2с)	
2.5	Ферментни бифункционал агент орқали иммобиллаш. (2с)	
2.6	Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш. (2с)	
2.7	Чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш (2с)	
2.8	Бактерия полисахаридларини ажратиш олиш. (2с)	
2.9	Биогас олиш учун органик чиқиндиларга ишлов бериш (4с)	
2.10	Биогас олиш учун микроорганизмлар ассоциациясини яратиш. (4с)	
	Жами Лаборатория машғулоти соати 26 соат	
5	Мустақил таълим машғулоти	
6	Глоссарий	
7	Иловалар	
8	Фан дастури	
9	Ишчи фан дастури	
10	Тарқатма материаллар	
11	Тестлар	
12	Баҳолаш мезонлари	

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ**

ТАБИЙ ФАНЛАР ФАКУЛЬТЕТИ

БОТАНИКА КАФЕДРАСИ

**БИОТЕХНОЛОГИЯ
ФАНИДАН**

МАЪРУЗАЛАР МАТНИ

Тузувчи:

б.ф.н. А.Сатторов

Термиз – 2021

1-МАЪРУЗА.

КИРИШ. БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАНИНИНГ ПРЕДМЕТИ, МАҚСАДИ ВА ВАЗИФАЛАРИ.(2С)

Режа:

1. Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари
2. Биотехнологиянинг ривожланиш тарихи
3. Биотехнологиянинг замонавий йўналишлари ва тадқиқот усуллари
4. Биотехнологиянинг саноат, соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигидаги аҳамияти
5. Биотехнологияда қўлланиладиган асосий методлар.
6. Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши

***Таянч сўзлар:** Биотехнология, ҳозирги замон биотехнологияси, классик биотехнология, саноат биотехнологияси, ҳужайра муҳандислиги, ген инженерияси, культура, Микроорганизм, Молекуляр биотехнология, йўналишлар, вазифалар, қўлланиладиган методлар.*

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3. Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

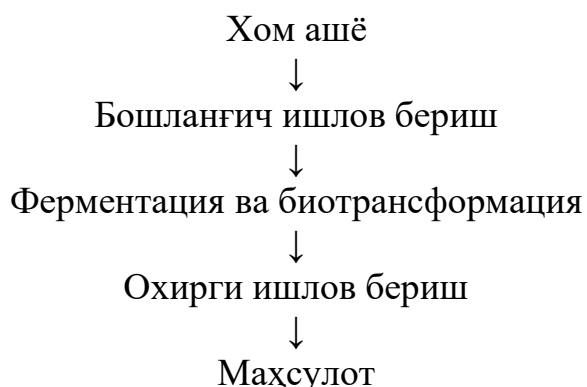
1.Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари

Маълумки, биологияга бошқа табиий фанлар – физика, химия, математика каби фанларнинг татбиқ қилиниши натижасида замонавий биология ривожланди. XX асрнинг иккинчи ярмида биохимия, молекуляр генетика ва молекуляр биология соҳаларида эришилган фундаментал тадқиқотларнинг ютуқлари ҳужайра фаолиятини турли механизмлар ёрдамида бошқариш имконини берди. Биология соҳасида яратилган оламшумул янгиликлар ва ишланмалар замонавий биотехнологияни ривожланишига тurtки бўлди ва улар куйидагилардир:

- Биологик системалардаги ирсий ахборотни сақланиши ва авлоддан-авлодга узатилишида нуклеин кислоталар ролини исботланиши;
- Барча тирик организмлар учун универсал ҳисобланган генетик код тузилишини аниқланиши;
- Организмлар бир авлодининг ҳаёти жараёнида генлар фаолиятини бошқариш механизмларини очиб берилиши;
- Микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон ҳужайралари культурасини олишнинг маълум бўлган технологияларни мукаммаллаштириш ва янги технологияларини яратилиши;
- Генетик ва ҳужайра инженерияси методларини ривожланиши ва улар ёрдамида саноат миқёсида ишлатиладиган организмларнинг юқори маҳсулдор шакллари яратиш.

“Биотехнология” терминини 1917 йилда венгер инженери Карл Эреки киритган. Унинг таърифига кўра “**биотехнология** – бу тирик организмлар

ёрдамида хом ашёдан у ёки бу маҳсулот олинадиган ишларнинг барча туридир”, яъни биотехнологик жараёнларнинг схемаси қуйидагичадир:



Биотехнологияни 3 та асосий қисмга бўлиш мумкин:

1. Саноат биотехнологияси. Бунда биотехнологик жараёнлар амалга ошишининг умуий тамойиллари ўрганилади, биотехнологиянинг асосий объектлари ва уни қўллаш мумкин бўлган соҳалар, микроорганизмлар ишлатиладиган бир қатор кўп масшабли саноат биотехнологияси билан танишилади.

2. Хужайра муҳандислиги. Бу қисмнинг асосий мақсади — хужайра культурасини олиш ва бу объектлардан амалиётда фойдаланиш билан таништиришдир. Бунда ҳайвон ва ўсимлик хужайралари культурасини олиш усуллари билан таништирилади. Хужайра биотехнологияси ёрдамида селекцияда чидамли, маҳсулдорлик ва сифатли ўсимлик ва хужайраларнинг муҳим формалари ва линияларини олиш, қимматли генотипларни кўпайтириш, озиқ овқат, ем ва тиббиётда ишлатиладиган қимматли биологик фаол моддаларни олиш тезлашди.

3. Ген инженерияси. Замонавий биотехнологиянинг асосий ютуғи генетик трансформация, яъни бегона ген ва бошқа ирсий белгиларни ташувчи материалларни микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон хужайраларига ўтказиш, янги белги ва хусусиятли трансген организмларни олишдир.

Биотехнологиянинг вазифалари:

- Керакли маҳсулотларни ишлаб чиқариш учун биологик объектлар, система ва жараёнлардан фойдаланиш;
- Микроорганизмлар, хужайра культуралари ва уларнинг алоҳида компонентларидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш мақсадида биохимик, микробиологик ва инженерлик билимларини комплекс қўллаш;
- Турли типдаги фойдали маҳсулотларни олиш ва кўпайтириш учун биологик жараёнлардан фойдаланиш;
- Керакли маҳсулотлар олиш ёки сервис технологиясини яратиш мақсадида биологик агентлар ёрдамида ишлов бериш учун илмий ва инженерлик принциплардан фойдаланиш.

Биотехнология сўзи грекча сўзлар йиғиндиси бўлиб, «биос» - ҳаёт, «техне» - санъат, техника ва «логос» – тушунча, таълимот маъноларини билдиради.

Биотехнология йўналишларининг вазифалари қуйидагилардир:

- Соғлиқни сақлаш соҳасида турли касалликларни даволаш, диагностикаси ва профилактикаси учун янги биологик актив моддалар ва доривор препаратларни яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги ўсимликларини касаллик қўзғатувчилар ва зараркунандалардан ҳимоялашнинг биологик воситаларини, бактериял ўғитлар ва ўсимлик ва ҳайвонларнинг ўсиш регуляторларини; ноқулай атроф-муҳит омилларига чидамли янги ўсимлик навларини ҳамда фойдали хусусиятга эга бўлган янги ҳайвон зотларини (трансген ҳайвонлар)ни яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг маҳсулдорлигини ошириш учун қимматли озуқа қўшилмаларини (озукавий оқсил, аминокислоталар, витаминлар, озукаларни ҳазм қилишга ёрдам берувчи ферментлар ва б.) яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги ва ветеринарияда турли мақсадларда қўлланадиган юқори самарали препаратларни биоинженерлик методлари ёрдамида яратиш;
- Озиқ-овқат, кимёвий ва микробиологик саноат учун қимматли маҳсулотларни яратиш ва уларни олишнинг янги технологияларини яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги, саноат ва маиший чиқиндиларидан келгусида фойдаланиш мумкин бўлган маҳсулот олиш учун қайта ишлашнинг янги технологияларини яратиш ва уларни амалда қўллашдир.

Демак, **биотехнология** – илмий-техникавий прогресснинг предметлараро соҳаси бўлиб, у биологик, кимёвий ва техник билимлар тўқнашувида вужудга келган бўлиб, у янги биотехнологик жараёнларни яратишга қаратилгандир. Бу жараёнлар аксарият ҳолларда паст температурада амалга ошади, кам миқдорда энергия сарфланади ва бошланғич хомашё сифатида арзон субстратлар ишлатилади.



Биотехнология азалдан маълум бўлган инсонлар ишлатиб келатган анъанавий жараёнлар, яъни пиво, вино тайёрлаш, пишлоқ ишлаб чиқариш, шарқ ширинликларини тайёрлаш, ҳамда чиқиндиларни қайта ишлаш каби жараёнларни ўз ичига олади. Бу жараёнларнинг барчасида биологик объектлар қатнашади.

Биотехнологияда янги ишланмаларни яратиш, ривожлантириш ва жараёнлардан оптимал фойдаланиш мақсадида кимё, микробиология, биокимё, молекуляр биология, кимёвий технология ва компьютер техникаси методларидан кенг фойдаланилади.

Биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

Сана	Воқеалар
1917	Карл Эрки «биотехнология» терминини киритган
1943	Саноат миқёсида пенициллин ишлаб чиқарилган
1944	Эвери, Мак Леод ва Мак Картилар генетик материал ДНКдан тузилганлигини кўрсатиб беришган
1953	Уотсон ва Крик ДНК молекуласининг тузилишини аниқлашган
1961	“Биотехнология ва биоинженерия” журнали таъсис этилган
1961-1966	Генетик код расшифрован
1970	Биринчи рестрицион эндонуклеаза ажратиб олинган
1972	Тўлиқ ҳажмли тРНК гени синтез қилинган
1973	Рекомбинант ДНК технологиясига асос солинган
1975	Моноклонал антитела олинган
1976	Рекомбинант ДНКни олиш бўйича йўриқнома ишланган

1976	ДНКнинг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш методи ишлаб чиқилган
1978	Э.соли ёрдамида инсон инсулини ишлаб чиқилган
1982	Рекомбинант ДНК технологияси бўйича олинган 1 вакцинани ҳайвонларда қўллашга рухсат берилган
1983	Гибрид Ти–плазмидадан фойдаланиб ўсимликлар трансформацияланган
1988	Полимеразанинг занжир реакцияси методи яратилган
1990	Инсоннинг соматик ҳужайрасидан фойдаланиб ген терапияси синаш режаси тасдиқланди
1990	“Инсон геноми” лойиҳаси бўйича ишлар бошланди
1994-1995	Инсон хромосомасининг генетик ва физик харитаси чоп этилди
1996	Рекомбинант ДНК катта миқдорда сотилди
1997	Соматик ҳужайрадан сут эмизувчи клонлаштирилди

Ўзбекистонда биотехнологияни фан сифатида икки йўналишини кўриш мумкин:

1. Ҳозирги замон биотехнологияси.
2. Классик биотехнология.

Ҳозирги замон биотехнологияси ген ва ҳужайра муҳандислиги усуллари генетик трансформация қилнган объектларни яратиш технологиялари, улар орасида турли маҳсулотларни ишлаб чиқаришдир.

Классик биотехнология эса табиий биологик объектлардан фойдаланган ҳолда турли моддаларни ишлаб чиқариш усуллари ва технологияларидир (нон пишириш, пиво, вино, сирка, қатик тайёрлаш).

Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши ва шаклланишини ЎЗР ФА акад. О.С.Содиқов номидаги биоорганик Кимё институти ташкил этилганидан билишимиз мумкин. Ушбу институт 1977 йилда Ўзбекистон Республикаси ФА таркибидаги биоорганик кимё бўлими (1973 й.) негизида ташкил этилган. Институтнинг асосий илмий йўналиши ҳайвон ва ўсимликлар организмидаги биоорганик кимё жараёнларини, яъни юқори ва қуйи молекуляр табиатга эга бўлган биологик фаол моддаларнинг тузилиши, функцияси ўрганилиб, уларни синтетик усулда олиш йўллари ишлаб чиқилди. Табиий биологик фаол модда – госсиполнинг полиморф модификацияси комплекс ҳосил қилиши биринчи бўлиб исботланди ва унинг асосида йигирмадан ортиқ янги дорилар, биологик моддалар асосида эса 30 дан ортиқ дори препаратлари олинди. Булардан вирусларга қарши ишлатиладиган 3%ли госсипол линименти, иммуномодулятор - тимоптин, қон тўхтатувчи “Лагоден”, хламидияга қарши қўлланиладиган доривор восита “Полиниль” ва биоорганика институтининг тажриба синов базасида ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда қўлланилмоқда. Жаҳон андозаларига мос келадиган пахта мойини ва кам госсиполли пахта кунжарасини олиш технологияси ишлаб чиқилиб,

Ўзбекистон Республикасининг кўпчилик ёғ-мой экстракция заводларида лицензия асосида қўлланилмоқда.

Биотехнология соҳасида Ўзбекистон асосан Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг микробиология институтида, генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтида ҳамда Республика Кимё бирлашмасига қарашли бир қатор заводларда ишлар олиб борилмоқда. Биотехнология ихтисослиги биринчи ўзбек академики А.Г.Холмуродов (1939-1996) фузалиум авлодига мансуб замбуруғлардан НАД структура-функционал боғлиқлигини ўрганиш ҳайвон ва ўсимликлардан ажратиб олинган иккиламчи маҳсулотларни қайта ишлашнинг жаҳон стандартларига мос келадиган янги технологияларини ҳамда ўсимликларни ҳимоя қилувчи экологик тоза воситаларни олиш устида тадқиқотлар олиб боришдан иборат. Институтда олиб борилган юқори ва қуйи молекуляр биорегуляторларни комплекс тадқиқ этиш натижасида заҳарли жониворлар заҳаридан 50 дан ортиқ биологик фаол оксил ва пептидлар ажратиб олинди. Улардан 15 дан ортигининг кимёвий тузилиши ва таъсир механизми ўрганилди. Ғўзадан фитогормонларнинг рецепторлари ажратиб олинди ва физик-кимёвий хоссалари ўрганилди, уларнинг пахта баргини тўкишдаги регуляторлик роли исботланди. Натижада ғўза дефолиациясида рўй берадиган жараённинг молекуляр механизми кўрсатилди ва дефолиацияловчи ҳамда ўсишни тезлаштирувчи фаолликка эга бўлган бирикмаларни танлаш кўрсаткичлари ишлаб чиқилди. Ғўза ўсиши жараёнида организм фермент системаларининг пахта толаси ҳосил бўлишидаги роли ўрганилди ва целлюлоза биосинтези жараёнининг молекуляр механизми исботланди. Ўсимликлар зараркунанда ҳашоротлари феро коферменти ва витаминлар комплекси (В гуруҳига кирувчи витаминлар, витамин РР, А ва ҳ.к.) тайёрлаш технологиясини яратди.

Профессор К.Д.Давронов томонидан ёғ парчаловчи фермент-липаза тайёрлаш технологиясини «Ер малҳами» биопрепаратини яратди. Бу препарат азот ютувчи микроорганизмлар асосида тайёрланган бўлиб, мамлакатимиз қишлоқ хўжалигида қўлланилмоқда. Бундан ташқари К.Д.Давронов раҳбарлигида целлюлоза лигнин биокаркасини (ғўзапоя, сомон, каноп пояси, қиринди ва б.) махсус тайёрланган базидиомецитларнинг ферментлари иштирокида табиий целлюлоза – лигнин бирикмалари парчаланиши амалиётда кўрсатиб берилди.

Академик М.И.Мавлоний Ўзбекистонда учрайдиган ачитки замбуруғларни таҳлил қилиб, уларни новвойчилик, виночилик ва чорвачиликка қўл келадиган турларини олди ва улар асосида махсус хамиртурушлар ва виночилик учун ачитки тайёрлаш технологияларини яратди.

Микробиология институти олими Ж.Тошпўлатов сомон ва ғўзапояни парчалашда «Триходерма ҳарзнанум» замбуруғи ферментларидан фойдаланиш мумкинлигини илмий асослаб берди. Бу технология қўлланилганда сомонда шакар миқдори 6-7% га етгани, витаминлар, аминокислоталар пайдо бўлиб, сомонни озуқа бирлиги бир неча баробар ошганлиги исботлаб берилган.

Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

Биотехнология фани Ўзбекистон учун энг кенжа фанлардан бўлиб, уни тарихи узоққа бормади (қадимий биотехнологиялар; нон ёпиш, қатик тайёрлаш ва х.к. бундан истисно). Бу фан асосан Ўзбекистон Фанлар Академиясининг микробиология институтида, генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтида ҳамда Республика Кимё бирлашмасига қарашли бир қатор заводларда (Янгийўл биокимё заводи, Андижон гидролиз заводи, Қўқон спирт заводи) ривожланиб келмоқда.

Биотехнология ихтисослиги бўйича биринчи ўзбек академиги А.Г.Холмуродов (1939-1996) фузариум авлодига мансуб замбуруғлардан НАД-коферменти ва витаминлар комплекси (В гуруҳига кирувчи витаминлар, витамин РР, Қ 10 ва х.к.) тайёрлаш технологиясини яратди. Академик М.И.Мавлоний Ўзбекистонда учрайдиган ачитқи замбуруғларни таҳлил қилиб, уларни нонвойчилик, виночилик ва чорвачиликка қўл келадиган турларини топди ва улар асосида махсус хамиртурушлар ва виночилик учун ачитқи тайёрлаш технологияларни яратди.

Профессор Қ.Д.Давранов МДХ мамлакатларида биринчилардан бўлиб ёғ парчаловчи липаза ферментини тайёрлаш технологиясини яратди. Бу ферментни кўп шаклилиги сабабларини таҳлил қилатуриб, ҳар бир биотехнологик жараён учун ўзига хос спецификликка эга бўлган липаза ферменти зарур деган фикрга келди ва буни амалиётда тасдиқлаб берди. Қ.Д.Давранов яратган "Ер малҳами" биопрепарати, азот ўзлаштирувчи микроорганизмлар асосида тайёрланган бўлиб, мамлакатимиз Қишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Бундан ташқари Қ.Д.Давранов раҳбарлигида целлюлозалигинин биокаркасини (ғўзапоя, самон, каноп пояси, қипиқ ва бошқалар, махсус тайёрланган базидиомицетларнинг ферментлари иштирокда табиий целлюлозалигинин бирикмалари парчаланишини амалиётда кўрсатиб берилди.

Б.ф.д. Ж.Ташпулатов, сомон ва ғўзапояни парчалашда "триходерма харзианум" деб аталлиш замбуруғ ферментларидан фойдаланиш мумкинлигини илмий асослаб берди ва бу технологияни амалиётга қўллаш таклиф ва мулохазаларини чоп этди. Ж.Ташпулатов яратган бу технология қўлланилганда сомонда шакар миқдори 6-7%га етгани, унда витаминлар, аминокислоталар пайдо бўлганлиги ва шу туфайли сомонни озиқа-бирлиги бир неча баробар ошганлиги исботлаб берилган.

Ўзбек олимларидан Т.Г.Гуломова, З.Р.Ахмедова, С.М.Ходжибоева, З.Ф.Исмоилов, И.Ж.Жуманиёзов ва бошқалар мамлакатимизда микроб биотехнологиясининг ривожлантириш устида чуқур илмий ва амаллий ишлар олиб бормоқдалар. Шунингдек, марҳум профессорлар М.М.Муродов ва Т.Ю.Юсуповлар олиб борган чуқур илмий изланишлар асосида катта илмий амалий назариялар яратилган.

Юқорида фикр этилган уч заводда (Андижон гидролиз заводи, Қўқон спирт заводи, Янгийўл биокимё заводларида) спирт олиш учун зарур бўлган амилаза ферментини ишлаб чиқариш бўйича чуқур изланишлар олиб борилмоқда

Бу каби биотехнологик ишлаб чиқариш назарияларини яратиш, уни амалиётга тадбиқ этиш ишлари юзасидан ЎзФА Микробиология институти ва Тошкент Давлат Аграр Университети Қишлоқ хўжалик биотехнологияси кафедраси ҳамда Ўсимликлар биотехнологияси лабораторияси олимлари фаол илмий изланишлар олиб бормоқдалар.

Мамлакатимиз равнаки, унинг иқтисодини янада ошириш мақсадида энг аввало қуйидаги биопрепаратларни ишлаб чиқаришни йўлга қўймоқ зарур:

- ✓ *Озиқ-овқат ва чорвачилик учун оқсил моддалари;*
- ✓ *Аминокислоталар;*
- ✓ *Органик кислоталар (лимон кислотаси ва уни урнини босадиганлар);*
- ✓ *Антибиотиклар (биринчи навбатда 4 - 5 авлодга мансуб антибиотиклар);*
- ✓ *Витаминлар;*
- ✓ *Ўсимликларни ҳимоя қилиш воситалари ишлаб чиқариш.*

Афсуски, юқоридагилар ҳозиргача мамлакатимизга ташқаридан, валютага келтирилади. Олимларимизни, қолаверса бугунги кунда таълим олаётган талабаларни олдиларига қўйиладиган кўп сонли масалаларни энг долзарблари юқоридагилардан иборат.

3. Биотехнология фанинг ривожланиш истиқболлари ва муаммолари

Микроб биотехнологиясининг ривожланиш тарихи кўп маънода XX-асрнинг иккинчи ярми билан боғлиқ. утган асрнинг 40- йилларида микроорганизмлардан пенициллин олиш технологиясининг яратилиши бу фан ривожига ижобий бурилиш ясади. Пенициллин ишлаб чиқарилишининг йўлга қўйилиши ва муваффақият билан ишлатилишида кейинги авлод антибиотикларини қидириб топиш, уларни ишлаб чиқариш технологияларини яратиш ва қўллаш усуллари устида ишларни ташкил қилиш зарурлигини олдиндан белгилаб қўйди. Бугунги кунда юздан ортиқроқ антибиотиклар ишлаб-чиқариш технологиялари ҳаётга тадбиқ қилинган.

Антибиотиклар ишлаб-чиқариш билан бир қаторда аминокислоталар, ферментлар, гормонлар ва бошқа физиологик фаол бирикмалар тайёрлаш технологиялари ҳам яратила бошланди. Бугунги кунда медицина ва қишлоқ хўжалиги учун зарур бўлган аминокислоталар (айниқса организмда синтез булмайдиган аминокислоталар), ферментлар ва бошқа физиологик фаол моддалар ишлаб чиқариш технологиялари йўлга қўйилган.

Охирги 20-30 йилда, айниқса микроб оқсиллини олиш технологияси ривожланиб кетди. Қишлоқ хўжалиги учун ута зарур булган бу маҳсулотни ишлаб чиқариш билан бир қаторда ундан унумли ва оқилона фойдаланиш

йуллари амалга оширилмоқда. Оксил ишлаб чиқаришда ҳар хил чиқиндиларидан (зардоб, гушт қолдиқлари) ва парафиндан фойдаланиш мумкинлиги тасдиқланган. Ҳозирги пайтда бунинг учун метан ва метанолдан фойдаланиш мумкинлиги ҳам курсатиб ўтилган.

Кейинги вақтда микроб биотехнологиясининг ривожланиши иммобиллашган (махсус сорбентларга боғланган) ферментлар ва микроорганизмлар тайёрлаш технологияларини яратилиши билан узвий боғлиқ бўлди. Иммобилизация қилинган ферментларни ҳар хил жараёнларда ишлатилиши (ферментлар муҳандислиги) бу биокатализаторлардан фойдаланишни янада фаоллаштириб юборди. Эндиликда ферментлар бир маротаба эмас, бир неча маротаба (ҳатто бир неча ойлаб) ишлатиладиган бўлиб қолди.

Микроорганизмлар фаолияти ва имкониятидан фойдаланиш, уларни ҳосилдор турларини (штаммаларини) яратиш билан боғлиқ. Бундай вазифани микробиологлар билан узвий ҳамкорликда генетиклар ва ген муҳандислиги усулларида хабардор бўлган бошқа мутахассислар амалга оширадilar. Микроб препаратларини ишлаб чиқаришни фаоллаштиришнинг яна бир йули икки ёки ундан ортиқ бўлган, бириккинчисини фаоллигини ошириб бераоладиган (симбиозда ишлайдиган) микроорганизмлар ассоциациясидан фойдаланишдир. Бу йул ҳозирги вақтда ферментлар, антибиотиклар, витаминлар ва метан газини олишда ҳамда оқова сувларни тозалаш жараёнларида кенг қўлланилиб келинмоқда.

Микроб биотехнологиясининг асосини микроб фаолияти ташкил қилар экан, фаол микроорганизмларни сақлаш, (энг аввало фаглардан ва ташқи муҳит таъсиридан) шароитларини аниқлаш энг муҳим вазифалардан биридир.

Юқорида айтиб ўтилганлар, микроб биотехнологиясининг ривожланиши бир қатор ута муҳим муоммоларини ечиш билан боғлиқ бўлади ва бу муоммоларни ечишда на фақат микробиологлар, биокимёгарлар, биотехнологлар, балки муҳандислар ва технологлар иштирок этишлари зарур бўлади.

Бу эса, микроб биотехнологияси фанини яхши узлаштириб олиш учун юқорида эслаб ўтилган фанлардан хабардор бўлмоқликни тақозо этади.

Назорат учун саволлар

- 1. Биотехнология фани нимани урганади ?*
- 2. Классик биотехнология усуллари тушинтиринг?*
- 3. Молекуляр биотехнологиянинг ривожланиш тарихи?*
- 4. Биотехнология йўналишларининг вазифалари?*
- 5. Биотехнологиянинг вазифалари?*

2-МАЪРУЗА. ФЕРМЕНТЛАР МУХАНДИСЛИГИ.(2С)

Режа:

1. Ферментларни олиш технологияси
2. Ўсимлик ва ҳайвон органларидан ферментлар ажратиб олиш
3. Микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиб олиш усуллари
4. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.
5. Чўктириш усуллари ва унинг назарияси.
6. Ферментларни тозалаш усуллари. Биоспецифик хроматография

***Таянч сўзлар:** фермент препаратлари, чўктириш, тузлар, тозалаш методлари, органик эритувчилар, диализ, баромембрана.*

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3. Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Ферментлар муҳандислигининг асосий вазифаси – биологик система ёки тирик ҳужайралардан ажратиб олинган ферментларнинг каталитик хусусиятларидан фойдаланган ҳолда биотехнологик жараёнларни яратишдир. У янги маҳсулотларни олиш, уларнинг сифатини яхшилаш ва иқтисодий кўрсаткичларини кўтариш билан боғлиқ бўлган масалаларни ечади. Ҳозирги кунда амалиётда ферментлар кенг қўлланади.

Маълумки, ферментлардан органик синтезларни катализатори сифатида фойдаланилади. Шунга қарамай, ферментларнинг “нозик” томони ҳам бордир, яъни уларнинг бузилишидир. Улар кам чидамли моддалар бўлиб, нозик макромолекуляр структурали оксиллардир. Улар ташқи таъсир остида осонгина ўз хоссасини йўқотади.

Ферментлар катализаторлигида кечадиган реакциялар мураккаб механизмга эга. Уларнинг активлигини ташқи муҳитнинг ўзгариши, унинг кислоталилиги, уларни активлаштирувчи ёки сусайтирувчи қўшимча моддалар қўшиш билан бошқариш мумкиндир.

Ферментлар манбаи турли ҳайвон, ўсимликларнинг тўқималари, микроорганизмлар бўлиши мумкин. Ферментлар қайси бири кераклиги ва қайси бирини олиш қулайлигига қараб танланади.

Яқин даврларгача амалий мақсадларда ҳайвон ва ўсимлик ферментларидан фойдаланиб келинган. Ҳайвонлардан олинадиган ферментлар гўшт саноатининг йўлдош маҳсулотлари ҳисобланади. Барча тўқима ва ҳужайралар ичида ферментларга бой орган ошқозон ости безидир. Ундан таркибида бир қатор гидролитик ферментлар (амилаза, протеаза, липаза ва б.) тутган комплекс препаратлар олинади. Масалан, ошқозон ости безидан панкреатин - қуритилган экстракт олинади.

Ҳайвон хомашёларидан айрим ферментларнинг тозаланган препаратлари - пепсин, трипсин, химотрипсин, реннин (химозин), рибонуклеаза, ДНКаза, липаза, гиалуронидаза, каталаза ҳам ажратиб олинади.

Ўсимликлардан саноат миқёсида протеолитик ферментларнинг айрим препаратлари - папаин (қовун дарахти мевасининг шарбатидан), фицин (анжир барги ва *Фицус* оиласига мансуб ўсимликлардан) ажратиб олинади.

Шу билан бирга ўсимликлардан фермент ажратиб олиш иқтисодий жиҳатдан самарали эмас, чунки сарфланадиган ўсимликка нисбатан олинадиган маҳсулот кам миқдорда бўлади. Ундан ташқари ҳар доим ҳам исталган минтақада керакли ўсимликни ўстириш имкони йўқ.

Ҳайвонлардан ферментларни ажратиб олишда ҳам айрим қийинчиликлар туғилади. Шунинг учун ҳозирда ферментлар манбаи сифатида микроорганизмлардан кенг фойдаланилмоқда.

Микроорганизмлар – фермент олиш учун жуда қулай манба ҳисобланади, чунки уларнинг ҳужайрадаги концентрациясини микроорганизм ўсишини тезлатиш ёки генетик манипуляция ҳисобига ошириш мумкин. Микроорганизмлар тез ўсади, арзон муҳитларда ўсади ва турли ферментларга бойдир.

Микроб ферментлари ҳозирда ўсимлик ва ҳайвон ферментлари ўрнини босмоқда. Қатор ферментлар медицина диагностикасида ҳам ўзига хос ўрин эгаллаб келмоқда. Масалан, холестериноксидаза қон зардобидаги холестерин, уреаза эса сийдик кислотаси миқдорини миқдорини ўлчашда ишлатилади. Ген муҳандислиги тадқиқотларида эса рестриктацион эндонуклеазалар ва лигазалар ишлатилади.

Микробиологик усулда олинган ферментлар пластмасса ишлаб чиқаришда ҳам ўрин эгаллайди.

Қаттиқ ёки суюқ озук муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг культураси ва уларнинг культурал суюқликлари таркибида жуда кўп миқдорда балласт моддалар бордир. Ферментларни ажратиш ва тозалаш - кўп меҳнат ва харажат талаб қилувчи жараёндир, агарда фермент препарати микроорганизм культураси кўринишида ишлатилса, у тозаланмайди. Спирт ва терини ошлаш тармоқларида тозаланмаган микроорганизмлар культурасини ишлатиш мақсадга мувофиқдир ва худди шундай микроорганизмларни қишлоқ хўжалигида ем-хашак тайёрлашда ёки фермаларда емларни қайта ишлашда қўллаш мумкин.

Озиқ-овқат саноатининг бир қанча тармоқларида (нон, пиво, вино, пишлоқ, крахмал ва шарбат экстракция қилувчи), ҳамда текстил, мўйна ва микробиологик саноатларда, шу жумладан тиббиётда балласт моддалардан қисман ёки тўлиқ тозаланган, яъни фақат тоза фермент препаратлари ишлатилади.

Тоза фермент препаратларини олишнинг бошланғич материали бўлиб филтрланган культурал суюқлик, продуцентнинг биомассаси ёки қаттиқ озук муҳитда ўстирилган культуранинг сувли экстракти хизмат қилади. Фермент препаратлари кукун ёки суюқ концентрат кўринишида олинishi мумкин. Ажратиш жараёнида препаратнинг йумий массасида фаол оксилнинг нисбий улуши, яъни унинг улуший фаоллиги оптади.

Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.

Тозаланмаган фермент препарати - микроорганизм культурасини мўътадил шароитда намлиги 8-12% га олиб келинган ва бутун озуқа муҳити қолдиқлари билан биргаликдаги массасидир.

Тозаланмаган фермент препарати культурани қаттиқ ёки суяқ озуқа муҳитида ўстириш йўли билан олиниши мумкин. Суяқ муҳитда ўсган культура қуритишдан олдин биомассаси ва озуқа муҳити қолдиқларидан қисман тозаланган ёки шундайлигича қуритилган бўлади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизм культураси одатда 35 дан 58 % гача намликка эга бўлади. Бундай маҳсулот чидамсиз бўлганлиги сабабли уни тезда ишлаб чиқаришга жорий қилиш ёки намлигини 10-12% гача қуритиб олиш керак. Қуритиш жараёнидан олдин, ўстириш хонасидан олинган микроорганизм майдаланади ва кейин қуритилади

Микроорганизм культураларини қуритиш учун тасмали, тоннелли, шахтали, барабанли, жавонли (шкафли) ва тебранувчан қуритгичлардан фойдаланиш мумкин. Ишлаб чиқаришда, юқорида қайд қилинганларига нисбатан кўпроқ тўғри йўналтирилган барабан типидagi қуритгичлар ишлатилади. Бунда хўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85°C да қуритгичга тушади. Бундай юқори ҳароратда қуритилувчи хўл микроорганизмларнинг майда бўлақларидаги намни буғланиши ҳисобига қаттиқ қизиб кетиш ҳолати кузатилмайди ва ундаги ферментларнинг фаоллиги тўлиқ сақланади. Кўпчилик барабанли қуритгичларнинг ички томонида парраксимон куракчалар мавжуд бўлиб, барабан 6-8 мин⁻¹ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материални бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди. Шунинг учун бундай типдаги қуритгичда қуритилган маҳсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу қуритгичда микроорганизм бўлақчалари 3-7 мин. давомида қуритилади, берилаётган иссиқлик тезлиги 2-3 м/с, 80-85°C ҳароратда ҳамда чиқишда эса 60-65°C бўлади ва қуритилаётган материал ҳарорати 40°C дир. Қуритиш жараёнида атиги 3-10% гача фермент фаоллиги йўқотилиши мумкин.

Микроорганизмларни қуритишда ишлатилadиган қуритгичларнинг яна бир тури – герметик берк бўлган лентали буғ конвейерли қуритгичдир. Бундай қурилмаларда ферментнинг фаоллиги кўп йўқотилади, лекин улар ихчам ва юқори самарадорликка эга.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмларни қуритиш учун ҳар хил конструкцияли қуритгичлардан фойдаланиш мумкин, қайсики маҳсулотнинг фаоллиги пасайишини минимумгача туширишни, унинг қуритгичда 5-8 мин. давомида бўлиши ва чиқишида 40-42°C дан пастда бўлишини таъминлайди.

Тайёр қуруқ микроорганизмлар махсус қоплаш машиналарида 25-40 кг қилиб қопланади ва тайёр маҳсулотлар омборига юборилади.

Кўпчилик продуцентлар синтез қилган ферментларнинг асосий қисмини суяқ озуқа муҳитига чиқарадилар ва тўплайдилар. Тоза фермент

препаратларини продуцентнинг биомассаси билан биргаликда фильтрларда, центрифугаларда ёки сепараторларда ажратилади.

Микробиология саноатида асосан ташқи томони билан фильтрловчи ячейкали-барабанли тўхтовсиз ишловчи вакуум фильтрлар ишлатилади. Бу фильтрлар юқори даражада механизациялаштирилган бўлиб, ҳар хил суспензияларни бир хил тезликда фильтрлаш имконини беради. Барабаннинг сирти тўрсимон бўлиб, бўз ёки фильтрловчи сунъий газлама билан ўралган ва у фильтрланувчи суюқликка чўктирилган бўлади. Фильтрловчи сиртда тўпланган ҳар хил эримаган компонент ва биомасса махсус пичоқ ёрдамида тозаланади.

Барабан фильтрлар биомассани ажратиш учун жуда қулай, лекин улар паст самарадорлиги, қўполлиги ва асептика шароитларини таъминлай олмаслиги билан ажралиб туради.

Фермент саноатида кўпинча рамали фильтр-пресс ҳам ишлатилади. Махсулот қўл ишига асосланган ҳолда олинади. Рамали фильтр-прессларнинг фильтрловчи ҳажми кичик бўлганлиги сабабли барабанли вакуум-фильтрга нисбатан ҳам кам самарадордир. Рамали фильтрда фильтрлаш жараёни 0,6-0,4 Мпа босим остида олиб борилади. Одатда фильтратнинг биринчи қисми тиник бўлмайди ва у қайта фильтрланади.

Фильтр-пресснинг камчиликлари горизонтал камерали типдаги ФПАКМ да бирмунча бартараф этилган. У устма-уст жойлашган фильтрловчи плиталар ва фильтрловчи газламадан иборат. Ушбу ускунанинг иши автоматлаштирилган ва иш юзаси 2,5 дан 50 м² ҳажмга зга. Нисбий самарадорлиги бошқаларига нисбатан 6-8 марта юқори ва фермент фаоллиги 4-5% атрофида йўқотилади. Уларни ишлаб чиқаришга жорий қилиш жуда истикболли ва бактериялар культурал суюқлигини фильтрлашда жуда қўл келади.

Фермент саноатида 8СМ типдаги сепараторлар ҳам кенг қўлланилади. Улар ичига барабан ўрнатилган идиш кўринишида бўлади. Барабанларнинг ичида цилиндрик тўсиқлар ўрнатилган бўлиб, юқори тезликдаги марказдан қочма куч ҳисобига унинг тагида чўкма ҳолида биомасса ва бошқа компонентлар чўқади. Сепараторнинг самарадорлиги юқори бўлиб, 2000-5000 л/с гача етади. Бизда АСЭ-3, АСИ, АСЭ-Б типдаги сепараторлар ҳамда "Альфа-Лаваль" (Швеция) фирмасининг соплולי сепараторлари ишлатилади.

Биомассани фильтрлаш самараси ишлатилаётган ускуна типига, озуқа муҳит таркибига, ажратиладиган бўлакчалар катта-кичиклигига, эримаган фракциялар миқдorigа, фильтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Фильтрлаш жараёнини яхшилаш мақсадида культурал муҳит кимёвий қайта ишланади, яъни ишқорийлиги рН 8-8,5 га келтириб 0,1%ли СаСл эритмаси ва ҳар хил кизелгурлар (диатомит, радиолит, микрозил, кларгель ва х.к.) қўшилади. Бу тўлдирувчилар фильтрлаш самарасини оширади, лекин фермент фаоллигига салбий таъсир қилади. Олинган биомасса (биошрот) стерилизация қилинади ва қуритилиб чорва молларига ем сифатида ишлатилади. Культурал

суёқлик фильтроти эса тоза фермент препарати олиш учун қайта ишлашга юборилади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлардан ферментларни экстракция қилиш. Барча ферментлар асосан сувда эрувчандир. Шунинг учун энг яхши экстрагент бўлиб сув ҳисобланади. Микроорганизмлардан ферментларни олиш учун улар майда қилиниб хужайра деворлари механик ёки автоматик ҳолда бузилиб, экстракция жараёнига жалб этилади. Бу усулда ҳам хўл ҳолдаги, ҳам қуруқ ҳолдаги микроорганизмдан фермент эритмасини олиш мумкин. Биомассадан фермент экстракциясини тўлиқ амалга ошириш учун ҳарорат, рН, жараён давомийлиги, экстракция ускунасининг конструктив хусусиятлари, ажратилаётган фермент табиати ва бошқа бир қанча омилларга боғлиқ. Бу омиллар ҳар бир продуцент мисолида алоҳида тадқиқотлар ёрдамида аниқланади ва тавсия этилади. Масалан, ҳарорат экстракция жараёнига катта таъсир кўрсатади, яъни жуда кўп ферментлар термолабил бўлиб, ҳаттоки 35-40°C да инактивацияга учрайди. Шунинг учун завод шароитида иложи борица сувнинг ҳарорати 22-25°C да ушлаб турилади ва ҳар бир микрофлора ўсмаслиги учун антисептиклардан (формалин, бензол, толуол, хлороформ ва х.к.дан фойдаланилади. Кўпчилик ҳолатларда ферментларни рН 5-7 кўрсаткичида тўлиқ ажратиб олиш мумкин.

Биошрот билан ферментларни кам исрофгарчилиги асосида қуюқлаштирилган экстрактлар олиш учун махсус экстракция ускуналарини ишлатиш керак. Бу қурилмада экстракция қилинаётган микроорганизм ферменти нисбатан кўп фаолликни йўқотади ва қўл ишига асосланади.

Вакуум-буғлантириш усулида фермент эритмаларини қуюқлаштириш. Қаттиқ ва суёқ озуқа муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг экстрактлари сақлаш учун чидамсиздир. Тайёр техник препарат формаларини (П2х ва Г2х) олиш ва уларни қуюқлаштириш керак. Қуруқ техник ёки тоза фермент ппрепатларини вакуум-буғлантириш усули ҳам бир босқич бўлиб ҳисобланади.

Одатда ферментлар буғлантириш ҳароратига жуда таъсирчан бўлади. Шунинг учун қуюқлаштиришнинг асосий шартини паст ҳароратда қайнатиш ва жараёни қисқа муддатда олиб бориш билан бирга, буғлантирилаётган суёқликни қизиқ кетиши ва ферментлар инактивацияга учрашини олдини олишдир. Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутади ва ундаги фермент юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда ҳимояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясини олдини олади, лекин культурал суёқликни қуюқлаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда фаоллигини йўқотади. Қуюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бирмунча ўзгаради, қуруқ модда ҳисобига эса 11-20 %га камаяди ва қуюқлашган экстрактнинг рН кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентнинг турига қараб уларнинг культурал суёқликлари ҳам ҳар хил кимёвий таркибга

ва ферментлар комплексига эга бўлганлиги учун, вакуум-буғлантиришнинг ҳарорат режимлари тадқиқот йўли билан аниқланади.

Фермент фаоллигини қуюқлаштириш жараёнида йўқотилиши нафақат уни олиб борилиш режимига, балки ускуна ёки қурилманинг конструкциясига ҳам боғлиқдир. Кейинги йилларда вакуум-буғлантириш ускуналари анча такомиллаштирилмоқда. Ушбу ускуналар трубка шаклида (горизонтал, вертикал ва қия) бўлиб, жараённи ўтиш муддатини 10 мартабага яқин қисқартирди ва ферментни фаоллигини йўқолишини бир мунча камайтирди. Булар жумласига «Альфа-Лаваль» (Швеция), «Единство» (Югославия), «Люва» (Швейцария), «АПВ» (Франция) ва б. бир қанча фирмалар ускуналарини киритиш мумкин ва уларнинг самарадорлиги 200 дан 20000 л/с ни ташкил қилади ҳамда ферментни фаоллиги 10% атрофида йўқотилади.

Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш Мембранали тозалаш усулига диализ ва электродиализ, баромембранали усулга эса қайтарилувчи осмос, ультрафилтрация, микрофилтрация ва нозик филтрация кабилар киради.

Эритмадаги моддаларни диализ усулида ажратиш – мембранани модда массасига қараб танлаб ўтказувчанлик хусусиятига асосланган. Бу жараён учун яримўтказгич мембрананинг ҳар икки томонида эритмалар концентрациясини фарқи вужудга келиши керак. Диализ жараёнини ушбу тенглик билан ифодалаш мумкин:

$$K = D \Delta C / \Delta C$$

Бунда, K – маълум вақт ичида мембранадан ўтган модда миқдори, D – диализ коэффициент, C – мембрана сиртининг юзаси, ΔC – мембрананинг ҳар икки томонидаги моддаларнинг концентрацияси фарқи.

Диализдан фермент препаратларини кичик молекулали моддалардан тозалашда фойдаланилади. Масалан, фермент эритмаларини шакар, аминокислоталар, минерал тузлар ва бошқалардан 60-100% гача бўлган миқдорда тозалашга эришиш мумкин. Айниқса, ферментлар юқори концентрацияли тузлар билан чўктирилганда диализдан ва электродиализдан унумли фойдаланиш керак. Лекин тўртламчи структурага эга бўлган ферментларни ва металлоферментларни ажратишда электродиализдан фойдаланиш мумкин эмас, яъни фермент ушбу жараёнда ўз фаоллигини йўқотади.

Диализ жараёни жуда секин ўтувчи жараёндир, ҳамда эритманинг миқдори кўп бўлганда, жуда кўп миқдорда мембрана сарфланади. Диализда қуйидаги ҳар хил кўринишдаги яримўтказгич мембраналар ишлатилади, пергамент, целлофаннинг ҳар хил турлари, ультрафилтрацияда ишлатиладиган мембраналар ва бошқалардир. Диализ усули бир қанча камчиликларга эга бўлганлиги сабабли ҳозирги кунда ишлаб чиқаришда ишлатилмайди. Баъзан илмий лабораторияларда ферментларни юқори тозаликда олиш учун ишлатилиши мумкин.

Баромембрана усули ишлатиладиган мембраналар тирқишларининг катта-кичиклигига қараб синфланади. Масалан, қайтарилувчан осмос ($\approx 3 \times 10^{-4}$

мкм); гельфилтрация (15x10,5 мкм); микрофилтрация (0,2 мкм) ва нозик филтрация (10 мкм) дир.

Қуюқлаштириш ва тозалашнинг қайтарилувчан осмос ва ультрафилтрация усуллари кимё, нефтни қайта ишлаш, озиқ-овқат, фармацевтика ва фермент саноатларида жуда кенг тарқалган. Энг асосийси, жараёни жуда ҳам кам ҳаражатлар ва энергия эвазига олиб борилишидир. Ультрафилтрация жараёнида ферментларни ҳарорат таъсиридаги инактивацияси умуман бартараф қилинган бўлиб, бирваракайига эритма бир қанча балласт бирикмалардан хона ҳароратида тозаланади. Ушбу жараён юқори босим остида ўтганлиги учун самарадорлиги ҳам юқоридир. Бу усулнинг ҳам асосий элементи бўлиб мембраналар ҳисобланади. Ҳозирги кунда целлофандан, каучукдан, полиэтилендан, полистеролдан, целлюлозадан ва б. бир неча хил материаллардан тайёрланган мембраналар ишлатилмоқда.

Мембраналар хусусиятига қараб 0,05-0,2 мкм ли бир қаватли – изотроп ва икки қаватли – анизотроп турларига бўлинади.

Чўктириш усуллари ва унинг назарияси. Саноат учун зарур бўлган кўпчилик ферментлар сувда эрувчан оксиллардир. Фермент эритмалари олиниш манбаларига қараб микроорганизмлар лизатлари, экстрактлари, культурал суёқлик филтратлари, ўсимлик ёки ҳайвон тўқималари гомогенатлари булиши мумкин. Бу фермент эритмалари таркиби жуда мураккаб системага эга. Унда ферментлардн ташқари коллоид табиатига эга бўлган ҳар хил бирикма ва моддалар ҳам учрайди. Бундай мураккаб системалардан ферментларни ажратиб олиш мушкул вазифадир.

Маълумки, оксилнинг гидрофоб гуруҳлари оксил молекуласи ичида тўпланиб ҳаракат жойлашади. Оксилнинг ҳар хил эритувчиларда эриш даражаси молекула сиртида гидрофоб ва гидрофил қолдиқларнинг тарқалиши билан белгиланади. Оксилларни асосий эритувчиси бўлган сувнинг баъзи хусусиятларини (ҳарорат, рН, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчиларни ёки инерт бирикмаларни кўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига оксил молекуласининг гидрат ёки сольват қатламига таъсир қилиб агрегацияга учратиш ва чўкмага тушириш мумкин. Саноатда асосан органик эритувчилар ёки тузлар билан чўктиришдан фойдаланилади. Бу усуллар бир-биридан чўктириш механизми билан фарқланади.

Нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш. Бу жараён асосан оксил молекуласининг гидрофоблиги даражасига боғлиқ. Типик оксил молекуласи сиртида бир қатор аминокислоталар (тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин, валин ва фенилаланин) занжири шаклида ёпишган гидрофоб қисмларга эга. Оксил молекуласининг гидрофоб қисми сув билан тўқнашганда сув молекулалари билан ориентирланган қават ҳосил бўлади ва шу жойлар «музлатилган» ҳолатда бўлади. Бундай тартибли структуралар термодинамик жиҳатдан чидамли эмасдир. Агар сув молекулаларини оксил табиатига ўхшамаган моддалар билан иммобилизация қилинса, оксил молекулалари ўзаро таъсирлашиб агрегатлар ҳосил қила бошлайди. Маълумки, тузларнинг ионлари гидратланади. Агар оксил эритмасига маълум миқдорда сув қўшилса

у сув билан боғланади ва сувдан бўшаган оксил молекулалари агрегат ҳосил қилади. Туз ионлари қанча кўп бўлса, оксилларнинг агрегатланиши ҳам шунча кучаяди ва чўкмага тушиши ортади.

Тузлар билан чўктириш жараёни таъсирига кўра ҳар хил оксилларга ҳар хил бўлади. Бу биринчидан, оксил молекуласи сиртидаги гидрофоб қисмларнинг миқдори ва размерига боғлиқ. Қанча шундай қисмлар кўп бўлса, оксил шунча тез чўкмага тушади. Баъзи оксиллар борки, тузларнинг энг юқори концентрацияларида чўкмага тушмайди. Чўктириш жараёнида оксиллар ёнида турган бошқа оксиллар билан ҳам агрегат ҳосил қилиб чўкмага тушиши мумкин. Бунда бир қанча ферментлар комплексини олиш мумкин. Лекин фракцияларга бўлиб чўктирилса бир мунча юқори натижага эришиш мумкин.

Оксилларни тузли эритмаларда эрувчанлиги Коннинг эмпирик тенгламасига бўйсунди:

$$\lg C = \lg C_0 - k_c \mu$$

бунда C , C_0 - оксилнинг тузли эритма ва тоза сувдаги эрувчанлиги; k_c – тузлаш константаси, μ – эритманинг ион кучи.

Тузлар билан чўктириш жараёнини унумли ўтказиш учун $k_c \mu$ кўрсаткичи иложи борица катта бўлиши керак. k_c кўрсаткичи тузнинг табиатига боғлиқ бўлиб, водород ионлари концентрациясига боғлиқ эмас. Ушбу жараён гидрофоб ўзаро таъсирга асосланган бўлсада унинг боришига таъсир қилувчи бошқа омиллар ҳам мавжуддир. Улар: муҳит рН и, ҳарорат. Фермент эритмаси тозаллиги даражаси, жараёни ўтказиш муддати ва бошқалардир.

Туз билан чўктиришда асосан ишқорий металлларнинг нейтрал тузлари ишлатилади. Ҳар хил ионларнинг чўктириш эффекти уларнинг ион кучига боғлиқ. Натрий тузлари анионларини тузлаш таъсири кучига қараб қуйидагича жойлаштириш мумкин: $\text{CO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{J}^- > \text{CH}_3\text{C}^-$, ҳамда катионларни эса қуйидагича $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > (\text{NH}_4)^+$.

Фермент препаратларини туз ёрдамида чўктирилганда уларнинг таркибида 60-85% гача ҳар хил балласт қўшимча моддалар учраши мумкин. Ушбу жараённинг энг қийин босқичи, бу - тузни қўшиш ва уни эритишдир. Эритмада тузнинг локал концентрациясини ошириб юбормаслик учун у аввал майдаланиб, секин асталик билан маълум бир қисмдан қўшиб борилади ва тинмай аралаштириб турилади. Аралаштириш давомида кўпик ҳосил бўлишига йўл қўймаслик керак. Жараён эриган на агрегатланган оксилларнинг мувозанати ҳосил бўлгунча 20-40 мин, баъзида бир неча соат давом этади.

Туз билан чўктириш жуда ҳам кўп омилларга боғлиқ бўлган мураккаб технологик жараёндир. Шунинг эса тутиш керакки, туз ҳеч қачон ферментни бутунлай чўктирмайди, балки унинг эрувчанлигини пасайтиради, холос. Агар эритмада 1 мг/мл оксил бўлса унинг 90%и чўкмага тушиши мумкин, лекин эритмада бор-йўғи 0,1 мг/мл оксил бўлса ҳеч қандай фермент препаратини олишнинг иложи бўлмайди.

Нейтрал тузлар билан оксилларни чўктириб фермент препаратларини олиш усуллари асосан чет элларда кенг тарқалган.

Органик эритувчилар ёрдамида чўктириш. Ферментларни сувда эрувчан органик эритувчилар билан чўктириш усуллари саноат миқёсида кенг қўламда қўлланилади. Оксилларни чўктириш самараси органик эритувчилар таъсирида сувнинг фаоллигини камайиши билан узвий боғлиқдир. Эритувчининг концентрацияси ортиши билан ферментнинг зарядланган гидрофил молекулаларини сув таъсирида солватланиш қобилияти пасаяди. Оксилнинг гидрофоб қисмидаги сув молекулалари органик эритувчи томонига ўта бошлайди ва натижада ферментнинг эрувчанлиги пасаяди. Оқибатда оксил молекулалари агрегатланади ва чўкмага тушади.

Оксилларни агрегатланиши электростатик ва Ван-дер-Ваальс кучлари таъсирида, алоҳида жойлашган оксил молекулалари ўртасида юзага келади.

Оксилларни агрегатланиши жараёни ва чўкма ҳосил бўлиши чўктиришнинг бир қанча омилларига боғлиқдир. Шулардан бири оксил молекуласининг размеридир. Чўктириш жараёнида оксил молекуласининг размери қанчалик катта бўлса, эритувчининг салбий таъсир қилувчи концентрацияси шунчалик паст бўлади. Бу боғлиқликка молекуланинг гидрофоблик даражаси, солват қаватига чидамлилиги на бошқа омиллар таъсир қилиши мумкин.

Чўктириш учун ишлатиладиган органик эритувчи сув билан тўлиқ аралашуши ва фермент билан эса алоқада бўлмаслиги керак. Асосан бу жараён учун этил спирти, ацетон ва изопропил спирти кенг қўлланилса, метанол, н-пропанол, диоксан, 2-метоксиэтанол ва бошқа спиртлар, кетонлар, эфирлар ва уларнинг аралашмалари камроқ ишлатилади. Эритувчиларни танлашда уларнинг токсиклигига, портлаш хавфидан ҳолислигига ва пегенерация бўлиш қобилиятига эътибор бериш керак. Ишлаб чиқариш учун энг яроқлилари бўлиб этил спирти ва изопропанол ҳисобланса, ацетоннинг кўрсаткичлари эса сал пастроқдир. Булар орасида энг истиқболлиси изопропанолдир. Бу эритувчилар ёрдамида ферментларни комплексларга ажратиш ёки фракциялар ҳолида чўктириб олиш мумкин.

Фермент препаратларини чўктириш учун нафақат эритувчининг табиати ва концентрацияси, балки электролитларнинг иштироки, чўктириш ҳарорати, муҳит рН кўрсаткичи, қуруқ моддаларнинг таркиби на миқдори каби бир қанча омилларга эътибор бериш керак. Чўктириш эритмасида баъзи ионларнинг учраши фермент мўътадиллигига таъсир қилиши мумкин. Масалан, Ca^{2+} ионлари а-амилаза, протеиназа, глюкоамилаза ферментлари фаоллигига ижобий таъсир қилса, магний, марганец, кобальт каби металл ионлари ҳимоя вазифасини бажаради. Шулар билан биргаликда баъзи металлларнинг (Fe^{2+} , Pb^{2+} , Si^{2+} , Ag^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Hg^{+} ва х.к.) ионлари салбий таъсир кўрсатади ва уларнинг эритмада бўлиши мақцадра мувофиқ эмасдир. Эритмада электролитларнинг бўлиши эритувчи сарфини камайитиришга ва чўкма структурасини яхшилашга хизмат қилади.

Фермент эритмаси ва эритувчининг ҳарорати фермент чўктириш жараёнида паст бўлишига ҳаракат қилиш керак. Спирт ва ферментнинг сувли эритмаси аралаштирилганда иссиқлик ажралиб чиқиши ва аралашма ҳарорати

5-10⁰С га кўтарилади. Агарда спирт олдиндан совўтилган бўлмаса ферментларнинг инактивациясини кузатиш мумкин. Бу ҳодиса нафақат термоинактивацияга, ҳаттоки фермент молекуласини денатурациягача олиб келади.

Фермент препаратларини чўктиришда рН кўрсаткичи жуда катта аҳамиятга эга. Бир хил фермент эритмасидан ҳар хил рН кўрсаткичи таъсирида бир-биридан чўкмаси миқдори ва фермент фаоллиги билан фарқ қилувчи препаратлар олиш мумкин. Маълумки, ферментлар ўзларининг изоэлектрик нуқталарида оксил агрегатлари ҳосил қилиб тўлиқ чўкмага тушади. Оксилларни изоэлектрик нуқталарида чўктирувчи реагентлар ишлатмай чўктириш жараёни изоэлектрик чўктириш дейилади. Органик чўктирувчиларни изоэлектрик нуқта рНга яқини рН да қўллаш ферментларни осон чўктириш ва эритувчини кам миқдорда сарфлаш учун хизмат қилади. рН кўрсаткичи изоэлектрик нуқтадан четга чиқса чўкма унуми ва фермент фаоллиги 30-50% гача йўқотилади.

Фаол ферментни препарат ёки мўътадил структурали чўкма ҳолида олиш учун эритмада 10-12% атрофида қуруқ модда миқдори бўлиши керак. Кўп тадқиқотлардан маълумки, ферментларни чўктиришда, айниқса протеолитик ферментларни, қуруқ модданинг энг оптимал миқдори 10% бўлиши керак.

Юқорида қайд қилинган омиллар каторида фермент эритмаларини эритувчи билан алоқада бўлиш муддати ҳам катта аҳамиятга эга. Фермент саноатида тўхтовсиз ишлайдиган чўктирувчиларда ушбу вақтни жуда ҳам қисқартиришга эришилгандир, бу албатта фермент фаоллигини камайишини олдини олади.

Органик эритувчилар билан чўктириш самарадорлиги шу жараёнга мўлжалланган ускунага ҳам узвий боғлиқдир. Бундай ускуналар асосан фермент эритмаларини қабул қилгич, тўхтовсиз аралаштиргич, фермент эритмаси ва эритувчини тўхтовсиз равишда узатувчи контурлар, сепаратор ва автоматизация тизимларидан тузилган бўлади. Цилиндр шаклидаги аралаштиргичдан фермент эритмаси ва эритувчи мураккаб ҳаракат йўналиши бўйлаб қисқа вақт ичида аралашиб ўтади ва натижада ҳосил бўлган аралашма сепаратор қисмига узатилади. Сепараторда чўкмага тушган оксил молекулалари ажратиб олинади. Бундай қурилмада фермент билан эритувчининг алоқа муддати ўн маротабагача қисқартирилади. Бунда ферментнинг чўкмага тушиш унуми 15-20% гача ортади. Сепараторда ажратилган чўкма ҳар хил усуллар билан мўътадил шароитда қуришиб олинади. Чўкма тепасида қолган суюқлик таркибида 50-75% гача эритувчи улуши бўлади ва ректификация бўлимида регенерация қилишга юборилади.

Органик эритувчилар билан чўктириш унуми продуцент ўстирилган озуқа муҳити таркибига ва фермент препаратини қуюқлаштирилганлик даражасига ҳам боғлиқдир.

Ферментларни тозалаш усуллари.

Ферментлар ва бошқа оксил моддалари ҳар хил эримайдиган адсорбция (сурилиш) қобилиятига эга. Бу хусусият оксил аралашмаларини бирикмаларга

ажратишда ва айниқса ферментларни лаборатория шароитида тозалашда, ҳамда гомоген бўлган фермент препаратларини олишда ишлатилади. Адсорбция усули, шу билан бирга колонкали хроматография усуллари ферментларни юқори даражада тоза ва кўп миқдорда олиш имконини беради.

Оқсилларнинг муҳим адсорбентлари бўлиб, ҳап хил ионалмашувчилар, яъни кальций фосфат, алюминий гидроксид геллари ва маълум типдаги ферментлар учун махсус бўлган ҳар хил аффин адсорбентлар ҳисобланади. Ферментларни тозалаш ва оқсилларни ажратиш технологияси қандай типдаги усулда бўлишига қарамай қуйидагиларга асосланади. Фермент маҳсулотини ўз таркибига олган оқсиллар аралашмаси маълум бўлган эритувчида (буферда) эритилади ва шу эритувчи билан мувозанатланган колонкага юборилади. Кейин шу колонкадан маълум таркибга эга бўлган буферни ёки концентрацияси ўсиб борувчи градиентли ювиш эритмаси, ёки бўлмаса ушбу фермент учун махсус бўлган боғловчи (лиганд) ёрдамида оқсил босқичма-босқич ювиб олинади. Колонкадан ювиб олинган фермент препаратлари фракциялар тўпламида йиғилади ва ферментни тоза препаратини олиш учун бошланғич материал бўлиб хизмат қилади.

Ионалмашув хроматография усули. Бу усулда оқсиллар электростатик куч ёрдамида боғланадилар, яъни бу ҳодиса зарядланган оқсил сиртлари ва зарядланган ионалмашув бирикма гуруҳларининг зич қатлами ўртасида юзага келади. Типик ионалмашувчи сифатида бўктирилган диэтиламиноэтил (ДЭАЭ-) ёки карбоксиметил (КМ) целлюлозани кўрсатиш мумкин. Улар бўктирилган ҳолатда зарядли гуруҳларнинг 0,5 М концентрациясига эга бўлади. Бу зарядлап колонкада қапама-қарши бўлган ионларни (металл ионлари, хлор ионлари, буфер ва ҳ.к. нейтраллайди. Одатда оқсилнинг умумий заряд белгиси ион алмашувчига ўтирган ион белгиси билан бир хил бўлади ва колонкадан ўтиш жараёнида айнан уни сиқиб чиқаради. Шунинг учун ҳам бу жараён хусусиятига қараб "ион алмашув" жумласи қўлланилади.

Колонкада адсорбцияланган кепакли оқсилни ювиш учун аффин усулидан ташқари икки усулдан фойдаланилади. Биринчи усул - буфернинг рН кўрсаткичини маълум даражага ўзгартириш билан ион кучини ошириб, адсорбент ва оқсил ўртасидаги электростатик ўзаро таъсирни камайтиришдир. Бу усул умуман яхши натижа бермайди. Чунки буфер ҳажмини кичик бўлганлиги учун рН кўрсаткичини бирданига ўзгартириш оқсил аралашмаларига ва бошқа бирикмаларнинг ёмон ажралишига сабаб бўлади. Кейинги йилларда бу усул Л.Л.Слюйтерман ва бошқалар (1981) томонидан хроматофокус усулига ўтказиш йўли билан такомиллаштирилмоқда. Бунда ювиш жараёнида амфолит типдаги буфер ҳажми юқори бўлган буферлардан фойдаланилади ва шу усул кейинчалик саноат миқёсида ўз ўрнини топиши мумкин.

Иккинчи усул кенг миқёсда фойдаланилаётган калий ёки натрий хлорид тузлари ёрдамида градиент тузишга асосланган. Туз ионлари иштирокида мустақил оқсил на адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камаюди. Туз ионлари концентрациясини ошириш билан адсорбентга боғланган оқсиллар ўз

ўринларини уларга бўшатадилар ва ўзлари колонкадан ювилиб чиқа бошлайдилар. Шу билан бирга туз ионлари таъсирида адсорбентлар ўзаро яқинлашиб оксил ҳаракати учун тор йўлкалар ҳосил қилади ва бу ҳодиса ферментларни колонкадан чиқишида фракцияларга ажратиб олиш имконини беради.

Ион алмашувчига боғланган ферментни аффинли ювиш ёрдамида ажратиш мумкин. Бунинг учун колонкага оксил билан боғланадиган махсус лиганд юборилади. Бунда оксил лиганд билан биргаликда тезда колонкадан ювилиб чиқади. Лекин керакли оксилни танийдиган ва уни сорбентдан ажратиб оладиган лигандни топиш жуда мушкул вазифадир. Шу билан бирга лигандни қандай зарядланганлиги ва концентрациясига алоҳида эътибор бериш керак. Бўлмаса қарама-қарши ҳолатда лиганд ўзи ионалмашувчига боғланиб қолиши мумкин.

Аффинли хроматография усули. Бу усул оксил ва ферментларни тозалаш ва ажратишнинг адсорбция ҳодисасига асосланган усуллари ичида алоҳида ўринни эгаллайди. Кўпинча уни аффинли хроматография ёки биоаффинли ёки бўлмаса биоспецифик хроматография дейилади.

Маълумки, барча биологик фаол бирикмалар, хусусан ферментлар ҳам лигандлар ёки аффинли лигандлар деб номланадиган бирикмаларга махсус боғланиш хусусиятларига эгадир. Агарда шундай лигандларни инерт матрицага ковалент боғласа фақат керакли ферментни ушловчи ва қолган оксил ва моддаларни ўтказиб юбуровчи махсус адсорбентни олиш мумкин.

Махсус ювувчилардан ёки жараён шароитлари фарқи асосида лигандни ферментга бўлган хусусиятини ўзгартириш йўли билан оксилни десорбцияга учратиб, тозалаш натижасида битта юқори тозалikka эга бўлган ферментни олиш мумкиндир. Лекин лиганд ва уни ушлаб турувчини танлаш жуда қийин вазифадир. Кўпчилик ҳолларда аффинли адсорбентларни синтез қилишда тозаланаётган ферментнинг хусусиятларини эътиборга олиш керак. Аффинли хроматография учун ҳар хил турдаги эримайдиган сорбентлардан фойдаланади, лекин энг кўп тарқалгани кўндаланг қилиб уланган агароза доначаларидир. Улар юқори босимда ўз шаклини сақлайди ва буферларни ҳамда эритувчиларни алмаштиришга бардошлидир.

Лигандлар эса матрицага шундай боғланган бўлиши керакки, оксиллар ҳеч қийинчиликсиз уларга келиб боғланиши ва бунинг учун матрица билан лиганд ўртасида кўприкча бўлиши керак. Булардан ташқари лиганд бошқа бирикмалар билан ўзаро боғланмаслиги, фақат матрицага боғланган ва ювиш, регенерация жараёнларига чидамли бўлиши шартдир.

Гельхроматография усули. Гельфилтрация жараёнини амалга ошириш учун декстран асосида олинган геллардан фойдаланилади ва улар ёрдамида размерига қараб ҳар хил макромолекулаларни тез ажратиш мумкин. Гель очик ҳолдаги кўндаланг тикилган уч ўлчамли молекула тури бўлиб, колонкаларни осон тўлдириш учун юмалоқ доначалар (гранула) кўринишида бўлади. Доначаларда кичик тешикчалари бўлиб, уларга фақат жуда кичик молекулали

бирикмалар киради ва йирик молекулалар эса кирмайди. Бу усул гелларнинг айнан шу хусусиятига асослангандир.

Бу усул ферментларни тозалаш ва ажратишда нафақат лаборатория, балки саноат миқёсида ҳам кенг қўлланилади. Гельфилтрация учун кўндаланг тикилган декстран (сефадекслар ва сефакриллар) гелларидан, кўндаланг тикилган полиакриламид гелларидан (биогеллар), акриламид полимер занжири ёпиштирилган агароза геллардан (ультрагеллар) ва б. агароза гелларидан фойдаланилади.

Колонкада фермент эритмасининг бир қисми гел доначалар орасида ва бир қисми эса доначаларнинг тешикчалари ичида жойлашади. Гельфилтрация – бу тарқалувчан хроматографиянинг бир шакли бўлиб, эритилган моддалар эритманинг бир мунча юзада жойлашган ҳаракатчан ва ички томонида жойлашган кам ҳаракатли қисмларида тарқалган бўлади. Колонкада эритилган модданинг ушлаб қолиниш даражаси унинг гел тешикчаларига кира олиш қобилиятига боғлиқдир. Шунинг учун гельфилтрация жараёнида колонкадан аввал юқори молекулали моддалар ва кейин эса кичик молекулалилари бирин-кетин чиқа бошлайди. Бунда гел молекуляр тўр вазифасини бажаради. Бу жараён идеал равишда олиб борилиши учун гел тайёрланган материал эриган бирикмалар таъсирига жуда ҳам инерт бўлиши керак. Афсуски бугунги кунда ишлатилаётган барча геллар инерт эмас ва баъзан маълум pH кўрсаткичида улар суриш қобилиятини намоён қилиши мумкин, масалан, шундай гелларга сефакрилларни киритиш мумкин. Гельфилтрация усули билан майда гел доначаларида юқори босим остида жуда кўп ҳар хил моддаларнинг, шу жумладан оксилларнинг аралашмалари ажратилмоқда. Бу янги юқори босим остида суяқ хроматография услуби қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охириги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

Назорат учун саволлар

1. Ферментлар муҳандислигининг асосий вазифаси тушинтиринг?
2. Микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиш олиш усуллари тушинтиринг?
3. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши тушинтиринг?
4. Чўктириш усуллари ва унинг назариясини тушинтиринг?
5. Ферментларни тозалаш усуллари тушинтиринг?

3-МАЪРУЗА.

ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ. ИММОБИЛЛАШНИНГ ФИЗИК ВА КИМЁВИЙ УСУЛЛАРИ.(2С)

Режа:

1. Имобилланган ферментлар.
2. Имобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари.
3. Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.
4. Ташувчиларга қўйиладиган талаблар.

5. Ферментларни физикавий иммобиллаш.
6. Ферментларни кимёвий иммобиллаш.
7. Иммобиллаш жараёнига таъсир этадиган омиллар.
8. Ферментларнинг барқарорлигини ошириш
9. Иммобилланган ферментлар хоссаларини ўзгариши
- 10.

Таянч сўзлар: *иммобиллаш, унинг методлари, ташувчилар, уларнинг таснифи, адсорбция, геллар, яримўтказгич мембраналар, ДЭАЭ-целлюлоза, субстрат. иммобиллаш, унинг методлари, ташувчилар, уларнинг таснифи, адсорбция, геллар, яримўтказгич мембраналар, ДЭАЭ-целлюлоза, субстрат.*

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3. Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Охириги 15-20 йиллар мобайнида кимёвий энзимологиянинг ривожланиши натижасида биологик катализаторларнинг янги типи – **иммобилланган ферментлар** яратилди. Маълумки тоза ферментлар, биринчидан, узок вақт сақланмайди, ҳамда турли таъсирларга, айниқса иссиқликка чидамсиз, ҳамда иккинчидан, уларни қайтадан ишлатиш имкони йўқ. Иммобилланган ферментларнинг яратилиши билан саноат ишлаб чиқаришида тоза ферментлар фойдаланишда юзага келадиган қийинчиликлар бартараф этилди.

Иммобилланган ферментлар ферментатив жараёни узлуксиз ўтказиш ва реакция тезлигини бошқариш имконини беради. Ферментларни иммобиллаш билан ташувчининг хусусиятини ўзгартириш ҳисобига уларнинг каталитик фаоллиги бошқарилади.

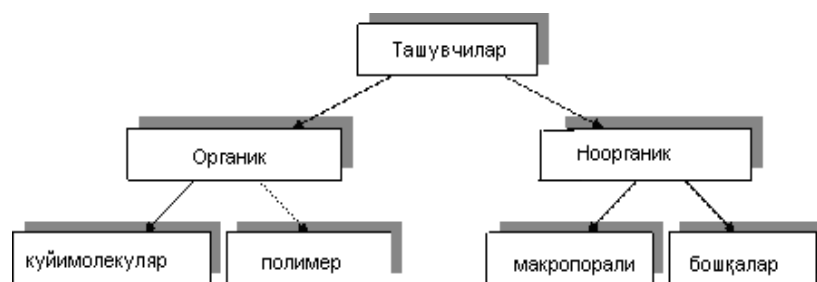
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш эркинлигини исталган чекланишини англатади.

Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

Ферментларни иммобиллаш учун органик ва ноорганик ташувчилар ишлатилади. Уларга қўйиладиган асосий талаблар:

- юқори кимёвий ва биологик турғунлик;
- юқори кимёвий мустаҳкамлик;
- фермент ва субстратлар учун етарли даражада ўтказувчан, ғоваклилиги, солиштира сирти юқори бўлиши;
- технологик жиҳатдан қулай шаклларда олиниши (гранулалар, мембраналар);
- осон активланиши;
- юқори гидрофиллик;
- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги 1-расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



1-рasm

Органик (паст ва куйимолекуляр) ташувчилар табиий ёки синтетик бўлиши мумкин. Табиий полимер органик ташувчилар ўз навбатида биокимёвий классификациясига кўра 3 гуруҳга бўлинади: полисахаридли, оксилли ва липидли.

Синтетик полимерларни макромолекуласининг асосий занжирини кимёвий тузилишига кўра полиметилени, полиамидли, полиэфирли гуруҳларга бўлиш мумкин.

Ферментларни иммобиллаш учун табиий полисахаридлар ва полиметил типдаги синтетик ташувчилар кўпроқ ишлатилади. Бунинг сабаби уларда кимёвий реакцияларга осон кириша оладиган реакцион хусусиятли функционал гуруҳлари мавжуд, ҳамда уларнинг гидрофиллигидир. Камчилиги эса микроорганизмларнинг таъсирига чидамсиз ва қимматроқдир.

Полисахаридли ташувчилардан целлюлоза, декстран, агароза ва уларнинг ҳосилалари ишлатилади. Целлюлоза гидрофил хоссали, унда гидроксил гуруҳи кўп бўлиб, шу гуруҳ ҳисобига уни модификациялайди. Целлюлозани қисман гидролизлаб (бунда аморф участкалари бузилади) гранула ҳолига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Гранулаланган целлюлозани ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ ва б. сингари турли ионалмашувчиларнинг ҳосилаларига айлантириш мумкин.

Декстран асосида ишлаб чиқилган "Сефадекслар" деб номланувчи ташувчилар ҳам кенг ишлатилади. Қуритилганда улар осон сиқилади, сувда кучли шишади. Ушбу ташувчилардаги поранинг размери "чок依лик" даражаси билан бошқарилади. Декстранларнинг мазкур гуруҳига крахмал ҳам киради. Кимёвий модификацияланган крахмал агентлар билан "тикилади", масалан формальдегид билан. Шундай йўл билан гидролизга, ферментларга нисбатан чидамли бўлган ғовак крахмал олинган. Декстран асосида яратилган сувда эрувчан препаратлар тиббиётда доривор воситалар ташувчи сифатида ишлатилади.

Агар ҳам яхши ташувчи ҳисобланади. Уни диэпоксид бирикмалар билан кимёвий тикиб хоссасини ошириш мумкин. Бундай агар иссиқликка чидамли, пишиқ ва осон модификацияланади.

Оқсиллар ташувчи сифатида бир қанча афзалликларга эгадир: сиғимли, биодеградацияга учрайди, юпқа мембрана (қалинлиги 80 мкм) сифатида

фойдаланиш мумкин. Оксиллар фундаментал биологик тадқиқотларда, тиббиётда ишлатилади. Камчилиги эса юқори иммуногенликка эгалигидир. Иммобиллаш учун кўпроқ структурали (кератин, фибрин, коллаген), ҳаракатчан (миозин) ва ташувчи (альбумин) оксиллардан фойдаланилади.

Синтетик полимер ташувчилар ферментларни ковалент ва сорбционной иммобиллашда, гел ва микрокапсулаларни олишда ишлатилади. Сорбцион иммобиллашда стирол асосидаги полимерлар ишлатилади. Улар макропорали, изопорали структура, ҳамда гетеропорали структурага эга бўлади. Полимер гидрофил ташувчилар олиш учун акрил кислотасининг ҳосиласи – акриламиддан олинади.

Фермент ва хужайраларни фазовий тўрли структурали полиакриламид гелга киритиш методи ҳозирда кенг қўлланилмоқда. Полиакриламид гели кимёвий таъсиротларга чидамлидир. Полиамид ташувчи гуруҳи ҳам қизиқарлидир. Бу амид гуруҳи ($-C(O)-NH-$) қайтарилиб келадиган турли гетерозанжирли полимерлар гуруҳидир. Масалан, Н-винилпирролидон асосидаги полимерлар организмда секин парчаланадиган ферментларни иммобиллаш учун ишлатилади. Бундан ташқари улар биологик инерт бўлганлиги учун тиббиётда ҳам ишлатилади. Камчилиги эса унинг организмда тўпланиб қолишидир. Бу жиҳатдан ферментлар таъсирида гидролизланадиган табиий полимерлар аҳамиятлидир. Шунинг учун длори воситаларига декстран, синтетик ташувчилардан Н-винилпирролидон асосида полимерлар қўшилади.

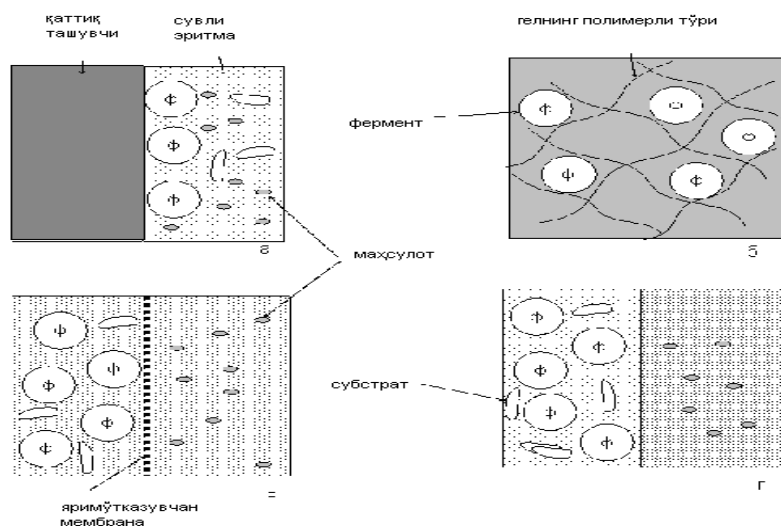
Ферментларни иммобиллаш методлари.

Ферментларни иммобиллаш икки хил метод билан амалга оширилади: физикавий ва кимёвий.

Ферментларни физикавий иммобиллаш – бу ферментни шундай бир муҳитга жойлаштириш бўлиб, бунда фермент умумий хажмнинг бир қисмигина кира олади. Физикавий иммобиллашда фермент билан ташувчи ковалент боғ билан боғланмайди. Ферментларни боғлашни 4 типи маълум:

- эримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш;
- гель порасига киритиш;
- яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш;
- икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент эрийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Бу усуллар қуйидаги 2-расмларда келтирилган.



2-Расм.

Ферментларни иммобиллаш усуллари: а - эримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш; б - гелъ порасига киритиш; в - яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш; г - икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент эрийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Адсорбцион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг сувли эритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбцияланмаган оксил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг адсорбцияланган молекуласи ташувчи ва оксилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваальс ўзаро таъсирлашуви, водород боғлари, электростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функционал гуруҳларга боғлиқдир.

Ташувчи билан фермент ўртасидаги таъсир кучли бўлиб, биокатализаторнинг сорбцияси унинг структурасини бузиши мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик ҳужайраларини цитодекс гранулаларида адсорбцияланишида ҳужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг рельефени такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбцион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовақ қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбцион боғланишда ферментни тозалаш ҳам мумкин. Ушбу методнинг камчилиги ташувчи, ҳамда аниқ бир ферментни иммобиллаш учун оптимал шароитни тўғри танлай имконини берадиган умумий йўриқноманинг йўқлигидир.

Кўрсатилган камчиликларни иммобилланган ферментларни гелга киритиш билан бартараф қилиш мумкин. Ушбу методнинг мақсади – фермент молекуласини полимер занжирларидан тўқилган 3 фазали тўрға (гелга) ўтказишдир. Гелдаги қўшни занжирлар орасидаги ўртача масофа киритилган фермент молекуласининг размеридан кичикдир. Шунинг учун у полимер

матрицани тарк этолмайди ва атрофдаги эритмага чиқолмайди, яъни иммобилланган ҳолатга бўла олмайди.

Ферментларни гелда иммобиллашнинг 2 та асосий усули маълум. Биринчисида фермент мономернинг сувли эритмасига солинади, кейин полимеризацияланади. Натижада полимерли гел ҳосил бўлади. Реакцион аралашмада кўпинча полимерга уч ўлчамли тўр структурасини берувчи бифункционал (молекуласида 2 та қўш боғи бор бўлган) агентлар қўшилади. Иккинчи ҳолатда фермент тайёр полимер эритмасига солинади ва унга гелсифат ҳолатга ўтказилади. Ферментларни полимер гелга киритиш билан иммобиллаш препаратга исталган геометрия конфигурация бериш билан бирга ташувчида биокатализаторларни текис тақсимлаш мумкин. Метод универсал ҳисобланади, деярли барча ферментлар, полифермент системалар, хужайра фрагментлари ва хужайраларни иммобиллаш учун қулай. Гелга киритилган фермент бактериялар билан зарарланишдан ҳимояланган.

Мембраналар ёрдамида ферментларни иммобиллашнинг моҳияти шундаки, бунда ферментнинг сувли эритмаси субстратнинг сувли эритмасидан яримўтказувчан мембрана ёрдамида ажратилади. Яримўтказувчан мембрана субстратнинг кичик молекулаларини осон ўтказди, катта молекулаларни эса ўтказмайди.

Мембрана типигаги системадан фойдаланиш таркибида кўп миқдорда фермент бўлган иммобилланган препаратларни олиш имконини беради. Бу метод ҳам универсал ва қулай.

Икки фазали муҳит ёрдамида ферментни иммобиллашда фермент системанинг бир фазасидагина эрийди. Субстрат ва маҳсулот қайси фазада эришига қараб иккала фазааро тақсимланади. Фазаларнинг табиати маҳсулот қайси фазада тўпланиши ва у ерда фермент бўлмаслигига кўра танланади. реакции яқунлангандан сўнг бу фазани ажратиб ундан маҳсулот ажаратиб олинади. Ферментли фазани эса навбатдаги жараёнда қайта ишлатиш мумкин.

Кимёвий метод билан иммобиллашда фермент молекуласи, хусусан оксил, билан ташувчи ўртасида янги ковалент боғ ҳосил бўлади. Ушбу йўл билан иммобилланган ферментларнинг препаратлари 2 та муҳим ютуққа эга. Биринчидан, ташувчи билан фермент ўртасидаги ковалент боғ ҳосил бўлган конъюгатнинг мустаҳкам бўлишини таъминлайди, ташқи муҳит омиллари, масалан рН, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантирмайди. Бу эса тиббиёт ва озиқ овқатга мўлжалланган жараёнларни амалга оширишда жуда муҳим. Иккинчидан, ферментларни кимёвий модификациялаб уларнинг каталитик фаоллиги, барқарорлиги каби хоссасини ўзгартириш мумкин. Бунда ферментнинг фаол марказини иложи борица сақлаб қолиш керак.

Охириги 15-20 йиллар мобайнида кимёвий энзимологиянинг ривожланиши натижасида биологик катализаторларнинг янги типи – **иммобилланган ферментлар** яратилди. Маълумки тоза ферментлар, биринчидан, узоқ вақт сақланмайди, ҳамда турли таъсирларга, айниқса иссиқликка чидамсиз, ҳамда иккинчидан, уларни қайтадан ишлатиш

имкони йўқ. Иммобилланган ферментларнинг яратилиши билан саноат ишлаб чиқаришида тоза ферментлар фойдаланишда юзага келадиган қийинчиликлар бартараф етилди.

Иммобилланган ферментлар ферментатив жараёни узлуксиз ўтказиш ва реакция тезлигини бошқариш имконини беради. Ферментларни иммобиллаш билан ташувчининг хусусиятини ўзгартириш ҳисобига уларнинг каталитик фаоллиги бошқарилади.

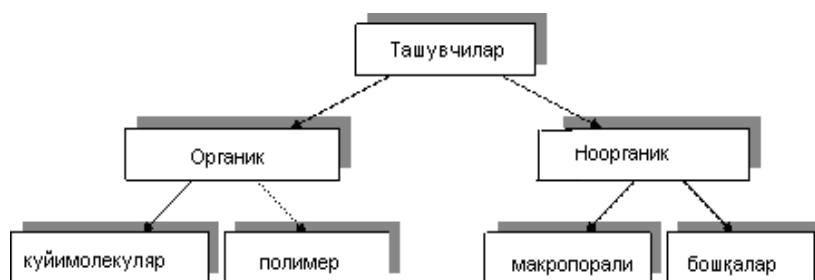
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш еркинлигини исталган чекланишини англатади.

Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

Ферментларни иммобиллаш учун органик ва ноорганик ташувчилар ишлатилади. Уларга қўйиладиган асосий талаблар:

- юқори кимёвий ва биологик турғунлик;
- юқори кимёвий мустаҳкамлик;
- фермент ва субстратлар учун етарли даражада ўтказувчан, ғоваклилиги, солиштирма сирти юқори бўлиши;
- технологик жиҳатдан қулай шаклларда олиниши (гранулалар, мембраналар);
- осон активланиши;
- юқори гидрофиллик;
- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



3-расм

Органик (паст ва куйимолекуляр) ташувчилар табиий ёки синтетик бўлиши мумкин. Табиий полимер органик ташувчилар ўз навбатида биокимёвий классификациясига кўра 3 гуруҳга бўлинади: полисахаридли, оксилли ва липидли.

Синтетик полимерларни макромолекуласининг асосий занжирини кимёвий тузилишига кўра полиметиленили, полиамидли, полиефирли гуруҳларга бўлиш мумкин.

Ферментларни иммобиллаш учун табиий полисахаридлар ва полиметил типдаги синтетик ташувчилар кўпроқ ишлатилади. Бунинг сабаби уларда кимёвий реакцияларга осон кириша оладиган реакцион хусусиятли функционал гуруҳлари мавжуд, ҳамда уларнинг гидрофиллигидир. Камчилиги еса микроорганизмларнинг таъсирига чидамсиз ва қимматроқдир.

Полисахаридли ташувчилардан селлюлоза, декстран, агароза ва уларнинг ҳосилалари ишлатилади. Селлюлоза гидрофил хоссали, унда гидроксил гуруҳи кўп бўлиб, шу гуруҳ ҳисобига уни модификациялайди. Селлюлозани қисман гидролизлаб (бунда аморф участкалари бузилади) гранула холига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Грануланган селлюлозани ДЭАЭ-целлюлоза, КМС ва б. сингари турли ионалмашувчиларнинг ҳосилаларига айлантириш мумкин.

Декстран асосида ишлаб чиқилган "Сефадекслар" деб номланувчи ташувчилар ҳам кенг ишлатилади. Қурилганда улар осон сиқилади, сувда кучли шишади. Ушбу ташувчилардаги поранинг размери "чоклилик" даражаси билан бошқарилади.

Декстранларнинг мазкур гуруҳига крахмал ҳам киради. Кимёвий модификацияланган крахмал агентлар билан “тикилади”, масалан формалдегид билан. Шундай йўл билан гидролизга, ферментларга нисбатан чидамли бўлган ғовак крахмал олинган. Декстран асосида яратилган сувда ерувчан препаратлар тиббиётда доривор воситалар ташувчи сифатида ишлатилади.

Агар ҳам яхши ташувчи ҳисобланади. Уни диэпоксид бирикмалар билан кимёвий тикиб хоссасини ошириш мумкин. Бундай агар иссиқликка чидамли, пишиқ ва осон модификацияланади.

Оксиллар ташувчи сифатида бир қанча афзалликларга эгадир: сиғимли, биодеградацияга учрайди, юпқа мембрана (қалинлиги 80 мкм) сифатида фойдаланиш мумкин. Оксиллар фундаментал биологик тадқиқотларда, тиббиётда ишлатилади. Камчилиги еса юқори иммуногенликка еғалигидир. Иммобиллаш учун кўпроқ структурали (кератин, фибрин, коллаген), ҳаракатчан (миозин) ва ташувчи (албумин) оксиллардан фойдаланилади.

Синтетик полимер ташувчилар ферментларни ковалент ва сорбционной иммобиллашда, гел ва микрокапсулаларни олишда ишлатилади. Сорбцион иммобиллашда стирол асосидаги полимерлар ишлатилади. Улар макропорали, изопорали структура, ҳамда гетеропорали структурага ега бўлади. Полимер гидрофил ташувчилар олиш учун акрил кислотасининг ҳосиласи – акриламиддан олинади.

Фермент ва хужайраларни фазовий тўрли структурали полиакриламид гелга киритиш методи ҳозирда кенг қўлланилмоқда. Полиакриламид гели кимёвий таъсиротларга чидамлидир. Полиамид ташувчи гуруҳи ҳам қизиқарлидир. Бу амид гуруҳи ($-C(O)-NH_2$) қайтарилиб келадиган турли гетерозанжирли полимерлар гуруҳидир. Масалан, Н-винилпирролидон асосидаги полимерлар организмда секин парчаланадиган ферментларни иммобиллаш учун ишлатилади. Бундан ташқари улар биологик инерт бўлганлиги учун тиббиётда ҳам ишлатилади. Камчилиги еса унинг организмда тўпланиб қолишидир. Бу жиҳатдан ферментлар таъсирида гидролизланадиган табиий полимерлар аҳамиятлидир. Шунинг учун длори воситаларига декстран, синтетик ташувчилардан Н-винилпирролидон асосида полимерлар қўшилади.

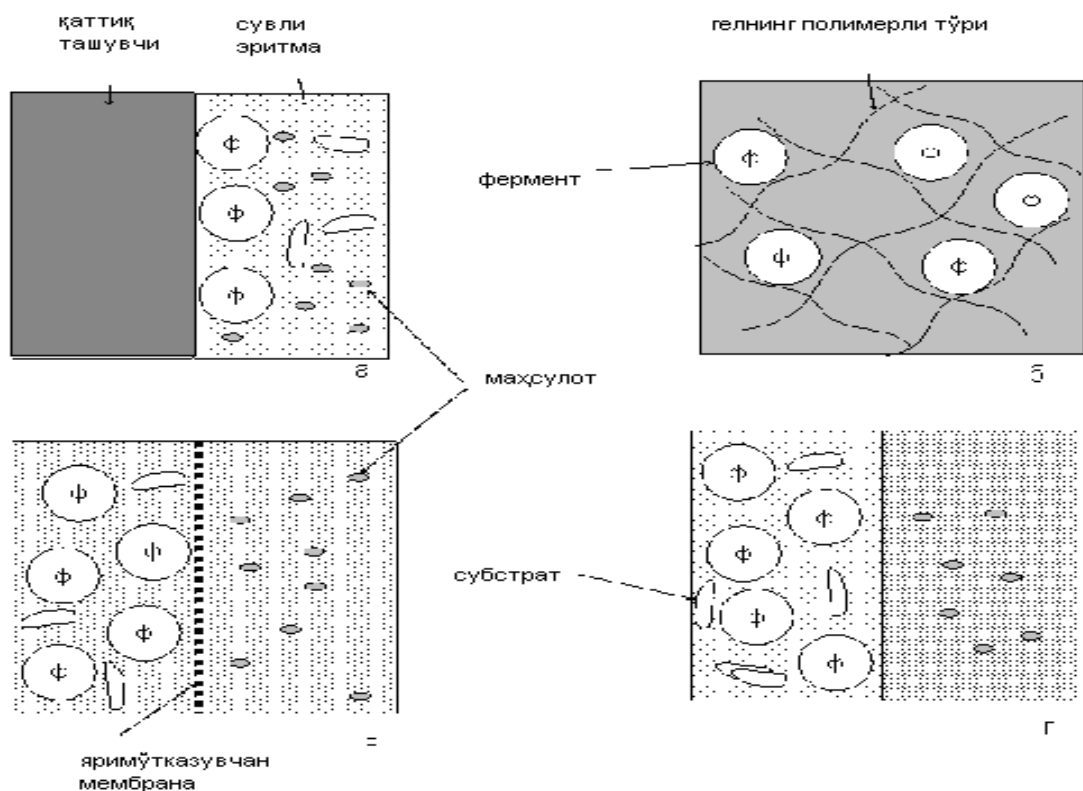
Ферментларни иммобиллаш методлари.

Ферментларни иммобиллаш икки хил метод билан амалга оширилади: физикавий ва кимёвий.

Ферментларни физикавий иммобиллаш – бу ферментни шундай бир муҳитга жойлаштириш бўлиб, бунда фермент умумий хажмнинг бир қисмигина кира олади. Физикавий иммобиллашда фермент билан ташувчи ковалент боғ билан боғланмайди. Ферментларни боғлашни 4 типи маълум:

- еримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш;
- гел порасига киритиш;
- яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш;
- икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент ерийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Бу усуллар қуйидаги расмларда келтирилган.



4-Расм. Ферментларни иммобиллаш усуллари: а - еримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш; б - гел порасига киритиш; в - яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакция системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш; г - икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент ерийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Адсорбцион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг суви еритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбцияланмаган оксил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг адсорбцияланган молекуласи ташувчи ва оксилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваалс ўзаро таъсирлашуви, водород боғлари, электростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функционал гуруҳларга боғлиқдир.

Ташувчи билан фермент ўртасидаги таъсир кучли бўлиб, биокатализаторнинг сорбцияси унинг структурасини бузиши мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик хужайраларини ситодекс гранулаларида адсорбцияланишида хужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг рельефни такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбцион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовак қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбцион боғланишда ферментни тозалаш ҳам мумкин. Ушбу методнинг камчилиги ташувчи, ҳамда аниқ бир ферментни иммобиллаш учун оптимал шароитни тўғри танлай имконини берадиган умумий йўриқноманинг йўқлигидир.

Кўрсатилган камчиликларни иммобилланган ферментларни гелга киритиш билан бартараф қилиш мумкин. Ушбу методнинг мақсади – фермент молекуласини полимер занжирларидан тўқилган 3 фазали тўрға (гелга) ўтказишдир. Гелдаги қўшни занжирлар орасидаги ўртача масофа киритилган фермент молекуласининг размеридан кичикдир. Шунинг учун у полимер матрицани тарқ етолмайди ва атрофдаги еритмага чиқолмайди, яъни иммобилланган ҳолатга бўла олмайди.

Ферментларни гелда иммобиллашнинг 2 та асосий усули маълум. Биринчисиди фермент мономернинг сувли еритмасига солинади, кейин полимеризацияланади. Натижада полимерли гел ҳосил бўлади. Реакцион аралашмада кўпинча полимерга уч ўлчамли тўр структурасини берувчи бифункционал (молекуласида 2 та қўш боғи бор бўлган) агентлар қўшилади. Иккинчи ҳолатда фермент тайёр полимер еритмасига солинади ва унга гелсифат ҳолатга ўтказилади. Ферментларни полимер гелга киритиш билан иммобиллаш препаратга исталган геометрия конфигурация бериш билан бирга ташувчида биокатализаторларни текис тақсимлаш мумкин. Метод универсал ҳисобланади, деярли барча ферментлар, полифермент системалар, хужайра фрагментлари ва хужайраларни иммобиллаш учун қулай. Гелга киритилган фермент бактериялар билан зарарланишдан ҳимояланган.

Мембраналар ёрдамида ферментларни иммобиллашнинг моҳияти шундаки, бунда ферментнинг сувли еритмаси субстратнинг сувли еритмасидан яримўтказувчан мембрана ёрдамида ажратилади. Яримўтказувчан мембрана субстратнинг кичик молекулаларини осон ўтказди, катта молекулаларни еса ўтказмайди.

Мембрана типидagi системадан фойдаланиш таркибида кўп микдорда фермент бўлган иммобилланган препаратларни олиш имконини беради. Бу метод ҳам универсал ва қулай.

Икки фазали муҳит ёрдамида ферментни иммобиллашда фермент системанинг бир фазасидагина эрийди. Субстрат ва маҳсулот қайси фазада эришига қараб иккала фазааро тақсимланади. Фазаларнинг табиати маҳсулот қайси фазада тўпланиши ва у ерда фермент бўлмаслигига кўра танланади. реакция якунлангандан сўнг бу фазани ажратиб ундан маҳсулот ажаратиб олинади. Ферментли фазани еса навбатдаги жараёнда қайта ишлатиш мумкин.

Кимёвий метод билан иммобиллашда фермент молекуласи, хусусан оксил, билан ташувчи ўртасида янги ковалент боғ ҳосил бўлади. Ушбу йўл билан иммобилланган ферментларнинг препаратлари 2 та муҳим ютуққа ега. Биринчидан, ташувчи билан фермент ўртасидаги ковалент боғ ҳосил бўлган конъюгатнинг мустаҳкам бўлишини таъминлайди, ташқи муҳит омиллари, масалан рН, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантирмайди. Бу еса тиббиёт ва озиқ овқатга мўлжалланган жараёнларни амалга оширишда жуда муҳим. Иккинчидан, ферментларни кимёвий модификациялаб уларнинг каталитик фаоллиги, барқарорлиги каби хоссасини ўзгартириш мумкин. Бунда ферментнинг фаол марказини иложи борица сақлаб қолиш керак.

Микроорганизм хужайраларини иммобиллаш

Микроорганизмларнинг иммобилланган хужайралари ҳақидаги илк мақолалар XX асрнинг 70-йилларида пайдо бўлди, саноатда эса улар 1974 йили Японияда қўлланила бошланди. Микроорганизмларнинг иммобилланган хужайраларидан аспарагин кислотаси олинган.

Иммобилланган хужайралар иммобилланган ферментлар, ҳамда эркин хужайралардан ҳам бир қатор афзалликларга эгадир. Булар қуйидагилардир:

- ферментларни ажратиш ва тозалашга кетадиган ҳаражат сарфланмайди;
- реакция маҳсулотларини ажратиш ва тозалашга кетадиган сарф-ҳаражатларни камайтиради;
- нисбатан юқори фаоллик ва барқарорликка эга;
- узлуксиз ва ярим узлуксиз автоматлаштирилган жараёнларни яратиш имкони туғилади;
- экзоген кофакторларсиз полифермент системалар узок фаолият кўрсатиш хусусиятига эга бўлади.

Иммобилизациялаш учун турли ҳолатдаги, яъни тирик ва турли даражада зарарланган ҳужайралар ишлатилиши мумкин. Бир босқичли реакцияларни иккала ҳолатдаги ҳужайралар амалга ошира оладилар. Полиферментли реакцияларни эса тирик ҳужайраларни қўллаш билан амалга оширилади, бундай ҳужайралар узоқ вақт давомида АТФ ва коферментларни (НАДФ, НАД) ренегенерациялай олиши керак.

Иммобилланган микроорганизмларнинг ферментатив фаоллигидан фойдаланиш узоқ вақтларга бориб тақалади. Бундан 150 йил аввал сиркани тез олиш усули ёғоч қипиғига адсорбцияланган микроорганизмларга асосланган эди. Ҳужайраларни иммобиллаш ферментларни иммобиллаш методи билан жуда яқин.

Кимёвий иммобиллаш методи фаоллаштирилган ташувчи билан ковалент боғлар ҳосил қилишга асосланган.

Физикавий методлардан адсорбция ва агрегациядир.

Ҳужайраларни турли геллар, мембраналар, толаларга киритиш йўли билан иммобиллаш кимёвий ва физикавий ўзаро таъсирлашишларга асосланган. Кимёвий методлар бошқа методларга нисбатан кам ишлатилади. Ҳужайралар кўпроқ геллар, мембраналар ва толаларга киритилади. Бундай иммобилланганда ҳужайралар узоқ вақт ҳаёт фаолиятини сақлаб қолади ва озуқа муҳитида кўпая олади. Иммобилланган ҳужайраларнинг биокаталитик фаоллиги ҳозирги вақтда фан ва техниканинг турли тармоқларида ишлатилади:

- аминокислотлар, органик кислоталар, антибиотиклар, стероидлар, углеводлар, углеводородлар, нуклеотидлар ва нуклеозидлар каби бирикмаларнинг биосинтези ва трансформацияда;
- пиво ва вино ишлаб чиқаришда;
- оқава ва табиий сув ҳавзаларини тозалашда;
- оқава сувларни металллардан тозалашда;
- қуёш энергиясининг ассимиляциясида;
- водородли қуёш элементларини тайёрлашда;
- азотфиксацияда;
- аналитик мақсадларда электродларни тайёрлашда.

Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш, айниқса, аминокислоталар, органик кислоталар ва антибиотикларни синтезлаш бўйича япон олимлари томонидан кўплаб ишлар қилинган. Москва давлат университетида аспарагин кислотасини олиш методи яратилган. Полиакриламид гелга киритилган *Э.коли* ҳужайралари аспарагин кислотасини олиш учун жуда қулайдир.

Микроорганизмлардан ташқари, физиологик фаол бирикмаларни синтезлаш мақсадида ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраларини ҳам иммобиллаш мумкин.

Ҳужайра органелларини ҳам иммобиллаш билан ҳозирда катта имкониятлар очилмоқда. Бу эса, биотехнологиянинг иммобилланган ҳужайраларни қўллаш билан боғлиқ йўналишининг истиқболли эканлигини исботлайди.

Ўсимлик ҳужайраларини иммобиллаш. Ўсимликларнинг тўқима ва ҳужайра культуралари иккиламчи метаболитларни олиш учун асосий манба ҳисобланади. Иккиламчи метаболитларни кўплаб миқдорда олиш учун ўсимлик тўқима ва ҳужайраларини иммобиллаш методи ишлаб чиқилган. 1966 йилда Мосбах *Умбилицариа пуста* лишайнигининг ҳужайраларини полиакриламидли гелга киритган. Бир йилдан сўнг ван Вецель ДЭАЭ микрошарчаларида ҳайвон эмбриони ҳужайраларини иммобиллаган. Кейинчалик ҳужайралар, асосан микроорганизм ҳужайралари турли субстратларда иммобиллана бошланди. Ҳужайраларни иммобиллашнинг 4 хил методи бор:

1. Ҳужайра ёки ҳужайра органелларини инерт субстратда (Сатҳарантхус росеус ҳужайралари, Дигит ДЭАЭ, агарозали шарчалар, желатин ва б.) иммобиллаш.

2. Ҳужайраларни инерт субстратларда адсорбциялаш. Ҳужайралар альгинат, полистирол ва полиакриламид билан зарядланган шарчаларга ёпиштирилади. Бу метод билан ҳайвон ҳужайралари ва *Сацхаромйцес уварум*, *С. цевисиае*, *Сандида тропицалис*, *Э. Соли* ҳужайралари иммобилланган.

3. Ҳужайраларни биологик макромолекулалар (масалан, лекин) ёрдамида инерт субстратда адсорбциялаш. Кам ишлатиладиган методдир.

4. КМЦ типдаги бошқа инерт ташувчи билан ковалент боғлаш. Бу метод ҳам кам ишлатилади.

Кейинги пайтларда ўсимлик ҳужайраларини иммобиллашга қизиқиш ортган. Бунинг сабаби, суспензион ёки каллус культураларига нисбатан иммобилланган ҳужайралар ёрдамида иккиламчи метаболитлар кўплаб олинади.

Иммобилланган ҳужайралар бир қанча афзалликка эга:

1. Инерт субстратларда иммобилланган ҳужайралар суяқ суспензион культурада ўсувчи ҳужайраларга нисбатан биомассани секинроқ ҳосил қилади. Бу ердаги ўсиш ва метаболизм ўртасидаги боғлиқлик 2 типдаги механизм орқали амалга ошади. 1-механизм бўйича ўсиш иккиламчи метаболитлар синтезига билвосита таъсир этиб ҳужайранинг агрегацияланиш даражасини белгилаб беришига асосланган. 2-механизм эса ўсиш тезлигининг кинетикаси билан боғлиқдир. Бунда метаболизмнинг биринчи ва иккинчи йўллари турлича рақобатлашади. Муҳит шароити тез ўсиш учун қулай бўлса, биринчи навбатда иккиламчи метаболитлар синтезлана бошлайди. Тез ўсиш блокланган ҳолда эса биринчи навбатда бирламчи метаболитлар синтезланади. Шундай қилиб, иммобилланган ҳужайраларнинг ўсиш тезлигининг паст бўлиши метаболитларни ҳосил бўлишини орттиради.

2. Иммобилланган ҳужайралар секин ўсишидан ташқари бир-бири билан физик контактда ўсади ва бу кимёвий контактларда ўз аксини топади.

3. Атроф-муҳитнинг кимёвий таркибини ўзгартириш билан иккиламчи метаболитларни ҳосил бўлишини бошқариш мумкин.

4. Каллус ва суспензион культуралар ўстириладиган муҳитни ўзгартиришда уларни зарарлаш ёки культурани ифлослантириш мумкин. Бу

кийинчиликларни физик жихатдан ҳаракатсиз хужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

5. Айрим ҳолларда идиоолитларни ажратиш билан боғлиқ муаммолар келиб чиқади.

Иммобилланган хужайралардан фойдаланганда керакли маҳсулотларни ажратувчи кимёвий моддалар билан ишлаш мумкин. Айрим ўсимликларнинг, масалан *Сансицум фрутесценс* ўсимлиги хужайрасининг культураси иккиламчи метаболитларни атроф-муҳитга ажратади. Иммобилланган хужайралар системаси эса культурани зарарламасдан маҳсулотни олиш имконини беради. Демак, хужайраларни иммобиллаш идиоолитларни осон изоляциялаш имконини беради.

Иммобилланган хужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

1. Ясси асосли культура системасида хужайралар идишга горизонтал идишда ўстирилади.
2. Колонкали культура системасида хужайралар вертикал идишда ўстирилади.

Иккала системада ҳам суюқ муҳит ҳаракатсиз хужайралар атрофини циркуляциялайди.

Иммобилизациялашнинг ковалент усулида, тузувчи арматура ролини ижро этадиган ишга мисол қилиб сут емизувчилар хужайрасини биореакторда гормон ва бошқа қимматли моддалар олиш унинг култивасия қилиниши олиш мумкин. Маълумки, хужайра ўсиши улардаги қаттиқ субстратдаги финосасияси билан стимулланади. Фиксация ДЭАЭ-сефидек зарарлари чўкмаси билан таъминланади (W.C. Ху ет ал., 1985).

“Хужайра-тутувчи” контакти кутбли ва ионли ўзаро таъсири, дисперсион таъсир остида адсорбсияда кучли бўлади.

Олдин амалиётда кенг қўлланган етанол олиш учун ачитқилар бактерия хужайраларини иммобилизасияси, микрономали ионалмашинувчи смоладаги ион кучлари ҳисобига амалга ошади. (А. И Даугулис ет ал., 1985).

Аминосилазани саноатда Л- ва Д аминокислотаси аралашмасини ажратишда адсорбсияланади.

Керамика ва бошқа тутувчиларда адсорбсияланган ачитқи хужайралари, еркин ачитқи хужайраларидан кўп нафас олиш активлигига ега. (В. Вожтисех, В. Йирху, 1984).

Замонавий ишлаб чиқишида йирик нормали синтетик материаллар ишлайди, улар хужайра массасини ишлаб олади. Кўп тарқалган губкали материал полидретан бўлиб катта ячейкали “кўпик” ҳосил қилади. Кичик қилиб қиймаланган зарраларни биореокторга хужайра билан жойлаштирилади. Хужайралар тутувчи ячейкаларига тузиб, тезда ўсади. Бу тизим оқовосувни тозалашда ишлатилади. (Р.П. Триоло, 1983).

Химиёвий тикишсиз иммобилизасияда биокатолитик тизим хусусиятига тутувчининг кучсиз таъсири кузатилади. Ферментлар табиий активлигини сақлаб қолади хужайралар еса ҳаётчанлигини. Шу вақтнинг ўзида тутувчи билан ферментнинг кучсиз боғи уларни десоросиега олиб келади бу усулни қулайлигини пасайтиради.

Нисбатан мустаҳкам бўлиб ионли таъсирлашувчи ҳисобланади. Ионли адсорбсия учун турли тутувчи ишлатилади. Агар биокатализаторини регенерасия қилиш керак бўлса унда еритма алмаштирилади ва фермент десорбсияланади.

Аммо биокатализатор ва тутувчи орасидаги ўзаро таъсир, еритмани катта ион кучида мустаҳкамлик қолади. Бу шароитларда дисперсион ўзаро алоқа принципида адсорбсия қулайроқ. Аспарагин кислотасини олиш учун ишлатиладиган аспортиза ферментни хлобчатобумажный толада идсарбсияланади. (Х. Уамосахи. ет. ал., 1986).

Биокатализаторни тутувчи билан мустаҳкам химиявий тикилишига келадиган бўлсак, бу усул назарий тадқиқотлар билан боғлиқ узун тарихга эга. У кўп сонли модификацияларни имконини беради. Дярли барча оксилларни функционал гуруҳлари биокатализатор ва тутувчини топиши учун қўлланилиши мумкин. Қисман кенг биокатализатор амин гуруҳи ва тутувчи корбанси гуруҳи орасида пептид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реакциялар қўлланилади. Реакция учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сульфидроид, гидрозин ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳолсил қилади.

Мисол учун биронсиан ва $\text{Sl-C-O-CH}_2\text{-CH}_3$ гидрооксин ва аминогуруҳни тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реакциялар ўтказилади. Бу хилдаги реакциялардан бири тутувчининг химиявий структурасида O=C-O-C=O гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реакцияларни амалга ошириш учун сиқинлашган материалларга малеин ангидрид тутувчи қўшимча структуралар қўшилади. Шу усул билан букани сывородка албумини глюноксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус стеротхермопхилус хужайраси омадли иммобилизацияланади.

Полимерга у ёки бу ёнаки шохларни бириктириб уни реакцион хусусиятини ва имкониятларни бошқариш мумкин. микросомаларни политенда иммобилизация қилиш қизиқиш уйғотади. Бу шароитда микросомалар юқори стабил монооксигенизоли активлигини сақлаб қолади. Ферментатив активлигини қўшимча стабилизациясига глисерин қўшиб еритиш мумкин.

Биокатализаторнинг тутувчига химиявий бириктириш йўли билан иммобилизацияси юқори эффективлиги билан ажралиб туради. Иммобилизацияни фермент активлигига таъсири турлича ва фермент структурасини ўзгариши учун уни корформацияси субстрат кириши учун диффузион чиксаниш билан белгиланади. Диффузион қийинчиликларни камайитириш мақсадида биокатализаторни айрим ҳолларда тутувчи молекуласи таркибидан чиқарилади. Уни спайсер орқали тутувчига тикилади. Мисол учун сефарозони галатозилтрансдхжаза иммобилизациясидан тутувчи ва фермент орасида - $\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$ -кетма-кетлиги қўшади (Д. Г. Демеррс, С.С. Вонг, 1989).

Спайсерни аптимал узунлигини таъминлаш муаммо саналади. Химиявий тикишни салбий таъсири пайсайтириш мақсадида фермент актив марказида тикиш жойи олиб ташланади. Агар фермент дилигопроедди табиатли бўлса фермент молекуласини оксил қисми емас, балки углеводли қисмида ковалент тикиш ўтказилади. Қандлар спирт гуруҳлари премондатни алдегид гуруҳигача оксидлайди. Бу еса тутувчини аминогуруҳи билан реакцияга киришадую (Ж. Кас ет ал., 1984).

Тикувчи агенциз қўлланиладиган асосий ҳол сифатида хужайраларни полимер серканигидрооксиди титан, олова ва темир тутувчиларда иммобилизацияланади. (В. Вожтисех, В. Йирху, 1984). Гидрооксид гуруҳлар хужайра деворини у ёки бу метал функционал гуруҳлари кординасион сферасидан чиқарилади. Тутувчи ва биокатализатор орасида кординасион ёки ковалент боғ ўрнатилади.

Ферментлар ва ферментлар системаси амалий фаолиятнинг ҳар хил сохаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат сохаларида, тиббиётда, кишлоқ хужалигида, органик синтез, кимиёвий тахлил ва хзо. Шунга қарамасдан амалий энзимология узок вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жахон бозорида жуда қиммат еди. Микробиологиянинг ривожланиши натижасида ферментларни керакли миқдори ишлаб чиқариш мумкин бўлди.

Ферментларнинг қўлланилишини яна 2та сабаб қийинлаштиради. Биринчидан - ферментларни сақлаш қийин ва ҳар хил таъсирлар, айниқса иссиқликка чидомсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни реагентдан ва реакция маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидадир. Лекин хозирги шунда бу муаммолар ҳал қилинган.

Иммобилизацияланадн ферментларнинг яратилиши натижасида амалий энзимология олдида янги принциплал истиқболлар очилди. Дж. Нельсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ

кумирда адсорбцияланган (яъни иммобилизацияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Шлейх ёғоилик кипигида адсорбцияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг мустахкам конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Шлейт томонидан олинди.

Ферментларни ташувчиларга бириктириш натижасида гетероген катализаторлар яратилиб уларга 1971 йилда иммобилизацияланган ферментлар деб кам берилди. Унинг маъноси анча аниқ бўлиб, бу фермент препаратларининг еримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизация тушунчасини анча кенгтушуниш керак: бу оксил молекуласининг (ёки унинг фрагментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. еримайдиган ташувчига бириктиришдан ташқари буни оксил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки молекулалар ўртасидаги боғлар қуйи молекуляр бифункционал реагентлар ёки ферментни ерувчи полимерга бириктириб еришиш мумкин.

Иммобилизацияланган ферментлар бир катор афзалликларга ега. Биринчидан, гетероген катализатор реакция муҳитидан осон ажралади бу еса :а) реакцияни керакли вақтда тўхтатиш имконини беради ; б) катализатордан қайта фойдаланиш; в) фермент аралашмаган мақсулот олиш мумкин. Охиргиси айниқса озиқ-овқат ва фермесевтика ишлаб чиқаришда жуда муҳимдир. Иккинчидан: гетероген катализаторларнинг қўлланилиши ферментатив жараёни узлуксиз олиб бориш имконини беради. Масалан: оқиб ўтувчи колонкаларда реакция тезлигини бошқариш , шу билан бирга мақсулот ҳосил бўлишини оқим тезлигини ўзгартириб еришиш мумкин.

Учинчидан: ферментнинг иммобилизация ва модификацияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофиқ ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг pH га, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига боғликлиги, унинг ҳар хил денатурасияловчи таъсирларга нисбатан барқарорлигини таъминлайди.

Туртинчидан: ферментларнинг иммобилизацияси уларнинг каталитик активлигини ташувчи хусусиятларига ҳар хил физик омиллар таъсир еттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиқлар, паст

Хилма-хил ичимликлар тайёрлашда биотехнологик усуллардан фойдаланиш тобора ошиб бормокда. Алкоголли ичимликлар ўзларининг белгиларига, кўрсаткичларига қараб ҳар хил гуруҳларга бўлинишлари мумкин. Шундай бўлсада, уларни технологик кўрсаткичларига қараб, ферментланган ва ферментланмаган гуруҳларга бўлиш мақсадга мувофиқ бўлар еди. Ичимлик таркибидаги алкогольнинг миқдорига қараб еса – концентрланган, дистилланган ва концентрланмаган гуруҳларга бўлиш мумкин. Ферментасия жараёни (бижғиш) нафақат спирт ҳосил бўлишини ўз ичига олади. Бу жараёнда ачитқи замбуруғларнинг метаболик имкониятларидан келиб чиққан ҳолда ачиётган муҳитда қатор бирикмаларнинг кетма-кет ўзгариб туришларини кузатиш мумкин.

Замонавий биотехнологик усуллар орқали (уларнинг ёрдамида) мана шу бижғиш жараёнида иштирок етадиган организмларнинг метаболик имкониятларини янада кенгайтириш имкониятлари яратилади. Бу еса алкогольли ичимликлар тайёрлашда биотехнологиянинг ролини аниқлаб беради.

Кўпчилик алкогольли ичимликлар бошоқли ўсимликларнинг уруғини ёки бошқа крахмал сақловчи мақсулотларни қайта ишлаш орқали тайёрланади. Россия, Голландия, Олмония, Полша, Скандинавия мамлакатлари ва бошқа кўпгина мамлакатларда пиво ва бошқа бақувват ичимликларни бошоқлардан тайёрлаш анъанага айланган. Европанинг

жанубий мамлакатлари: Испания, Италия, Франция, Гречия, Югославия (собиқ), Грузия, Арманистон, Молдова – бундай ичимликларни асосан узумдан тайёрлашади. Ҳар хил қувватга ега бўлган ичимликларни ҳар хил мевалар (олма, олхўри, тут меваси, шафтоли, тропик ва субтропик ўсимликларнинг мевалари) ва асалдан тайёрлаш ҳам анъанага айланиб бормоқда.

Алкоголли ичимликларни одатдан ташқари кўп хилда чиқаришнинг бир неча сабаблари бор. Бундай сабаблардан асосийси ичимлик чиқараётган мамлакатнинг иқлим шароити билан боғлиқ. Осиё мамлакатларида алкогольли ичимликлар тайёрлаш бўйича катта тажрибалар йўқ. Одатда, қадимда шароб тайёрланган (бу ҳам иқлим билан боғлиқ бўлса ажаб емас). Ҳозирда ишлаб чиқариладиган ичимликлар ташқаридан келтирилган технологиялар асосида тайёрланади, шунинг учун бўлса керак, сифати бўйича бошқа мамлакатларда чиқариладиганларидан анча фарқ қилади.

Алкоголли ичимликларни ишлаб чиқариш ва сотиш, ўрта асрларданоқ мустаҳкам бизнесга айланган. Мана шунинг учун ҳам бундай ичимликларни (вино, коньяк, виски, водка ва ҳ.к.) тайёрлаш жараёнларига бирор-бир янгилик киритиш катта қаршиликларга учрайди. Шунини алоҳида таъкидлаш лозимки, “қўл бола” ичимликлар тайёрлаш муаммоси бутун дунёда кенг тарқалгандир. Афсуски, алкогольли ичимликлар тайёрлашда ягона халқаро назорат тизимини ташкил қилиш имконияти яратилгани йўқ.

Алкоголли ичимликлар тайёрлаш учун ўсимлик субстратларидан – моно-, ди-, олигосахаридлар ва полисахаридлардан (крахмал, селлюлоза, баъзида гемиселлюлоза) фойдаланилади.

Полисахаридларни олдиндан парчалашга (гидролиз) тўғри келади. Бу жараён еса тегишли ферментлар ёрдамида (крахмал – амилазалар; селлюлоза ва гемиселлюлоза еса селлюлолитик ферментлар) камдан кам ҳолларда концентранган ноорганик кислоталар (сулфат ёки хлорид кислоталар) иштирокида амалга оширилади. Полимерларни кислоталар ёрдамида парчалаш одатда техник мақсадлар учун ишлатилади.

Селлюлоза ва гемиселлюлоза сақловчи маҳсулотлар озуқа спирти тайёрлаш учун одатда яроксиз ҳисобланади ва шунинг учун ҳам улар фақатгина техник мақсадлар учун спирт олишга ишлатилади.

Субстратларга тегишли ишлов берилгандан кейин (полисахаридлар парчалангандан сўнг), шаклар еритмасига ачитки замбуруғи солинади. Одатда бу мақсадда сахаромисетлар (*Сачаромйцес сп.*) ишлатилади.

Камдан кам ҳолларда бактериялардан – *Зймомонас мобилис* дан фойдаланилади. Бундай усул кўпроқ Марказий Америка мамлакатларида кўпроқ ишлатилади.

Сахаромисетлар ҳар хил моносахаридларни – глюкоза, фруктоза, галактоза; ва дисахаридларни – сахароза, малтозани етил спиртигача бижғитиб берадилар.

Сахаромисетлар бошқа авлодга мансуб бўлган ачитки замбуруғларига нисбатан етил спиртига чидамли эканлиги аниқланган. Бижғиш жараёни тугаганда аралашмада 14-16% гача етил спирти тўпланади. Бижғиб турган муҳитда етил спиртининг бу миқдори ачитки замбуруғининг ўсишини тўхтатади, бу вақтга келиб муҳитнинг кислоталилиги кўтарилиб боради. Бунга сабаб сахаромисетлар томонидан синтез бўладиган органик кислоталарнинг миқдорини ошишидир. Бижғиш жараёнида ҳосил бўлган спирт еритмасининг биологик хусусияти, тўғридан-тўғри суюлтирилган спирт еритмасидан мана шу билан фарқ қилади.

Технологик сиклнинг кейинги босқичи – бу дистилляциядир. Бу жараён ва унда ишлатиладиган асбоб ускуналар илмий ва техникавий адабиётларда кенг ёритилган.

Дистилляция – бу етил спиртни концентрасия қилиш ва унинг тоза фракциясини ажратишидир. Мана шу босқич кенг маънода алкогольли ичимликларнинг сифатини белгилаб беради.

Баъзи бир ҳолларда тайёр маҳсулотнинг органолептик сифатларини тузатиш мақсадида, етил спиртнинг ўзига хос ҳид ва хушбўйлик берадиган моддаларда тиндириб ҳам қўйилади.

Одатда қувватли ичимликларда этил спиртининг миқдори 20-50% орасида бўлади. Қувватга соладиган ичимликлар ва ликёрлар тайёрланганида ҳар хил ўсимликларнинг гулларида, баргларида ва меваларида ажратиб олинган хушбўй моддалардан фойдаланилади. Бу мақсадда синтетик моддалардан ҳам фойдаланиш йўлга қўйилган. Қуйида келтирилган 1-жадвалда ҳар хил ферментасия қилинган ичимликлар келтирилган. 2-жадвалда еса кенг тарқалган ва миллий ферментланган ва дистилланган (ёки этил спирти бўйича концентранган) ичимликлар келтирилган.

Ферментланган, дистилланмаган алкогольли ва алкогольсиз ичимликлар

1-жадвал.

Субстрат	Ичимлик	Ишлаб чиқарадиган мамлакатлар
Бошоқлилар, арпа (крахмал)	Пиво Эл	Марказий Европа Белгия, Германия, Канада
Арпа, шоли, жавдар, шакар лавлаги	Квас	Россия, Украина, Германия
Просо	Боуза Тумба	Украина Индия
Шоли, мевалар, узум, чиқиндилари (грапагача)	Водка Саке Сонт	Яқин шарқ, Хиндистон, Россия, Италия, Грузия Япония. Хиндистон.
Шоли	Ганг-чу	Хитой
Узум	Вино	Яқин шарқ. Европа, Хитой, Австралия, Жанубий Америка, АҚШ, Марказий Осиё.
Олма	Сидр	Буюк Британия, Франция.
Асал		Буюк Британия, Россия.

Ферментланган қувватли ичимликлар

2-жадвал

Субстрат	Маҳсулот
Меласса	Ром
Агава	Текила
Олхўри	Сливовиса
Олча	Кирги
Узум	Коньяк (бренди)
Маккажўхори, жавдар	Бурбон, виски
Картошка, буғдой, жавдар	Ароқ
Арпа	Виски
Арпа, картошка	Акватит
Нок	Нок брендиси
Шоли	Хитой брендиси

Маълумки, крахмал ёд билан кўк ранг ҳосил қилади. Унинг амилаза таъсирида парчаланиши дастлаб декстринлар (амило-, еритро-, ахро-, малтодекстринлар) ни, кейин малтоза ва ундан кейин глюкозани ҳосил бўлишига олиб келади. Крахмалнинг парчаланиши натижасида парчаланишнинг ахродекстрин босқичидан ўтгандан кейин унинг фрагментлари ёд билан ҳеч қандай ранг ҳосил қилмайди. Ёдли реактив кристалл ёдни калий ёд еритмасида еритиб тайёрланган еритма ҳисобланади. Уни тайёрлаш учун 100 мл дистилланган сувда 20 г калий ёд еритилади ва уни устига 10 г ёд кристали солиниб аралаштирилади. Крахмални аниқлаш учун аралашма 5 марта суюлтирилади.

Соя ўсимлиги дуккагида еса уреaza ферменти бўлиб, у сийдикчилни гидролизланишини катализлайди ва реакция натижасида аммоний карбонат ҳосил бўлади:



Бу иккала фермент учун ҳам пХ-оптимум кўрсаткичлари жуда яқин, яъни сўлак амилазаси учун пХ – 6,8 бўлса, соя уреазаси учун пХ – 7,0 ҳисобланади. Шу боис, ферментларнинг махсуслигини шу икки фермент ёрдамида намойиш қилиш ўринли бўлади.

Амилазанинг махсуслигини ўрганиш учун сўлак суюқлигидан фойдаланилса, уреза учун соя ўсимлиги уруғидан ажратиб олинган экстрактдан фойдаланилади.

Сўлак суюқлигини ажратиб олиш. Сўлак суюқлигини ажратиб олиш учун оғиз бўшлиғига дистилланган сув олиб чайқатилади. Сўнг яна оғизга дистилланган сув олиниб, 1 минут давомида ушлаб турилади, бу сўлакли суюқлик алоҳида конуссимон қолбага ўтказилади ва воронкага филтр жойлаштирилиб бошқа идишга филтрланади ҳамда дистилланган сув ёрдамида 10 марта суюлтирилади.

Соя уруғидан уреaza ферменти экстрактини ажратиб олиш. Куруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва кўп қарра петролей эфери билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози устида қурилади ва унга 5 °С да беш ҳажм бирлигида дистилланган сув қўшилади. Аралашма центрифугаланади ва ҳосил бўлган центрифугатнинг таркиби айнан уреaza ферментли экстракт ҳисобланади.

Иш тартиби: Иккита пробиркага (1 ва 2) 5 мл дан 0,1 % ли крахмал еритмаси (крахмал еритмаси олдиндан И ва КИ еритмаси солганда ҳаворанг рангга бўялиши бу олдиндан синаб кўрилган бўлиши лозим) солинади. Сўнг бошқа иккита пробиркага (3 ва 4) олдиндан бир неча томчи фенолфталеин қўшиб қўйилган сийдикчилнинг 1 % ли еритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин 1- ва 3-пробиркаларга 1 мл дан филтрланган ва суюлтирилган сўлак еритмаси ҳамда 2- ва 4- пробиркаларга еса 1 мл дан юқорида келтирилган тартибда тайёрланган уреaza ферменти экстракти солинади. Аралашмалар яхшилаб аралаштирилади ва 20 минутга 38-40 °С ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади. Қиздириш ниҳоясига етгандан сўнг 1- ва 2-пробиркаларга ёд еритмасидан бир томчи томизилади. Бунда 1-пробиркадаги аралашманинг кўк ранги йўқолади, чунки крахмалга сўлак амилазаси таъсир етиши туфайли у парчаланган бўлади, 2-пробиркага еса уреaza ферменти экстракти солинганлиги сабабли реакция содир бўлмайди ва кўк ранг сақланади. 3-пробиркада амилаза ферменти сийдикчилга таъсир ета олмайди, реакция муҳитида ўзгариш бўлмайди, 4-пробиркада уреaza таъсиридаги реакция туфайли фенолфталеин гулоби рангга бўялади, чунки сийдикчил гидролизланади.

Ферментларнинг термолабиллиги ва пХ кўрсаткичларининг ферментатив реакцияга таъсири

Ферментлар термолабил ва муҳитнинг водород иони кўрсаткичига сезгир, яъни ҳарорат ва муҳитнинг пХ кўрсаткичларини қисман ўзгариши ҳам ферментатив жараёнга кучли таъсир кўрсатади.

Ферментатив реакцияларнинг термолабиллигини аниқлаш

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 5 мл дан 0,1 % ли крахмал еритмаси солинади. Бундан кейин уларнинг биринчиси ва иккинчисига 1 мл дан дистилланган сув, учинчисига 1 мл 0,1 н хлорид кислота еритмаси солинади. Сўнг биринчи ва учинчи пробиркаларга 1 мл дан суюлтирилган сўлак еритмаси, иккинчи пробиркага шунча микдорда қайнатиб совитилган сўлак еритмаси солинади.

Уччала пробирка ҳам 20-25 минутга 37 °С ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан чиқарилиб, муз солинган идишга ўтказилиб совитилади ва уларнинг ҳар бирига 1-2 томчи ёднинг калий ёддаги еритмасидан томизилади. Бунда

биринчи пробиркадаги крахмалнинг парчаланиши юз бериши туфайли ёд еритмаси билан кўк ранг ҳосил бўлмайди. Иккинчи пробиркада сўлак таркибидаги амилаза фаолсизланганлиги туфайли реакция юз бермаганлиги, яъни ранг ўзгармаганлиги, учинчи пробиркада муҳит нордон бўлганлиги сабабли реакция секинлашганлиги кузатилади. Демак, иккинчи ва учинчи пробиркалар ёд ва калий ёдли аралшма таъсирида кўк рангга бўялади.

Ферментатив реакция тезлигига ҳароратнинг таъсирини аниқлаш

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига крахмалнинг 0,25 % ли еритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин биринчи пробиркани муз солинган идишга, иккинчи ва учинчи пробиркаларни 38 °C ли термостатга жойлаштирилади. Сўнг биринчи ва иккинчи пробиркаларга 0,5 мл дан суюлтирилган сўлак, учинчи пробиркага худди шу микдорда қайнатиб совитилган сўлак қўшилади. Вақти-вақти билан иккинчи пробиркадаги аралашмадан бир томчи олиб, устига 1 мл ёднинг калий ёдли еритмаси қўшиб, аралаштирилади. Шу йўсинда крахмалнинг парчаланиш динамикаси кузатилади. Энг охирида, иккинчи пробиркадан олинган томчини солинганда солинган ёдни калий ёдли еритма билан ранг ҳосил қилмайдиган пайт келади. Бу нарса крахмалнинг сўлак таркибидаги амилаза иштирокида тўлиқ парчаланганлигини кўрсатади.

Кейин ҳамма пробиркалардаги аралашмаларга 3-4 мл дан 1 н H_2CO_4 қўшилади ва совитилади. Уччала пробиркаларга ҳам ёднинг калий ёдли еритмасидан 2-3 томчи томизилади. Бунда иккинчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши ниҳоясига етади ва ранг ҳосил бўлмайди, биринчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши қисман юз бериб қизғиш ранг ҳосил бўлади, учинчи пробиркада крахмал умуман парчаланмайди ва кўк ранг ҳосил бўлади.

Ферментатив реакциялар тезлигининг фермент концентрациясига боғлиқлигини аниқлаш

Иш тартиби: Тўртта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 3 мл дан пХ кўрсаткичи 6,8 бўлган фосфат-ситрат буфер еритмаси ҳамда 4 мл дан 0,25 % ли крахмал еритмаси қўшиб аралаштирилади. Сўнг биринчи пробиркага 20 марта, иккинчи пробиркага 40 марта, учинчи пробиркага 80 марта ва тўртинчи пробиркага 160 марта суюлтирилган сўлак еритмаларидан 1 мл дан қўшилади ва бу аралашмалар 38-40 °C ли термостатга ўтказилади. Бундан кейин вақти-вақти билан намуналардан бир неча томчи олиб, жуда кучли равишда суюлтирилган ёднинг калий ёдли еритмаси билан аралаштирилади. Намуналар даставвал кўк, сўнг қизғиш-бинафша рангга бўялади. Тўрттала пробирка учун ҳам ёд билан кўк рангга бўялишининг йўқолиши 0,5 минут аниқликда қайд қилинади. Бу фурсат оралиғи амилolitik парчаланишнинг ниҳояси ҳисобланади. Тажриба натижалари егри чизик орқали ифодаланиб, бунда абсцисса ўқига амилазанинг нисбий концентрацияси, ордината ўқига еса унга тегишли бўлган вақт бирлиги жойлаштирилади. Амилolitik реакция туфайли крахмалнинг парчаланиши учун сарфланган вақт реакция тезлигига тескари пропорционал бўлади.

Сўлак амилазаси фаоллигига фаолловчилар ва ингибировчиларнинг таъсирини ўрганиш

Сўлак амилазасига паст концентрацияли NaCl тузи фаолловчи омил сифатида таъсир кўрсатади. Хусусан, диализ қилинган сўлак амилазасини крахмалга нисбатан фаоллиги йўқолади. Худди шунингдек, баъзи метал тузлари ферментларга фаолловчи таъсир кўрсатиши ва бошқалари ингибировчи таъсир кўрсатиши мумкин.

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларга 5 томчидан 0,5 % ли крахмал еритмасидан томизилади, биринчи пробиркага 10 томчи дистилланган сув, иккинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли NaCl эритмаси, учинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли CuSO_4 эритмаси томизилади, ҳаммасига 5 марта суюлтирилган сўлакдан 10 томчидан қўшиб, яхшилаб аралаштирилиб, хона ҳароратида қолдирилади. 5 минутдан кейин уччала пробиркага ҳам 10 томчидан дистилланган сув, 1-2 томчидан 0,1 % ли ёд еритмасидан солиб аралаштирилади, уларнинг устига тажрибадаги уччала пробиркадаги аралашманинг

ҳар биридан 2-3 томчидан алоҳида пробиркаларга томизилади. Ёд билан қилинадиган реакция 10-15 минутда яна такрорланади. Биринчи пробиркадаги суяқлик бинафша ёки қизил рангга, иккинчиси қизил ёки сариқ, учинчиси еса кўк рангга киради. Демак, иккинчи пробиркада крахмал яхшироқ гидролизланган, учинчисида умуман гидролиз кетмаган. Иш натижаси жадвалда (4-Жадвал) қайд қилинади.

3-жадвал

Амилаза фаоллигига фаолловчи ва ингибирловчиларнинг таъсири

№	Фермент	Субстрат	Ферментнинг таъсир етиш вақти, мин	Реаксион аралашманинг ёд билан берган рангги		
1	Сўлак амилазаси	Крахмал	5			
2	Сўлак амилазаси	Крахмал	10			
3	Сўлак амилазаси	Крахмал	15			
Хулоса:						

Статистик усул энг осон йўл бўлиб "ташувчи" фермент еритмасига ташланиб (солиниб) ҳосил бўлган аралашма, маълум вақтга ташлаб қўйилади. Иммобилизасия ферментни ўз ўзидан диффузияси туфайли бошланиб, адсорбсия билан тугалланади. Бу усулни камчилиги, фермент еритмаси билан "ташувчи" аралашмаси узок вақт (бир неча кунга) ташлаб қўйилиши лозим. Лаборатория шароитида кўпроқ аралаштириш усули ишлатилади. Бу усулда статистик усулдан фарқли ўлароқ фермент еритмаси билан "ташувчи" доимий равишда аралаштириб турилади.

Аралаштириш учун магнит аралаштиргич, механик аралаштиргич ёки микробиологик тебратгичдан фойдаланиш мумкин. Бу усул олдингисидан анча устун туриб "ташувчи" сатҳида ферментни бир текис жойланишини белгилаб беради. Баъзида адсорбсион иммобилизасия қилиш учун электрочўктириш усулидан фойдаланилади. Бунинг учун фермент еритмасига иккита электрод туширилади, улардан биттасини сатҳида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатҳидаги фаол гуруҳлар ($-NH_2$; $-COOH$ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатҳида чўкади.

Технологияда фойдаланиш учун энг қулай усул - колонкалардан ўтказиш усулидир.

Бу усулни икки модификацияси бор, улардан биридан "ташувчи" тўлдирилган колонкадан тепадан пастга қараб, микронасослар ёрдамида фермент еритмаси ҳайдалади, иккинчисида еса тескариси, фермент пастдан тепага қараб йўналтиради. Бу усулни афзаллик томони, ферментни ҳайдаш, ювиш, ва кейинги ферментатив жараёнлар, ҳеч қандай манипуляциясиз бир колонкани ўзида олиб борилади.

Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбсион ўзаро таъсирнинг табиати

"Ташувчи" сатҳида адсорбсия бўлган фермент молекулалари ҳар хил кучлар ҳисобига, хусусан нонспесифик Ван-дер-Ваалс, электростатик, ўзаро таъсирлар, водород боғлари ва гидрофоб боғлар ҳисобига амалга оширилади. Санаб ўтилган боғларни нисбий иштироки фермент молекуласидаги фаоллик гуруҳлари ёки "ташувчи"нинг кимёвий табиатига боғлиқ бўлади. Кўпчилик ҳолларда асосий вазифани электростатик ўзаро таъсирлар ва водород боғлари ташкил этади.

Баъзи вақтларда ўзаро таъсир кучи оқибатида "ташувчи"нинг тузилиши бузилишигача бориш мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик хужайраларини ситодекс гранулаларига адсорбсия қилинганда хужайра девори деформасияга учрагани кузатишган.

Ферментлар адсорбсиясига таъсир етувчи омиллар

Адсорбсия ўтиш жараёни ва фермент билан "ташувчи" орасидаги боғни мустаҳкамлиги, кўпчилик ҳолларда иммобилизасия қилиш шароитига боғлиқ бўлади.

Фермент адсорбсиясига таъсир етувчи омилларга қуйидагилар киради: ташувчини ғоваклиги ва сиртини фаоллигидир.

Ташувчини сорбсия қилиш ҳажми унинг сиртини фаоллигига тўғри пропорционал оксил ёки ферментга келганда бу қонуният фақатгина ташувчини ғоваклиги оксил молекуласидан анчагина катта бўлгандагина ўз кучини саклайди. Ташувчини ғоваклиги жуда кичик бўлганда, ферментлар ғовакларга сигмасалар, ферментлар учун ташувчилар сатхининг маълум бир қисмигина фойдали бўлади холос.

Бундай пайтларда ташувчининг сорбсия қилиш имкониятлари жуда кам бўлади, бошқача қилиб айтганда, ғоваклар қанча кичик бўлса, ташувчининг адсорбсия қилиш имкониятлари шунча кам бўлади. Ғовакларни мўтадил ҳажмини ҳисоблашни биринчилардан бўлиб буни 1976 йилда Р.Мессинг таклиф етган.

У шиша ва сопол материаллардан ташувчи сифатида фойдалана туриб, уларни ғовакларини катталигини (ҳажмини) ўлчаб чиқди ва ғовакларни катталиги фермент бўйидан тахминан 2 маротаба катта бўлган ҳолларда ташувчини адсорбсион имкониятлари максимум бўлишини тажрибалардан исботлаб берди.

Бундай ҳолда субстратни молекуляр ўлчами ферментдан анча кичик бўлмоғи ва сорбсия қилинган фермент ғовакларига бемалол кириб туришлари лозим, албатта.

Субстрат молекуласининг ҳажми ферментникидан катта бўлган ҳолларда ташувчининг ғоваклиги субстрат молекуласи билан белгиланади. Баъзи бир ҳолларда субстратни ўзи ташувчи вазифасини бажариши ҳам мумкин. Масалан, целлюлаза ферментини иммобилизасия қилиш учун унинг субстрати бўлган целлюлозадан кенг фойдаланилади.

Назорат саволлари

1. Иммобилланган ҳужайраларнинг бир қанча афзалликлари ҳақида гапиринг?
2. Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллашни тушинтиринг?
3. Ўсимлик ҳужайраларини иммобиллаш ни тушинтиринг?
4. Иммобилланган ферментлар нима?
5. Ферментларни иммобиллашда ишлатиладиган полимерлар ҳақида тушинтиринг?
6. Полимерларга қўйиладиган талаблар ҳақида тушинтиринг?
7. Ферментларни физикавий иммобиллаш ҳақида тушинтиринг?
8. Ферментларни кимёвий иммобиллаш ҳақида тушинтиринг?
9. Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш ҳақида тушинтиринг?
10. Ўсимлик ҳужайраларини иммобиллаш ҳақида тушинтиринг?

4-МАЪРУЗА.

ФЕРМЕНТЛАР ИШТИРОКИДАГИ ТЕХНОЛОГИК ЖАРАЁНЛАР.(2С)

Режа:

1. Амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш
2. Глюкоза-фруктозали шинни олиш
3. Ферментларини саноат қўлланиши
4. Қишлоқ-хўжалиги қўлланиши

5. Медицинада қўлланиши.
6. Ферментлар ингибиторлари
7. Биотехнологияда ферментларни аҳамияти

Таянч сўзлар: Амалий энзимология, амалиёт, глюкоза-фруктозали шинни, иммобиллаш, унинг методлари, ташувчилар, уларнинг таснифи, адсорбция, геллар, яримўтказгич мембраналар, ДЭАЭ-целлюлоза, субстрат.

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3. Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Ферментларни ишлатилишига замонамизни ютуғи сифатида қараш нотўғри бўлади. Чунки, бир неча асрлар аввал одамлар тери ошлашда, пишлок тайёрлашда, солод ишлаб-чиқаришда (сумалак тайёрлашни эсланг), пиво пиширишда, ҳамиртуруш сифатида ва бошқа соҳаларда ферменталардан фойдаланган.

Бу жараёнларда ҳайвон ва ўсимлик тўқималари ёки микроорганизмлар таркибидаги ферментлар ишлатилган.

Ферментлар саноатда биологик ҳом-ашёни ишлашда (нон ёпиш, вино, пиво пишириш, пишлок тайёрлашда, чой, тамаки, тери ва муйнага ишлов беришда, кулинарияда -гўшти юмшатишда) кенг қўлланилади.

Кейинги вақтларда оксидланиш, кайтарилиш, дегидратация конденсация, декарбоксилланиш реакцияларини бошқариш учун ҳам қўлланилмоқда.

Саноатда ферментларни ишлатилиши биотехнологиянинг марказий масаласи бўлиб, у саноат энзимологияси деб аталади. Саноат масштабидаги кўпчилик фермент препаратлари унга мос микроорганизмларни актив продуцентларидан олинади. Фермент препаратлари технологик жараёнларни тезлигини оширади, ҳосил бўлаётган маҳсулот миқдорини кўпайтиради, уни сифатини оширади, муҳим қишлоқ-хўжалик маҳсулотлар миқдорини тежайди, ишлаб чиқаришда меҳнат шароитини яхшилади. Генетик модифицирланган микроорганизмлардан ажратиб олинган фермент препаратлари алоҳида ўрин эгаллайди. Ген инженерияси методлари ёрдамида В. Стеаротхермопхилйс микроорганизмидан ажратиб олинган α -амилаза озиқ-овқат саноатида ишлатишга руҳсат берилган ососий фермент препаратларидан саналади. Озиқ-овқат саноатида ферментация асосан сут кислотаси маҳсулотларини олишда қўлланилади. Сутни ачиш жараёнида одатда стрептококлар ва сут кислотали муҳитда кўпаядиган бактериялар иштирок этади. Бу шароитда лактоза сут кислотасига айланади. Бу жараёнда лактоза глюкоза ва галактозага парчаланади. Одатда ачишдан олдин галактозадан глюкоза ҳосил бўлади. Сут кислотаси таъсирида юзага келган оксилни изоэлектрик нуқтасида (рН 4,6) казеин қуйқаси ҳосил бўлади. Бу жараён асосида творог, бринза ва пишлоклар ишлаб чиқариш ётади. Сир тайёрлашда ишлатиладиган ферментлар “сижуг ферменти” ёки “пепсин” деб номланади.

ФЕРМЕНТЛАРНИ ТИББИЁТДА ҚЎЛЛАНИШИ

Ҳозирги кунда замонавий биология ва медицина энзимология “тили” орқали боғланганлиги ҳақида ишончи далиллар келтирилган.

Ферментларни медицинада қўлланишини теоретик асослари чексиздир.

Ферментлар медицинада 5 йўналишда қўлланилади:



5-расм

ЭНЗИМОПАТОЛОГИЯ

• Энзимопатология медицина энзимологиясини теоретик ва фундаментал қисми ҳисобланади.

• 2000 хилдан ортиқ наслий касалликлар аниқланган бўлиб, улардан 20-30 тасини молекуляр механизмлари аниқланган.

• Кўпчилик касалликлар ривожланиш механизми тўқима ва аъзоларда ферментлар фаоллигининг ўзгаришига асослангандир. Маълум гуруҳ касалликлар борки, уларда организм нормал фермент статуси ўзгарган бўлади.

• Касалликларда ферментлар фаоллигининг ўзгариши қуйидаги омилларга боғлиқ бўлади:

• Ферментатив жараён айрим звеноларининг конституционал пасайиши (ирсий энзимопатиялар) натижасида ферментлар синтезининг йўқолиши.

• Ферментлар биосинтезини пасайтирувчи токсик омиллар.

• Алиментар омиллар (витамин, оксил, микроэлементларнинг етишмаслиги, овқат рациониди ўзгаришлар).

• Ферментатив жараёнларнинг хужайра ичидаги содир бўлишининг бузилиши.

• Энзимопатология ўз ичига инсон патологияларининг деярли барчасини олади, чунки ферментатив ўзгаришлар бўлмаган касалликларни мумкинлигини тасаввур этиш қийин. Энзимопатология нуқтаи назаридан патологик жараённинг келиб чиқишини қуйидагича тасаввур этиш мумкин: касалликни вужудга келтирувчи этиологик омил бир ёки бир неча фермент системаларининг ишини издан чиқаради. Тегишли модда алмашилиш жараёнларининг кечиши тўхтайдиган натижада ўзига хос симптомга эга бўлган касаллик вужудга келади.

• Юрак қон-томир касалликлари, онкологик патология, диабет, хомиладорлар токсикози, асаб касалликлари патогенезида аъзо ва

тўқималардаги оксил, нуклеин кислота, углевод, липид, аминокислоталар биокимёвий ўзгаришларининг бузилиши ётиши исботланган. Панкреатит, куйиш травмасы, нефроз, аллергия ва бошқа касалликларда калликреин-кинин системасы функциясининг бузилиши аниқланган.

• Энзимопатологияни текшириш бўйича ишлар кенгаймоқда, хусусан патологик ҳолатларда ферментлар фаоллиги ва синтезини бошқаришнинг ўзига хос томонлари ўрганилмоқда:



6-

расм ИРСИЙ ЭНЗИМОПАТИЯЛАР

• Ҳозирги вақтда 500дан ортиқ фермент ёки изоферментларнинг генетик синтезланиши бузилиши натижасида вужудга келган модда алмашилишнинг бузилиши билан борадиган касалликлар маълумдир. Буларга қон касалликлари, гемолитик анемия, коагуляция ва фибринолизнинг бузилиши, углевод, оксил, аминокислота алмашинувининг бузилиши киради. Энзимопатиялар ичида асосий ўринни тўпланиш касалликлари эгаллайди, улар лизосомал ферментларнинг етишмаслиги ёки кам синтезланиши натижасида вужудга келади (масалан: гликогеноз 1.4-глюкозидаза ферментининг етишмаслиги натижасида, Фарби касаллиги - альфа-галактозидаза ферментининг йўқлигидан ва бошқалар). Бу касалликлар умумлаштирилиб, лизосомал касалликлар деб аталади.

• Алкаптонурия – бу авлоддан-авлодга ўтувчи, моддалар алмашинуви паталогияси бўлиб, унинг асосида тирозин метаболизмининг бузилиши ётади ва бунинг оқибатида оралиқ метобалит гомогентизин кислотаси ҳосил бўлади. Фенилаланин ва тирозиннинг кейинги кўринишларига ўтиш жараёни бузилади. Бунда гомогентизиноксидаза ферментининг синтезини белгиловчи ген мутацияга учрагани учун организмда бу фермент жуда камайиб кетади. Натижада тўқималарда физиологик суюқликларда гомогентизин кислотаси тўпланиб қолади. Организмдаги гомогентизин кислотасининг аккумуляцияси ва унинг пешоб орқали ажралиб чиқиши алкаптонурия белгиларидир.

• Тери касаллик белгилари юздаги кулранг аралаш жигарранг доғлар, бўғинлардаги тоғайлар сариқ-бинафша рангга киради, қулоқ супраси ва бурун тоғайлари қораяди, бўйинда, кафтда, кўз, лаб ва қоринда доғлар пайдо бўлади.

Алкаптонуриянинг типик белгиларидан бу кулоқнинг қалинлашиши ва кулранг аралаш ҳаворанг бўлиши. Бу касаллик 1:250 минг, 1:1 млн. нисбатда учрайди. Германия, Чехия, Славакия, Хиндистон ва АҚШ да эркаклар орасида учрайдиган касаллик.

- Албинизм – нормал пигментациянинг мавжуд эмаслиги. Хайвонлар ва одамларда тери, соч, кўз рангдор пардасининг рангсизланиши, ўсимликларда яшил пигментнинг мавжуд бўлмаслиги билан намоён бўлади. Хозирда албинизмнинг сабаби сифатида тирозиназа ферментининг йўқлиги ёки блокадаси ҳисобланади. Тирозиназа ферменти мелониннинг нормал синтези учун муҳим рол ўйнайди. Албиносларда карлик, шапқўрлик ва иммун системасининг сусайиши туфайли инфекциялардан эрта вафот этиши мумкин.

- ФКУ – Фенилкетонурия. Бунда фенилаланин-гидроксилаза ферменти етишмайди. Бунинг натижасида фенилаланинни тирозинга айланиши бузилади ва организмда тўпланиб қолади. Касалликда неврологик симптомлар пайдо бўлади, тери ва органлар томонидан ўзгаришлар пайдо бўлади. Бола ўз тенгдошлари билан орқада қолади ва унда психиканинг ва интелектнинг бузилиши кузатилади. Сийдикда фенилпируват ҳисобига ўзига хос сичқон хид бўлади. Болалар сочи малла териси оқиб, кўзлари мовий, кўпинча экзема, дерматитлар кузатилади, вазни тез кўшилиб боради, лекин болалар кам ҳаракатли, катта ликилдоги тез битади.

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

- Энзимодиагностика – касалларни биологик суюқликларида (қон сивороткаси, ошқозон ости бези соки, орқа мия суюқлиги, сийдик ва б.) фермент ва изоферментлар активлигини аниқлашнинг замонавий ферментатив диагностик тестлари яратиши билан шуғулланади.

- Изланишлар икки йўналишда олиб борилади.

- Биринчиси, бутун организм, органлар системаси ва айрим органлар учун специфик органотроп ва тўқиматроп ферментларни аниқлаш бўлса,

- иккинчиси, биомуҳитларда ферментлар активлигини аниқлаш методларини мукамаллаштириши билан шуғулланади.

- Қон плазмасининг фермент таркиби соғлом организмда доимий бўлиб, айрим патологик ҳолатларнинг вужудга келишида сезгир ва нозик индикатор бўлиб ҳисобланади. Турли ҳолатларда кузатилади:

- гиперферментемия

- гипоферментемия

- дисферментемия

- Ташхиснинг ферментатив усуллари ишончли ферментатив усуллар бўлиб, шифокорга қийин ҳолатларда тўғри қарор қабул қилишга ёрдам беради.

- Ферментатив анилиз нозик анализ бўлиб, бошқа диагностик тестлардан қолишмайди. Шунинг учун ҳозирги вақтда қон плазмасидаги ферментларнинг фаоллигини аниқлашдан касалликларни ташхис қилишда кенг фойдаланилмоқда. Ҳозирги вақтда ферментатив анализ автоматлаштирилган ва махсус аппаратларда ўтказилади. Бундай аппаратларга «Техникон», «Лаб-система» ва бошқалар кириб, иш куни давомида 200 гача текширувларни

ўтказиш мумкин. Ташхиснинг ферментатив усуллари бошқа ташхис усулларида фарқли равишда специфик бўлиб, касалликнинг турли босқичларида фойдаланилади.

- Бу усуллар қондаги фермент спекторларининг юқори даражадаги аъзога нисбатан спецификлиги каби афзалликларга эга.

- Қонда қатор ферментлар фаоллигининг ортиши ҳаёт учун муҳим бўлган аъзоларнинг оғир жароҳатланиши, хужайраларнинг ҳалок бўлиши, мембраналар ўтказувчанлигининг бузилиши ҳақида хабар бериши мумкин. Бундай ферментларга: ЛДГ, бетта-оксибутиратДГ, изоцитратДГ, МДГ, альфа-глицератдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, 1,6-фруктозодифосфатаза, АсТ, АлТ, ва бошқалар киради:

- Ҳозирги вақтда айрим касалликларнинг ишончли фермент симптомларини аниқлашга имкон бўлмоқда. Масалан, ўткир гепатитлар АсТ и АлТларнинг фаоллиги ошиши билан характерланади.

- Механик (обтурацион) сариклик учун ишқорий фосфатаза, аминотрансферазалар фаоллигининг ошиши хосдир.

- Қонда ферментлар фаоллигини аниқлаш дифференциал-диагностик аҳамиятга эгадир. Энзимодиагностика ёрдамида инфаркт миокард юрак фаолияти функционал ўзгаришларидан фарқланади. Юрак инфаркт миокарди учун ЛДГ, АсТ, изоцитрат-ДГ, 1,6 фруктозо-дифосфатазодолаза ва креатининлар фаоллигининг ошиши характерлидир.

ЭНЗИМОТЕРАПИЯ

- Энзимотерапия- бу ферментларни доривор моддалар сифатида қўллашдир.

- Энзимотерапия қуйидаги йўналишлар бўйича актив ривожланмоқда:

- “ўринбосар” терапия- маълум ферментлар етишмовчилигида уларни қўллаш;

- Комплекс терапия элементлари- ферментларни бошқа терапия билан биргаликда қўллаш.

ФЕРМЕНТЛАРДАН КАСАЛЛАРНИ ДАВОЛАШДА ФОЙДАЛАНИШ

- Ошқозон-ичак йўлида тегишли безлардан ферментлар кам ишлаб чиқарилганда (пепсин, панкреатин, фестал, панзинорм).

- Турли йирингли-яллиғланиш жараёнларини даволашда: трипсин, химотрипсин ва бошқалар.

- Қон ва бошқа суюқликларда фермент етишмаганлигида фермент препаратлари юборилади.

- Томирлардаги тромбларни эритиш учун (инсулт, ИБС, инфаркт миокардда) протеолитик ферментлардан фойдаланилади: фибринолизин, бриназа, бринолаза (актиномицетлардан), стрептокиназа ва урокиназа.

- Зарарли ўсимталарни комплекс даволашда. Масалан аспарагин лимфобласт лейкозларни даволашда қўлланилади (бу хужайралар

аспарагиннинг етишмаслигига сезгирдирлар, чунки аспарагинсинтетаза ферментини сақламайдилар).

Ферментлар ингибиторлари

- Ошқозон ости безини хужайраларида ва уни каналларида овқат ҳазм қилиш ферментларини фаоллиги ошиб кетганда ҳозирги кунда кенг қўламда протеазалар ингибиторлари (контрикал, гордокс) билан даволанади.

- Миастинияда, ҳаракат ва сезги органлари фаолияти сусайганда, невритларда, радикулит ва психоген импотенцияларда синапсларда ацетилхолин медиаторини миқдори ошиб кетади. Бундай ҳолларда холинэстераза ферментини ингибиторлари (физостигмин, прозерин) қўлланилади.

- Паркинсонизм касаллигини даволашда моноаминоксидазалар ингибиторлари (наком, мадопар) қўлланилади. У МНСда катехоламин нейромедиаторлари миқдорини оширади.

Назорат учун саволлар

1. Ферментларини саноатда қўлланиши
2. Сут маҳсулотларини ишлаб чиқириш
3. Ферментларини озиқ-овқат саноатда қўлланиши
4. гиперферментемия
5. гипоферментемия
6. дисферментемия
7. тери ва муйнага ишлов беришда қўлланиши
8. Қишлоқ-хўжалигида қўлланиши
9. Медицинада қўлланиши.
10. Энзимотерапия
11. Энзимодиагности
12. Ферментлар ингибиторлари
13. Биотехнологияда ферментларни аҳамияти

5- МАЪРУЗА. ГЕН МУХАНДИСЛИГИ. (2 С)

Режа:

1. Организм (ин виво) ген муҳандислиги
2. Ген тузулиши ва экспрессиясининг бошқарилиши.
3. Кодланган ва кодланмайдиган нуклеотидларнинг жойлашиши.
4. Интронлар
5. Транспозонлар
6. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонлар
7. Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.

8. Рестрикция ва модификация тизимлари
9. ДНК полимеразалари ва уларнинг турлари
10. Праймерлар. ДНК лигазалар
11. Векторларнинг умумий хусусиятлари
12. Плазмидалар.
13. Микроорганизмлар иштирокида бирламчи ва иккиламчи метаболитлар ишлаб чиқариш

Таянч сўзлар: ДНКнинг тузилиши, ДНК синтези, репликация, трансляция, транскрипция, полимеразалар, генларнинг тузилиши. ДНК фрагментлари, ген муҳандислигининг ферментлари, микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар, ингибиторлар, маркерлар, изошимеразалар

Адабиётлар: А- 1, А-2, А-3, Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Ген муҳандислигининг мақсади лаборатория усуллари билан ирсий хусусиятлари комбинацияланган янги организмларни яратишдир.

Америкалик олимлар Уотсон ва Крик 1953 йилда ўзларининг оламшумул янгиликлари, яъни ДНКнинг иккиламчи структурасини аниқлашлари ва матрица синтезини тушунтириб беришлари билан ген муҳандислигини алоҳида фан сифатида ривожланишига асос солдилар.

ДНКнинг қўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини кўчирадилар. Натижада хужайра бўлиниши олдида 2 та бир хил ДНК молекулалари ҳосил бўлади ва улардан бири хужайра бўлингандан сўнг қиз хужайрага ўтади. Қиз хужайра она хужайра ташиган ахборотни ташийди ва у бажарган функцияларни бажаради. Шундай қилиб тирик организм хужайраларида ўзига хос реакция – **матрица синтези** рўй беради. Молекулаларнинг бири – матрица, иккинчиси эса шу матрица асосида тузилади. ДНК репликацияси, барча турдаги РНК ва иРНК структурасига мос равишда оксил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

Худди шу механизм билан РНКнинг йиғилиши амалга ошади, фақатгина 2 та спирал эмас, балки битта спиралники. Бу жараён **транскрипция** дейилади. Демак, хужайрадаги ахборот оқимини матрица синтезининг реакциялари амалга оширади, яъни, **ДНК репликацияси** (ирсий ахборотни қиз хужайраларга узатиш учун керак), **транскрипция** (хужайра ядросида и-РНКни синтези) ва **трансляция** (рибосомалар ёрдамида и-РНКда оксил занжирларини йиғилиши).

Организмнинг ирсий хусусиятларини ўзгартириш билан трансген ўсимлик ва ҳайвонлар яратиш ва уларни клонлаш имкони туғилган.

Эукариотлар хужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан

овальбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информацион РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотидан1158 тасигина оксилнинг 386та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5'-учдаги 64 та нуклеотид ва 3'-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овальбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмадага жойлаштирганлар ва уни *Э.коли* хужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар эса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овальбуминнинг информацион РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

Кейинчалик Шамбон ва Курильскини кўрсатишларича, овальбумин генининг ДНКси и-РНК билан қисман бирлашади: ДНКнинг 7 та участкаси РНК билан гибридланмайди ва мРНКда учрамайдиган геннинг ушбу участкалари **интронлар** деб аталади. Интронлар овальбуминни кодлайдиган ДНК кетма-кетлигини 8 та фрагмент - **экзонларга** ажратади.

Интронлар геннинг маълум бир қисмида учрайди, ҳажми катта бўлиб 100 дан бир неча минг нуклеотидлар жуфтидан иборатдир. Ўртача ҳисоблаганда интронлар экзонлардан узунроқдир.

Ҳозиргача ўрганилган сут эмизувчилар, кушлар ва амфибияларнинг гени тузилиши яхлит кўринишда эмаслиги аниқланган, яъни улар экзонлар ва интронлардан тузилгандир. Фақатгина гистон ва интерферонларнинг генлари бундан мустаснодир. Яхлит бўлмаган генлар булардан ташқари ҳашоротлар ва ачитқиларда, ҳамда ДНКси мавжуд ва эукариот хужайралар ядросида кўпаядиган вирусларда топилган.

Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф этилиши генетик муҳандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди.

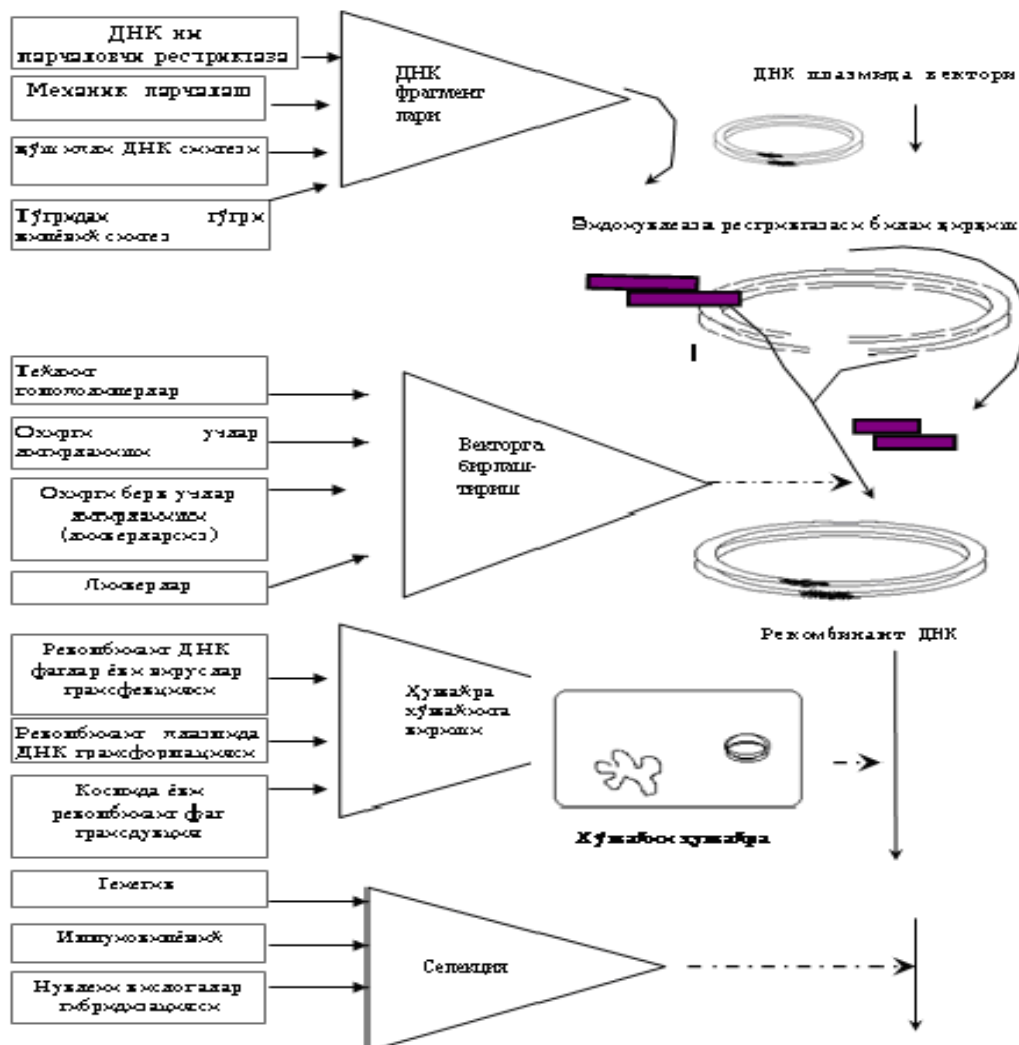
Кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонларни ўсимлик организмида АҚШ олимаси Барбара Мак Клинтон, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва ҳашаротларда Россия олими Георгий Георгиев кашф этган.

Кўчиб юрувчи генетик элементлар айна вақтда транспозицион элементлар ёки транспозонлар деб ҳам аталади. Транспозонлар хилма-хил структурага эга бўлсалар-да, барча транспозон молекулаларининг икки четида махсус нуклеотидлар изчиллиги, марказий қисмда эса ДНК молекуласининг белгиланган жойида "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб нотекис кесувчи транспозаза ферментини синтез қилувчи ген мавжуддир.

Транспозаза ферменти хужайрадаги ДНК молекуласини " ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесади ва айна пайтда транспозон учларига қовуштиради. Ҳосил бўлган хромосома ДНКси ва транспозон ДНКсидан иборат қовушма

хужайра ДНК бўлаklarини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг ҳужайра ДНКсига интеграцияси қуйидагича амалга ошади.

(7-расм)



7-расм

Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

Транспозонлар хромосомада ўз ўрнини ўзгартирганда ирсият ҳам ўзгаради. Одатда яшаш муҳити кескин ўзгарганда транспозонларнинг кўчиб юриши ортади. Шу сабабдан кўчиб юрувчи генетик элементлар иштирокида ген мухандислигига асосланган кўпгина биотехнологик жараёнлар яратилган.

Микроорганизмлар асосида биотехнологик жараёнлар яратиш усуллари

Биотехнология саноатида продуцент сифатида прокариотлар – (бир ҳужайрали, ядроси мукамал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномицетлар, риккецийлар ва тубан еукариотлар (бир ва кўп ҳужайрали, ядроси мукамал, хромосомалари махсус липопроteid табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитки ва мицелиал замбуруғлар, енг содда жониворлар ва сув ўтлари ҳамда уларни ҳар хил усуллар (селекция, мутагенез, ҳужайра ва ген мухандислиги) орқали олинган мутантларидан фойдаланилади.

Бугунги кунда биотехнологик жараёнларда табиатда тарқалган 100 мингдан ортиқ туркумга мансуб бўлган микроорганизмлардан фақатгина бир неча юзтаси ишлатилади ҳолос.

Микробиология саноатида ишлатиш учун тавсия етиладиган продуцентларга катта талаблар қўяди, уларнинг умумийлари қуйидагилардан иборат:

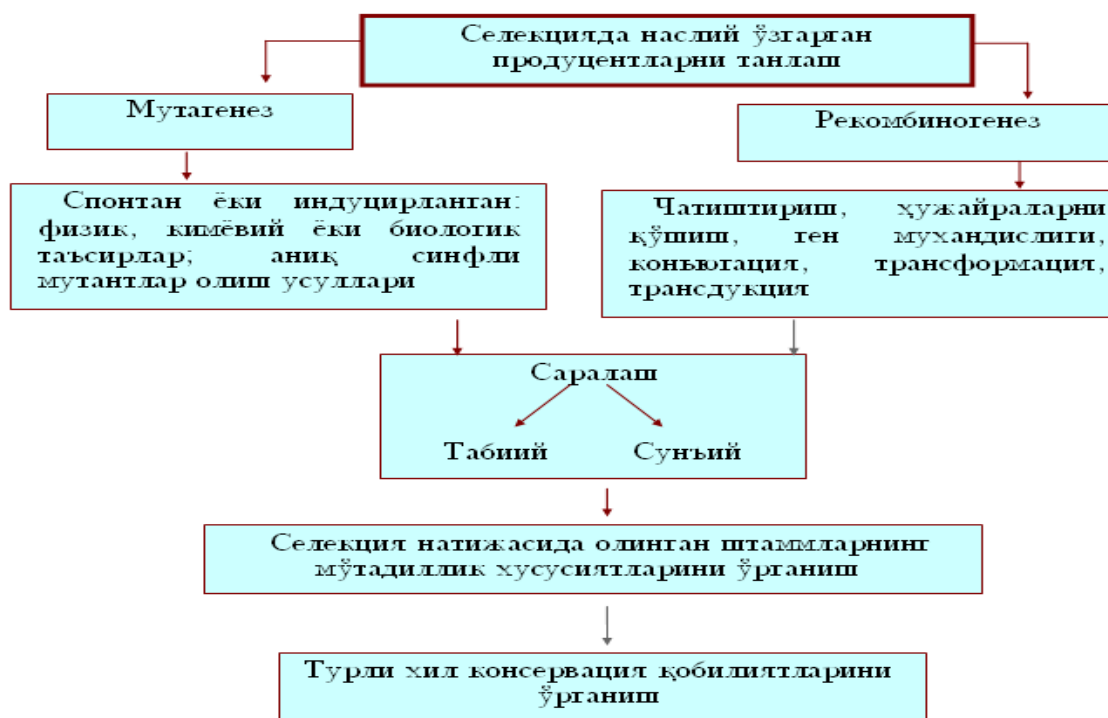
- ✓ *ўсиш тезлигининг баландлиги,*
- ✓ *арзон озиқа муҳитида ўсиши,*
- ✓ *бошқа микрофлорага ва фагга чидамлилиги,*
- ✓ *юқори ҳосилдорлиги.*

2. Продуцентларни яратиш усуллари

Микроорганизмларнинг табиий штаммларини ҳосилдорлиги кўпинча талаб даражасидан паст бўлади.

Ҳосилдор штаммлар яратиш учун йўналтирилган селекция - усулидан фойдаланилади. Бунинг учун кимёвий мутагенлар ёки радиацион нурлардан фойдаланилади. Селекция ва танлов ишлари баъзида йиллаб вақт егаллайди ва натижада микроб ҳосилдорлигини 100 ва ундан ҳам кўпроқ маротабалаб ошириш мумкин бўлади. Масалан, ҳозирги даврда саноат усулида ишлатиб келинаётган пенициллин антиотики синтез қиладиган продуцентнинг фаоллиги дастлабки штаммларга қараганда 10 минг маротабадан ошиб кетган.

Юқори фаолликга ёки ҳосилдорликга ега бўлган штамм яратиш учун селекционер, табиий штаммни генетик материалларини ўрганиш борасида ўта мураккаб, ўта нафис ишларни амалга ошириши лозим бўлади. Бунда, генларни рекомбинацияси билан боғлиқ бўлган барча усуллардан, хусусан: конъюгация, трансдукция, трансформация ва бошқа генетик жараёнлардан фойдаланишга тўғри келади (8-расм).



8-расм. Микроорганизмлар селекцияси

Масалан, конъюгация усули (бактериялар орасида генетик материаллар билан алмашиш), нефт қолдиқларини фаол парчаловчи Псевдомонас путида штаммини яратишда самарали фойдаланилган еди.

Кўпинча трансдукция (бактерия вируслари-бактериофаглар ёрдамида бир бактериядан бошқа бактерияга генлар ўтказиш) ва амплификация (керакли генларни нусха сонини

кўпайтириш) усулларида кенг фойдаланиш орқали ҳар хил физиологик фаол моддалар синтез қилувчи ҳосилдор штаммлар яратилган. Кўпгина микроорганизмларда антибиотик синтез қилувчи генлар ва уларни бошқарувчилари хромосомаларда эмас, балки плазмидаларда (хромосомадан ташқаридаги ДНК) жойлашган бўлади. Бундай пайтда амплификация орқали ҳужайрадаги плазмидалар сонини кўпайтириш орқали штаммларни ҳосилдорлигини ошириш мумкин.

Селекция ишларини яна бир йўли бу ҳар-хил бактериялар протопластларини бир-бирига бирлаштириш натижасида генетик рекомбинантлар олиш йўлидир (9-расм).



9-расм. Генларни клонлаш стратегияси

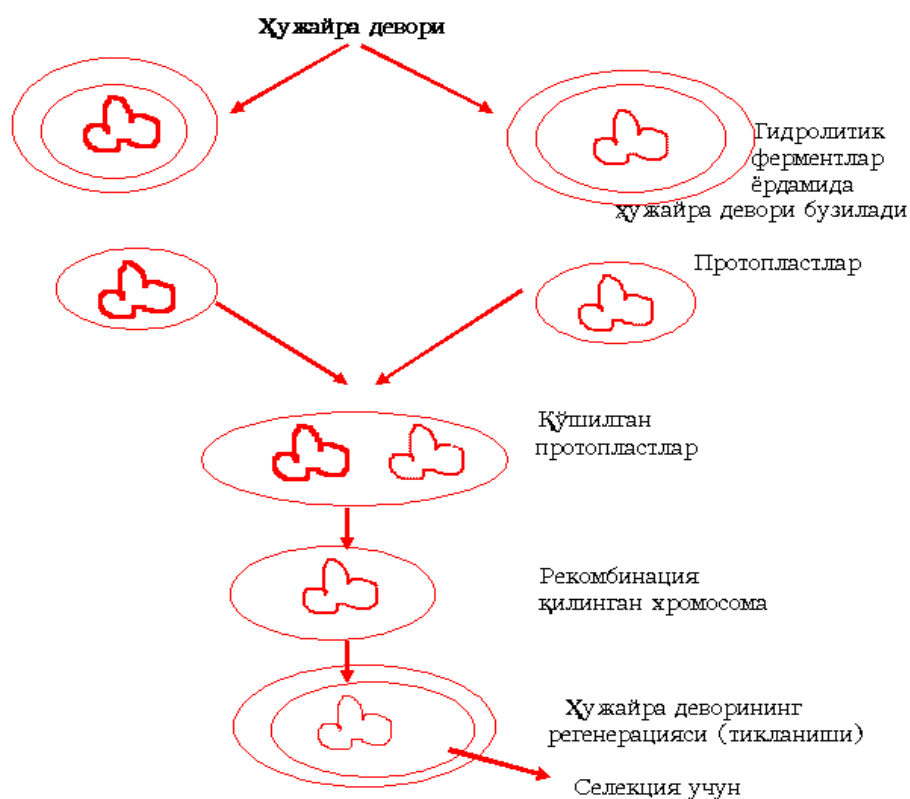
Масалан: Стрептомйцес рептомйцес бактериясининг икки хил штаммларидан олинган протопластларни бир-бирларига бирлаштириш оқибатида С-рифамицин синтез қилувчи ҳосилдор штамм яратилган. Рифампицин синтез қилмайдиган Ноцардиа медитерранеи штаммлари протопластларини бир-бирларига қўшиш оқибатида рифампицинни 3 янги ҳосиласини синтез қилувчи штамм яратилган.

Протопластларни қўшилиши орқали табиий шароитда бир-бирлари билан қўшилмайдиган микроорганизмларни генетик материалларини бирлаштириш ҳам мумкин.

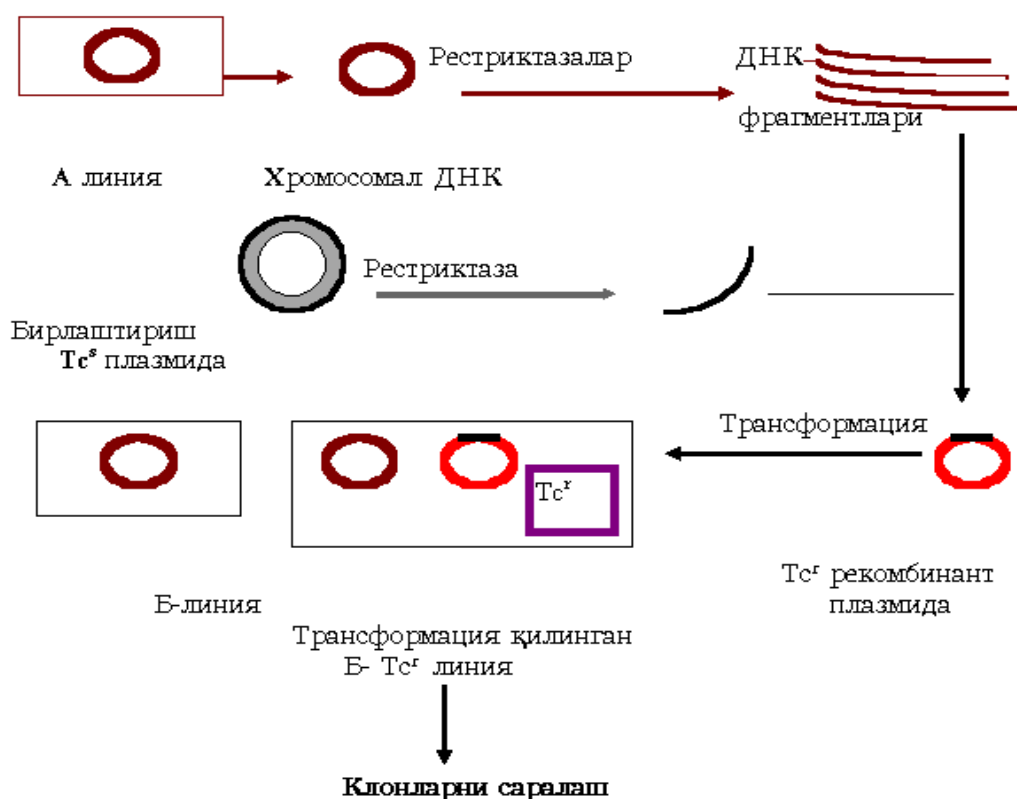
Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш

Ўтган асрнинг 70 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) муҳандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ҳужайрадан ташқарида рекомбинант ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф

ҳолда ажратиш, уларни модификация қилиш, бирини иккинчисига улаш, “генлар мажмуаси” яратиш, оқибатида бутунлай янги хусусиятига ега бўлган оқсил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оқсиллар муҳандислиги деб аталади (**10-расм**).



10-расм. Протопластларнинг қўшилиши орқали махсулдор мутант штаммлар олиш механизми



11-рasm. Плазмида ДНК си ва бактерия ҳужайрасидан фойдаланиб, генини клонлаш чизмаси

Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Кейин, бу бирикма (вектор ген) микроорганизм ҳужайрасига юборилади (трансформация) ва у ерда амплификация (кўпайиш) амалга ошади.

Натижада бир генининг бир неча нусхаси – клон пайдо бўлади. Шунинг учун ҳам бу йўлни клонлаш деб аталади.

Агар клонлаш мақсадида ҳамма генлар сақловчи одам ДНК си ишлатилса, одамнинг ген кутубхонаси (клонотека) ҳосил бўлади.

Бу усулда бактерияларга клонлаштирилган инсон, ҳайвон ёки ўсимликлар генлари тўғридан-тўғри бактерияда фаолият кўрсата олмайди.

Ишлаш учун еса, уларни бактериядан ажратиш, бактерия генини бошқарувчиси (регулятор) билан жиҳозлаш ва қайтадан бактерияга киритиш зарур.

Бугунги кунда ҳар хил генлар сақловчи ва керакли маҳсулот синтез қилувчи бир қатор трансген бактериялар яратилган ва муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда.

Шу сабабли ҳам табиий штаммлар ёрдамида олинadиган маҳсулотлар (биринчи авлод маҳсулотлари) билан бир қаторда трансген штаммлар ёрдамида рекомбинант оқсиллар (иккинчи авлод маҳсулотлари)ни саноат миқёсида ишлаб чиқариш йўлга қўйилган. Биологик маҳсулотларни учунчи авлоди – табиий оқсилларнинг вазифаларини тўлиқ бажара оладиган, аммо табиий бўлмаган маҳсулотларни синтез қилиш натижасида пайдо бўлади.

Ген–муҳандислиги усуллари (рекомбинант ДНК технологияси) тиббиёт учун зарур бўлган, қимматбаҳо оқсил моддалари ишлаб чиқариш ёки кўп тонналик оқсил моддалари ишлаб чиқариш жараёнларида кенг қўлланиб келинмоқда. Энг аввало инсон организмида синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган оқсил ва пептидларни синтез қилишни йўлга қўйиш катта аҳамият касб этади.

Ген муҳандислиги муаммолари билан шуғиланadиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган

бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараёни асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ эмас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оксил моддаларини керакли меъёрга ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир.

БИОТЕХНОЛОГИЯДА ГЕН МУХАНДИСЛИГИ

Ҳозирги вақтда қайси продуцент микроорганизмдан фойдаланган ҳолда фойдали маҳсулотлар олиш мумкинлигини аниқ кўрсатиб бериш мумкин. Агарда бундай продуцент бўлмаса, қай тариқада ва қандай шароитда юқори даражада исталган турдаги маҳсулотни олиш хусусиятни намоён қилувчи продуцентни яратиш мумкинлигини олдиндан айтиб бериш имкониятлари мавжуддир.

Биотехнологик ишлаб чиқаришда бугунги кунда микроорганизмларни минглаб штаммларидан фойдаланилмоқда.

Ўзбекистон республикаси мустақилликка еришгандан сўнг қишлоқ хўжалиги, халқ хўжалиги ва озиқ-овқат ишлаб чиқариш соҳасига бўлган муносабат тубдан ўзгарди. Шу боисдан озиқ-овқат маҳсулотлари ишлаб чиқариш соҳаси мутахассислари жаҳон халқ хўжалигида кенг қўламда қўлланилаётган биотехнология фанини замонавий кўринишларидан бири бўлган ген мухандислиги усуллари мукамал егаллашилари ва амалиётга тадбиқ ета олишлари лозим.

Биотехнологияда ген мухандислиги соҳасини ўрганишдан мақсад, тирик организмлар ирсий белгилари ҳақидаги ахборот жойлашган ДНК молекуласининг тузилиши ва роли, ген молекуляр биологияси; генетик мухандисликнинг моддий асослари: трансформация, трансдукция, кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонлар, плазмидлар, вируслар, бактериофаглар, рестриктазалар, рекомбинант ДНК олиш, генларни клонлаш, ҳужайра мухандислиги, ҳужайра ва тўқималарни сунъий шароитда ўстириш технологияси; генетик мухандисликнинг ўсимликлар селекциясида қўлланилиши; ген мухандислигига асосланган биотехнологиянинг аграр саноатдаги илмий-техник тараққиётни тезлаштиришдаги роли; гибридмалар олиш технологияси ва унинг қишлоқ хўжалигида ва чорвачилиқда қўлланилиши ҳамда генетик мухандисликнинг истиқболлари ҳақидаги аниқ билимларни ўрганишдан иборат.

Ушбу фаннинг асосий вазифаси замонавий ген мухандислиги ютуқларини халқ хўжалиги амалиётида кенг қўламда қўллашдан иборат.

Тирик организмлар ирсий ахборотини сунъий йўл билан маълум мақсадга мувофиқ ўзгартириш жараёни генетик мухандислик фанининг асосий устқурмаси ҳисобланади. Генетик мухандислик ҳужайра, хромосома ва ген даражасида амалга оширилади:

1. Ҳужайра даражасидаги генетик мухандислик икки ҳужайрани ўзаро қўшиш йўли билан амалга оширилади.
2. Хромосома даражасидаги генетик мухандислик ҳужайра ядросига қўшимча хромосомалар киритиш орқали амалга оширилади.
3. Ген даражасидаги генетик мухандислик ёки ген мухандислиги энг мураккаб бўлиб, қуйидаги босқичлар асосида амалга оширилади:
 - а. Қимматли хўжалик аҳамияти касб етадиган ген функцияси орқали қидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.
 - б. Ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, транспозон ёки плазмид ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.
 - с. Вектор конструкция трансформация усули билан ҳужайрага киритилади ва трансген ҳужайра олинади.

Трансген хужайрадан сунъий равишда етук ўсимлик ўстирилади. Ушбу усулдан фойдаланиб ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар хужайраларидан трансген формалар олиш мумкин.

Биотехнологияда ген мухандислиги ютуқларини чуқур ўрганиш ва улардан оқилона фойдаланиш трансген ўсимликлар ва ҳайвонлар олиш биотехнологиясининг юзага келишида асосий омил бўлиб хизмат қилди. Бу усул билан қимматли хўжалик аҳамиятига ега бўлган бир қатор ўсимликлар ва наслдор қорамол клонлари яратилди.

Хужайра мухандислиги усулларида фойдаланиб, тирик организмлардан гибрид хужайралар олиш биотехнологияси яратилди ва бу асосида моноклонал антителалар олиш йўлга қўйилди. Биотехнологиянинг бу соҳасига дастлабки қадамлар 1973 йил биринчи ген клонланган вақтдан бошлаб қўйилган еди (5-жадвал).

5-жадвал.

Янги биотехнологиянинг дастлабки асосий босқичлари

Кашф етилган вақти	Бажарилган ишлар
1973 йил	Биринчи ген клонланган
1974 йил	Биринчи бактерия генларини клонлаш экспрессияси амалга оширилди.
1975 йил	Биринчи гибридома яратилган
1976 йил	Рекомбинант ДНК технологиясидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш бошланган.
1980 йил	Ген мухандисли усуллари ёрдамида олинган микроорганизм штамmlарини патентлаш ҳақидаги қарор қабул қилинган.
1981 йил	Моноклонал антителла тўпламларидан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор қабул қилинган. Биринчи марта генларни автоматик синтезатори сотувга чиқарилди.
1982 йил	Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва ҳайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга рухсат берилди.
1983 йил	Биринчи маротоба ген экспрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги исботланди.

Илмий ишлар давом еттирилмоқда. Ҳозирги вақтда кун тартибда ОИТС (СПИД) га қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

Ген мухандислиги биотехнологиясининг ютуқлари саноат кўламида ва қишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Хусусан, антибиотиклар, аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар ишлаб чиқарилмоқда, наслдор қорамол клонлари яратилмоқда, тупроқда ва сувда заҳарли пестицид қолдиқларини парчалайдиган микроорганизмларни трансген штаммлари олинмоқда, атмосфера азотини ўзлаштирувчи микроорганизмлар генлари асосида тупроқни азотли ўғитлар билан бойитиш муаммоси ечилмоқда, зарарли хашаротларга ва патоген микроорганизмларга чидамли, экологияни асровчи трансген ўсимлик навлари етиштирилмоқда, ирсий касалликларни тезкор ташхис қилиш учун диагностикалар тайёрланмоқда, шунингдек, ген терапия такомиллаштирилмоқда.

Бугунги кунда генетик мухандисликка асосланган биотехнология тезкор ошиб бораётган, инсон еhtiёжларини қондириш учун классик технологиялардан ўта самарали эканлигини тўла намоён қилмоқда.

1. ДНК, РНК ва оксил молекулаларининг биосинтези.

ДНК репликацияси.

Тирик организмда олдиндан мавжуд қолип асосида янги ДНК молекуласининг яратилиши нуклеин кислоталарининг синтезланиш йўлидир. Мавжуд ДНК молекуласидан нусха олиш репликация деб аталади.

Репликация жараёни ДНК-полимераза I, II, III, ДНК-лигаза ва ревертаза ферментлари ёрдамида амалга ошади. реп-белок ёрдамида ДНК қўш занжири ажралади ва ДНКга боғланадиган оксил молекулалари ёрдамида ДНКнинг ажралган занжирлари стабил ҳолатда сақланиб турилади. ДНК-полимераза III ферменти ДНК нинг 3' учидан 5' учигача ДНКнинг битта занжирини тўла синтез қилиш қобилиятига эга. ДНК синтези фақат ДНК нинг 3' учидан 5' учига қараб бориши туфайли ДНК нинг иккинчи занжири праймаза, ДНК-полимераза I ва ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида амалга ошади.

Праймаза (ревертаза) ферменти ёрдамида ДНК нинг иккинчи занжири синтези учун праймер синтез қилинади ва ДНК-полимераза III ферменти ёрдамида праймер нуклеотидлар кетма-кетлигидан ДНК синтези бошланади ва ДНК-полимераза I ферменти ёрдамида бу нуклеотидлар кетма-кетлиги бир оз узайтирилади. Кўплаб ҳосил бўлган ДНК фрагментлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Бу жараён ДНК нинг иккинчи занжири тўла синтез бўлгунча давом этади. Янги ДНК занжири тайёр ДНКнинг нусхасига, матрицасига қараб тузилади. Бу жараёнда матрица вазифасини ДНК қўш занжирининг бир ипи бажаради.

РНК синтези жараёни транскрипция деб аталади. Ҳар учала типдаги РНК синтези турли типдаги РНК-полимераза (РНК-полимераза I, II, III) ферментлари ёрдамида амалга оширилади. пРНК синтези РНК-полимераза I ферменти, иРНК РНК-полимераза II ферменти ва тРНК ҳамда кичик ўлчамли ядро РНК си молекулалари РНК-полимераза III ферменти ёрдамида амалга оширилади. Ҳамма РНК молекулалари синтези учун ДНК нинг битта ипи матрица вазифасини ўтайди.

Оқсил синтези рибосомаларда ўтади. Рибосома хужайра метаболизми учун зарур бўлган оқсиллар синтезини ДНК дан олинган информация асосида кодлаш механизмига мувофиқ амалга оширади (12-расм) .



12-расм

ДНК занжиридан олинган иРНК нуклеотидлар тартиби шаклидаги информация рибосома ёрдамида оқсил молекуласидаги аминокислоталар тартибига кўчирилади. Оқсил синтези жараёни трансляция (таржима қилиш) деб аталади. Нуклеин кислоталарда ҳар бир аминокислоталарни танийдиган ва танлаб бириктириб олиб ташишда воситачилик қиладиган бирин-кетин учта нуклеотидлар комбинацияси мавжудки, бу ўз навбатида аминокислота коди, оқсил коди, кодон, кенг маънода генетик код деб юритилади.

Оқсил молекуласига кирадиган аминокислоталар 20 та бўлганлигидан кодонлар сони ҳам 20 дан кам бўлиши мумкин емас. Бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони 4^3 , кодланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп, лекин маълум бўлдики 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортиқ 2, 3, 4, ва 6 кодон билан кодлана олар екан. Бундан ташқари, учта кодон УАА, УАГ, УГС аминокислоталарни кодламайди ва полипептид занжирининг тугаганидан дарак беради, улар терминаторлар «тугатувчилар» деб аталади. Полирибосомаларда оқсил синтези иРНКнинг 5' охиридан бошланиб 3' охирида тугайди. Оқсил синтези тугагач иРНК рибосомадан ажралиб чиқади ва рибосома иккита субпарчаларга диссоциацияланади.

Мутация жараёни ва ДНК репарацияси.

ДНК молекуласи структурасини ташқи номуқобил омиллар таъсирида ўзгариши мутация дейилади. Мутацияга учраган ДНК молекуласида ирсий ахборот ўзгаради ва организмнинг мўтадил ҳолатда яшашига кескин таъсир кўрсатади. Тирик организмнинг мутант формалари вужудга келади. Бошқа организмлардан фарқли ўлароқ ўсимлик ва микроорганизмларнинг хўжалик аҳамияти юқори бўлган мутант формалари халқ хўжалигида кенг қўламда фойдаланилади (2-жадвал).

6-жадвал.

Ауксотроф мутантлар ёрдамида Л-аминокислоталарининг бирламчи метаболитларини олиниши

Амино-кислота	Продуцент	Тансиқ модда	Субстрат	Културал суюқликда аминокислоталар миқдори, г/л
Л-лизин	Бревибацтериум флаум	Треонин, метионин ёки гомосерин	Глюкоза сахароза	60-100
Л-трионин	Эscherichia coli	Лизин, метионин, изолейцин	Глюкоза	20
Л-орнитин	Сорйнеобацтериум глутамицум	Аргинин	Глюкоза	26
Л-фенил-аланин	Артхробацтер парафинеус	Тирозин	Ҳ-алканлар	15
Л-тирозин	Сорйнеобацтериум сп.	Фенилаланин	Ҳ-алканлар	19
Л-валин	Сорйнеобацтериум глутамицум	Изолейцин	Глюкоза	11

Инсон организмидаги мўтацион ўзгаришлар оғир касалликларни келиб чиқишига сабаб бўлади (оқ қон касаллиги).

Мутацияга учраган ДНК молекуласини асл ҳолатига қайтиш жараёни ДНК репарацияси дейилади. Репарация жараёни ДНК аза, ДНК-полимераза ИИ ва ДНК-лигаза ферментлари иштирокида амалга оширилади. Бу ферментлар тизими ёрдамида ДНК структураси дастлабки мўтадил ҳолатига қайтади.

2. ГЕН МУХАНДИСЛИГИНИНГ МОҲИЯТИ ВА ВАЗИФАЛАРИ

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўтадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар қўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия хужайрасига кўчириб ўтказадиган ситема -плазмидалар ҳам бор . Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар -плазмидлар ва мўтадил вируслар вектор деб аталади (4-жадвал).

Улар табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлади. Шундай экан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оксилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан деган савол туғилади?

Бу ғояларнинг амалда юзага чиқиши ген мухандислиги ёки генетик мухандислик деб аталадиган ва катта истиқболга ега бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

7-жадвал

Векторлар	Нусхалар миқдори	Ўлчами, минг нуклеотидлар
клонлаш учун плазмид векторлари: пБР 322 пАСУ 184	40-50 ~20	4,4 4,0
клонлашда махсус катталиқдаги векторлар: л Чрон 4А космида пХС 79	100-200 ~20	41,8 6,4
генлар экспрессияси учун плазмид векторлари: п трп ЭД5-1	40-50	6?7

Ген мухандислиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисмларга бўлиш, керакли жойидан кесиш, керак емас қисмини олиб ташлаш, керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ организмга киритиб (масалан одамнинг инсулин генини микроб хужайрага ёки сичқоннинг ўсиш гармони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳақозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (6-чизма).

Айрим ДНК молекулалари генлар бир туринг кўп нусхасини ҳосил қилиш учун илгаридан хужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатиладган клонирлаш техникасининг молекулаларига мослаштирилган варианти қўлланади. Хужайра линияларининг бир хиллигини клонирлаш усули билан кучайтириш мумкин. Клон деб бирдан-бир олд хужайрадан келиб чиққан хужайралар популяциясига айтилади. Клонирлаш асосан мутант хужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонирлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.

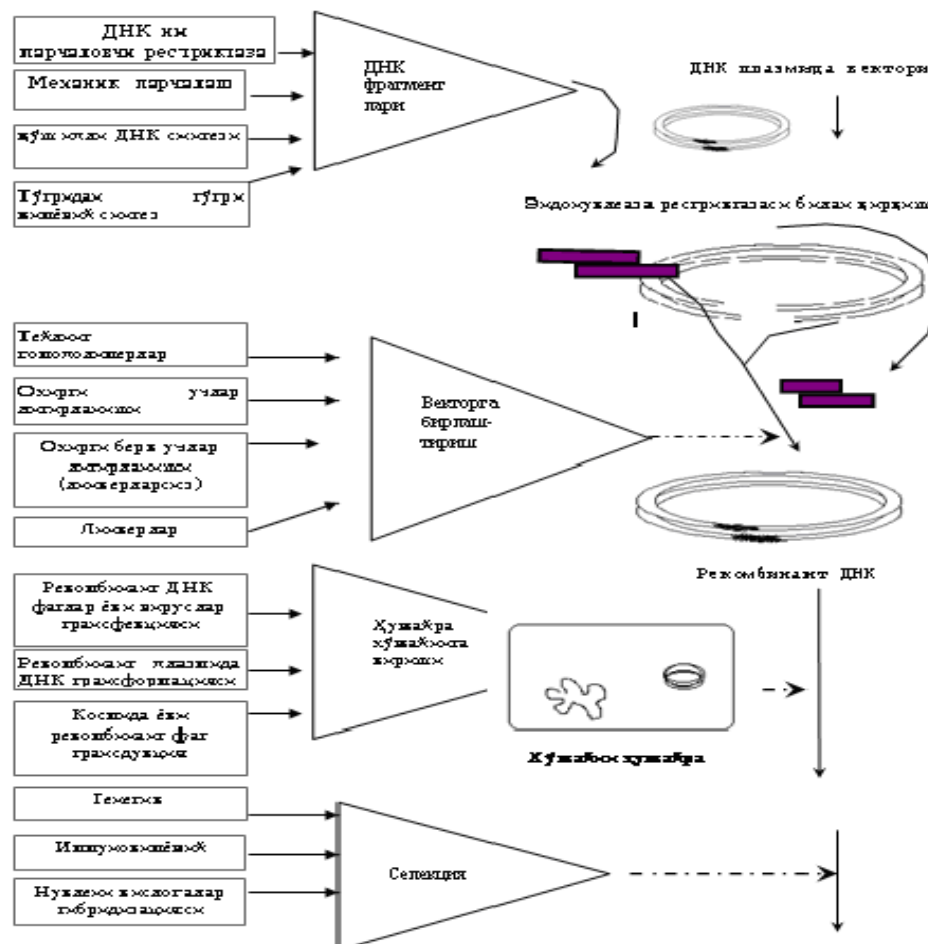
2.1. Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф этилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга ега бўлди.

Кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонларни ўсимлик организмда АҚШ олимаси Барбара Мак Клинтон, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва хашаротларда Россия олими Георгий Георгиев кашф этган.

Кўчиб юрувчи генетик элементлар айни вақтда транспозицион элементлар ёки транспозонлар деб ҳам аталади. Транспозонлар хилма-хил структурага ега бўлсалар-да, барча транспозон молекулаларининг икки четида махсус нуклеотидлар изчиллиги, марказий қисмда еса ДНК молекуласининг белгиланган жойида "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб нотекис кесувчи транспозаза ферментини синтез қилувчи ген мавжуддир.

Транспозаза ферменти хужайрадаги ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесади ва айни пайтда транспозон учларига қовуштиради. Ҳосил бўлган хромосома ДНКси ва транспозон ДНКсидан иборат қовушма хужайра ДНК бўлақларини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг хужайра ДНКсига интеграцияси қуйидагича амалга ошади.



13-расм. Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

Транспозонлар хромосомада ўз ўрнини ўзгартирганда ирсият ҳам ўзгаради. Одатда яшаш муҳити кескин ўзгарганда транспозонларнинг кўчиб юриши ортади. Шу сабабдан кўчиб юрувчи генетик элементлар иштирокида ген мухандислигига асосланган кўпгина биотехнологик жараёнлар яратилган.

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

Бактерия ва тубан эукариот организмлар хужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга эга бўлган халқасимон ёки чизиксимон структурага эга бўлган қўшимча хромосомалар мавжуддир бу мини-хромосомалар плазмидлар деб аталади. Плазмид ДНКси кўпи билан 3-10 тагача генларни ўзида сақлайди. Бу генлар, асосан антибиотик ёки заҳарли токсинларни парчаловчи ферментларни синтезига жавобгардир. Шу туфайли плазмидлар бактерия, ачитки ва замбуруғларнинг антибиотик ва заҳарли токсинларга чидамлилигини таъминлайди.

Плазмиднинг антибиотик парчаловчи генлари бир плазмиддан иккинчисига транспозонлар билан бириккан ҳолатда ҳам кўчиб ўта олади. Бу молекуляр жараён касал чақирувчи микробларнинг антибиотикларга чидамлилигини нихоятда оширади. Плазмидлар ўз хусусиятига кўра иккига бўлинади.

Биринчиси транспозон ёки бактериофаг ирсий молекуласи каби хужайра асосий хромосомасининг махсус ДНК изчиллигини кесиб, рекомбинация бўла оладиган плазмидлар.

Бундай рекомбинацияланувчи плазмидлар трансмиссибл, яъни наслдан-наслга ўтувчи плазмидлар деб аталади.

Трансмиссибл плазмид асосий хромосомага бириккандан кейин ўз мустақиллигини йўқотади. Асосий хромосомадан мустақил равишда ўз-ўзини репликация қила олмайди. Айни пайтда бундай плазмидларда жойлашаган генлар асосий хромосомага ўз фаолиятини бажаради. Хужайра бўлинганди рекомбинацияланувчи плазмид генлари асосий хромосома генлари бириккан ҳолда наслдан-наслга берилади. Иккинчи тоифа плазмидлар автоном ҳолда репликацияланувчи плазмидлар деб аталади. Бундай плазмидлар асосий хромосомага бирика олмайди, асосий хромосомалардан мустақил равишда ўз-ўзини репликация йўли билан ўнлаб ва ҳатто юзлаб марта кўпайтира олади. Автоном плазмидлар бактерия ёки замбуруғ бўлинганди киз хужайралар орасида тасодикий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир хужайрадан иккинчисига хужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидадан ўта олади.

Табиатда бирор микроорганизм хужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол хужайра нуклеаза ферментлари орқали парчалаб ташланади.

ДНК молекуласини майда бўлакларга бўлувчи ферментлар кесувчи эндонуклеазалар ёки рестриктазалар деб аталади. Ҳар бир рестриктаза тўрт ёки кўпроқ махсус нуклеотид жуфтларни таниб олиб боғланади ва ДНК молекуласини кесади. Айрим рестриктазалар ДНК қўш занжирини қайчи сингари шартта икки бўлакка бўлади. Бундай рестриктазаларга Алу II, Дра II, Ҳае IIII, Ҳпа II, ЭцоР В, Ҳинд III, Пву III, Рса II, Сца II, Сма II ва бошқаларини мисол қилиб келтириш мумкин (5-жадвал).

Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (Аат III, Ацц IIII, Апа II, Бам ҲИ, ЭцоРИ, Ҳинд IIII ва бошқалар). Бу рестриктазалар функцияси жиҳатдан транспозага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқоқ" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлакларини бир - бирига боғлаш осонлашади. Ана шу хусусияти туфайли бу хил рестриктазалар ген муҳандислигида кенг қўлланилади. Ҳозирги кунгача 500 дан ортиқ хилма хил рестриктазалар тоза ҳолда ажратиб олинган ва ўрганилган.

Одатда микроорганизм ирсий моддасининг хромосомаси бир неча миллион нуклеотид жуфтлари изчиллигидан иборат. Ўсимлик ёки ҳайвон геноми бир неча юз миллиондан то 1 миллиардгача нуклеотид жуфтлари изчиллигидан тузилган. Бундай буюк молекулани юқорида қайд қилинган хилма - хил рестрикция эндонуклеазалардан фойдаланиб кўплаб бўлакларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК бўлаклари электрофорез мосламасида махсус молекуляр "елак" тешикларида юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлаги махсус бўёқ билан бўяш натижасида ультрабинафша нурлари ёрдамида оддий кўз билан кўрилади.

8-жадвал.

Ген муҳандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	Рестриктаза олинган микроорганизмлар	Рестриктазаларнинг "аниқлайдиган" ва кесадиган охириги учлари
Эцо RI	Эшеричия коли RI	-Г-А-А-Т-Т-С- -С-Т-Т-А-А-Г-
Ҳинд IIII	Ҳаеопхилус инфлуензае	-А-А-Г-С-Т-Т- -Т-Т-С-Г-А-А-
Сал II	Стрептомйцес албус	-Г-Т-С-Г-А-С- -С-А-Г-С-Т-Г-
Бам II	Бациллус амйлоликуефациенс	-Г-Г-А-Т-С-С- -С-С-Т-А-Г-Г-
Ҳпа III	Ҳаеопхилус параинфлуензае	-С-С-Г-Г- -Г-Г-С-С-

Алу И	Артхробактер лутеус	-А-Г-С-Т- -Т-С-Г-Т-
Ҳаеи ИИИ	Ҳаеиопхилус аегиптиус	-Г-Г-С-С- -С-С-Г-Г-
Сма	Серратиа марцесценс СД	-С-С-С-Г-Г-Г- -Г-Г-Г-С-С-С-

ДНК нинг майда бўлаклари электр майдонида гел ғовакларидан йирик бўлакларга нисбатан тез ҳаракат қилгани учун уларнинг стартдан босиб ўтган масофасини ўлчаб ДНК бўлагининг катта-кичиклиги аниқланади. Электрофорез мосламасида бир-биридан фақат бир нуклеотид кам ёки кўплиги билан фарқланувчи ДНК бўлагини ажратиш мумкин. Рестрикцион эндонуклеаза ферментларининг очилиши ва электрофорез мосламасида ДНК бўлакларини ўта аниқлик билан бир-биридан ажратишнинг такомиллашуви гигант ДНК молекуласидан исталган ДНК бўлагини ажратиб олиш имконини беради.

Хулоса қилиб айтганимизда ген муҳандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформация ва трансдукция жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестрикцион эндонуклеаза ферментларини тўла фундаментал асосларини ўрганиш киради. Юқорида қайд қилинган биологик фаол моддалар ген муҳандислиги биотехнологиясининг амалий жараёнларида ўта қимматли омил ҳисобланади.

Рекомбинант ДНК олиш усуллари

Сунъий шароитда рекомбинант ДНК олиш ва генларни клонлаш илк бор 1972 йилда АҚШ олимлари Боер ва Коен томонидан амалга оширилган. Бу олимлар Э.цоли бактериясининг хромосома ДНКсига ва шу бактерия плазмидасига алоҳида идишларда ЭцоРИ рестриктаза ферменти билан ишлов берганлар. Плазмида таркибида фақат 1 дона ЭцоРИ рестриктаза ферменти таниб кесадиган махсус нуклеотидлар изчиллиги бўлганлиги сабабли фермент плазмиданинг халқасимон ДНК қўш занжирини фақат бир жойдан кесиб, плазмидани «ёпишқоқ» учли очик ҳолатга ўтказди. Хромосома ДНК молекуласида ЭцоРИ рестриктаза ферменти таний оладиган махсус нуклеотидлар изчиллиги қандай бўлса, бу молекула шунча бўлакка бўлинади.

Турли хил ўлчамга ега бўлган ДНК молекуласи электрофорез услуби ёрдамида ажратиб олинади. Ажратиб олинган «ёпишқоқ» учли хромосома ДНКси бўлаги очик ҳолатдаги «ёпишқоқ» учли плазмид ДНКси билан аралаштирилиб лигаза ферменти ёрдамида тикилади. Натижада плазмид таркибига хромосома ДНК бўлаги киритилади.

Шу боисдан рекомбинант ДНК га қуйидагича тариф бериш мумкин: ҳар қандай тирик организм ирсий молекуласининг исталган бўлагини вектор молекулаларига бирикишдан ҳосил бўлган сунъий ДНК рекомбинант ДНК дейилади.

Рекомбинант ДНК олишнинг учта усули мавжуд-коннектор усули, рестриктаза-лигаза ва линкер молекулаларидан фойдаланиш усули. Коннектор усулида рекомбинацияда иштирок етувчи ДНК бўлагининг 3' учига дезоксинуклеотидилтрансфераза ферменти ёрдамида малум узунлик даги олиго (дА) - сегменти уланади. Иккинчи учига еса олиго (дТ) - сегменти уланади. Бу ДНК бўлаклари аралаштирилганда дА ва дТ сегментларнинг водород боғлари асосида комплементар бирикиши туфайли халқасимон ДНК структураси ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган ДНК даги бир занжирли бўш жойлар ДНК-полимераза И ферменти ёрдамида тулдирилади.

Рестриктаза-лигаза усули энг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазмида «ёпишқоқ» учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳолда маълум шароитда реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари ўзаро

водород боғлари ёрдамида бирикиб халқасимон структура ҳосил қилади ва ДНК занжирининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади.

Линкер молекулаларидан фойдаланиш усулида ДНК молекуласига ва вектор плазмидага Т4 фаг ДНК-лигаза ферменти ёрдамида махсус нуклеотид кетма-кетлигига ега бўлган линкер молекула уланади. Олинган икки турдаги ДНК молекуласи рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилиб аралаштирилган ҳолда реассоциация қилинади. ДНК ва вектор плазмида молекулаларининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Шу юсинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Генетик рекомбинация – икки хромосомалараро генларнинг алмашинувидир. Понтекорвонинг 1958 йилда берган таърифига кўра, рекомбинация – 2 ёки ундан ортиқ детерминант ирсий белгиларга эга бўлган хужайра ёки организмларнинг ҳосил бўлишга олиб келадиган жараёндир. Бундай рекомбинация сут эмизувчиларда жинсий хужайраларнинг ҳосил бўлишида албатта рўй беради. Мейоз вақтида гомологик хромосомалар генлар билан алмашинади (кроссинговер); айнан ана шу алмашинув орқали ирсий белгиларни авлоддан-авлодга ўтишини тушунтириш мумкин. Вирус ва бактерияларда генетик рекомбинация ҳайвонларга нисбатан камроқ бўлади. Генетик материалнинг алмашинуви, ундан кейин содир бўладиган рекомбинация бир ёки бир-бирига яқин турларда рўй беради.

Барча тирик организмларда рестрикция эндоуклеазалар мавжуд бўлиб, улар организмга кирган ёт ДНКни танийди ва уни парчалайди.

Генлар алмашинуви ёки генни хужайрага киритиш *Ин витро* шароитидаги генетик рекомбинация орқали амалга оширилиши мумкин. Бу усул бактерияларда, хусусан, ичак таёқчаси хужайраларига ҳайвон ва одам генлари киритилиб, улар репликацияланишига эришиш натижасида ишлаб чиқилган.

Ин витро шароитида генетик рекомбинацияни амалга оширишнинг моҳияти турли турлардан ДНКни ажратиш, ДНКнинг гибрид молекулаларини олиш ва ҳосил бўлган рекомбинант молекулаларни янги белги, масалан, ўзига хос оксилни синтезини ҳосил қилиш мақсадида тирик хужайраларга киритишдан иборатдир (расм)

Генни ажратиш олиш учун биокимёвий методлардан фойдаланилади. Ҳайвон хужайраларида мРНК транскрипцияси хужайра ядросида содир бўлади: мРНК молекулалари информацияни ядродан цитоплазмага ташийдди, (бунда улар оксиллар трансляцияси учун ишлатилади). Бактерия хужайраларида эса транскрипция ва трансляция бир вақтда ва уйғунлашган ҳолда рўй беради: мРНК рибосомалар билан боғланган. Рибосомалар трансляция жараёнида ва ҳайвон хужайраларида муҳим рол ўйнайди.

ДНК молекуласи оксил структураси ҳақидаги ахборотдан ташқари бир қатор бошқарувчи сигналларга ҳам эга. Бу сигналлар транскрипция ва трансляция учун бошланғич нуқта ҳисобланади. Ҳайвон хужайраларида оксил структураси тўғрисидаги ахборот ДНКнинг бир нечта сегментида, яъни ДНК қисмлари билан ажралган сегментларида (интронлар деб номланади) кодланиши мумкин.

Бактерия хужайраларига ДНКни киритиш 2 усулда амалга оширилади:

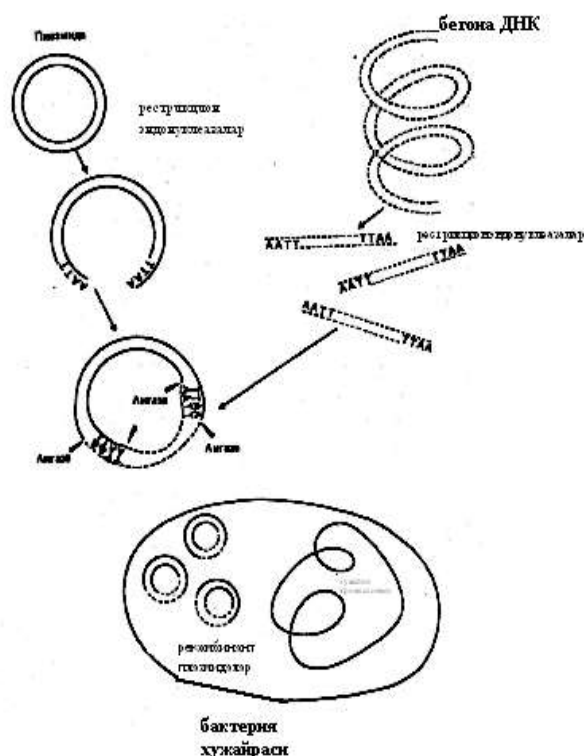
1. Вектор сифатида плазмидадан фойдаланиш
2. Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиш.

1950 йилнинг бошларида Ледерберг *Э.коли* да конъюгация жараёни рўй беришини кўрсатиб бергандан сўнг бактерия хужайраларининг “қўшилиши” генетик белгиланган ва бу генетик информация ота типигаги хужайрадан она типигаги хужайрага ёки реципиент хужайрага ўтиши аниқланган. Конъюгация пайтида хужайраларнинг донорлик қилиши (ёки F^- -ҳосилдорлик омили) бошқа исталган генетик белгига нисбатан кам учрайди. F^+ -омил донор хужайранинг исталган маълум генидан мустақил равишда узатила олади. Ледерберг ушбу F^+ -омил юқори организмлар цитоплазмасида учрайдиган хромосомадан ташқари генетик элементга ўхшашлигини таъкидлайди. 1952 йилда хромосомадан алоҳида жойлашган генетик системаларни умумий ном – **плазмидалар** деб аташ қабул қилинган.

Плазмидалар бактерияларнинг деярли барча турларида учрайди. Плазмидали штамм плазмидасиз вариантларни тиклайди. Бундай ҳолатларда плазида бутунлай йўқолади ва хужайра уни регенерация қила олмайди. Буни фақатгина бошқа бактериянинг хужайрасидан олиш мумкин.

Плазмидалар ДНКнинг ҳалқасимон молекулалари бўлиб, бактерия хужайралари геномини 1-3 %ини ташкил қилади. Ирсий аппаратнинг шу кам қисмининг ўзи одатда бактериал хромосома кодламайдиган муҳим генетик белгиларни кодлайди. Масалан, улар бактерия хужайраларини конъюгациялаш учун керакли информацияни сақлайди. Улар хужайранинг озуқа манбаи сифатида кўплаб мураккаб бирикмаларни сарфлаши учун ёрдам беради, ҳамда турли токсик агентларга нисбатан, айниқса антибиотикларга, чидамлилигини таъминлайди. Масалан, стафилококк плазмидалари пенициллин, летал ҳолатга келувчи симоб ва бир қатор оғир металлларга чидамли генларни ташийди. *Э.коли*нинг R -плазмидалари таркибида ҳам оғир металлларга чидамли генлар топилган. *Бациллус тхурингиенсис* хужайраларида инсектицид синтезини бошқаради. Бактерия хужайраларига бегона генларни плазмидалар ёрдамида киритиш 1975 йилдан бошлаб уларнинг структураси ва репликация ҳарактерини аниқлаш учун туртки бўлди.

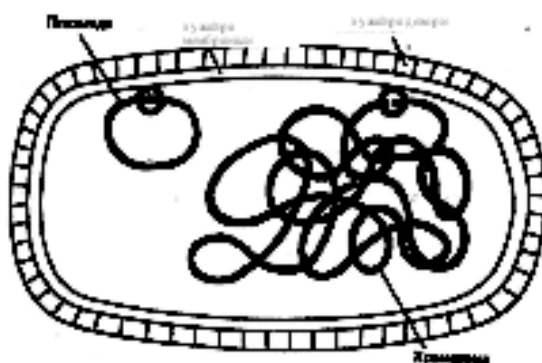
Хужайрада плазмидалар сони 1 ва 100 ортиқ бўлиши мумкин, плазида қанчалик катта бўлса, унинг хужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



14-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия хужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактериялараро плазмидалар алмашилиши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазидадаги генларнинг ўзаро алмашинувига олиб келади. Натижада реципиент хужайралар донор хужайралар ҳисобига тирик қолади.



15-расм

Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиб генни киритиш методида ген вирус геномига жойлаштирилади ва у бактерия хужайрасида вирус геномини кўпайиши давомида ген вирусини билан бирга репликацияланади.

Бактерия ҳужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.

Бактерия хромосомасининг узунлиги 1 мм атрофида бўлиб, у тахминан 3 млн нуклеотидлардан иборат ДНК молекуласидан тузилгандир; у ҳужайрада бир неча минг марта зич жойлашган ва 1 мкм майдонни эгаллайди. Инсон ҳужайраси ДНКси 46 та хромосомада тузилган, уларнинг ҳар бирининг узунлиги тахминан 4 см, нуклеотидлар сони эса 3 млрдга яқиндир. Рестрикцион эндонуклеазалар ДНК молекуласини маълум бир нукталарда парчалайди, натижада бир неча юздан бир неча минггача нуклеотидли фрагментлар ҳосил бўлади. Ҳар бир рестриктазалар ДНКни ўзига хос равишда парчалайди.

Бактерия ҳужайрасига генларни экспрессия қилиш учун ҳайвонларнинг ўзига хос оксил (масалан, инсулин) ишлаб чиқарадиган махсус ҳужайрасидан ушбу оксилни кодлайдиган мРНК ажратиб олинади. Сўнг қайтар транскриптаза ёрдамида мРНКга комплементар ДНК ипи синтезланади. ДНК нусхасига комплементар бўлган иккинчи ип ДНК-полимеразалар ёрдамида ажратилади. Кейинги босқичда қўш ипли ДНКнусхаси трансфераза ферменти иштирокида плазмидага киритилади. Трансфераза ДНК учларида нуклеотидларнинг қисқа кетма-кетлигини тиклайди. Сўнг плазмиданинг махсус жойи рестрикцион эндонуклеаза билан парчаланади. Плазмида парчалангандан кейин унинг учлари трансфераза ёрдамида гуанин қолдиғи бўлган 4 та нуклеотид жойлаштирилади. Шундан сўнг ҳосил бўлган 2 та ДНК молекулаларининг учлари нуклеотидлар кетма-кетлиги ўзаро таъсирлашиши ҳисобига бирикади; бактериал фермент – ДНК-лигаза ёрдамида киритилаётган ДНК ва плазмида ДНКси тикилади. Ҳосил бўлган янги ҳалқасимон плазмида рекомбинант ДНКга эга бўлади.

Маълумки, ҳозирги пайтда инсонлар орасида диабет касаллиги кўп учрайди ва унинг бир неча кўринишлари мавжуддир. Инсулин ёрдамида даволанадиган формаси ушбу гормонни синтезлайдиган ҳужайраларнинг танлаб нобуд бўлиши билан боғлиқдир. Диабетнинг инсулин талаб қилинмайдиган кўриниши эса тегишли диета ёрдамида даволанади.

1921 йили Торонтода Бантинг ва Бест итнинг ошқозон ости безидан гормон ажратиб олишган ва унинг антидиабетик хусусияти борлигини айтиб ўтишган. 1922 йили ҳайвондан ажратиб олинган инсулин касалланган ёш болага юборилган ва кўтилган натижага эришилган. Шундан сўнг инсулин кўп миқдорда ишлаб чиқарила бошланган.

Инсулиннинг биринчи кристаллари 1952 йилда олинган, кейинчалик уни тозалаш методлари такомиллаштирилиб, бошқа гормонал моддалар (масалан, глюкагон – инсулин ва сомататинни антогонисти) ҳам олина бошланган. Гилберт ва унинг шогирдлари инсулин мРНКсини каламуш ошқозон ости безидаги β-ҳужайрасининг ўсмаларидан ажратиб олишган. Бунинг учун мРНКнинг ДНКнусхасини рБР322 *Э. coli* плазмидасига геннинг ўрта қисмига пенициллиназа жойлаштирилади. Ҳосил бўлган ДНКнинг кетма-кетлиги аниқланганда, унинг рекомбинант плазмидаси проинсулин структура тўғрисидаги ахборотга эгалиги маълум бўлган. Ичак таёқчаси ҳужайраларида

мРНК трансляцияси жараёнида пенициллаза ва проинсулин кетма-кетлигини тутган гибрид оксил синтезланган. Оксил таркибидан трипсин ёрдамида гормон ажратиб олинган. Ушбу йўл билан олинган молекулалар ҳам ошқозон ости безидан ажратиб олинган гормон сингари қанд алмашинувига таъсир қилган.

Инсоннинг ўсиш гормони ёки соматотропин, гипофизнинг олд бўлмасидан секрецияланади. Бу гормоннинг етишмаслиги натижасида инсонда гипофизар паканалик келиб чиқади. 4-5 ёшли болаларга гормонни инъекциялаш билан касалликни тузатиш мумкин. Илк марта соматотропин мурдадан олинган ва уни етарлича олиш имкони бўлмаган.

Махсус конструкцияланган бактерия ҳужайраларида синтезланадиган ўсиш гормонини бир неча афзалликларга эгадир, яъни бу йўл билан гормонни кўп миқдорда олиш мумкин, унинг препаратлари биохимик тоза ва вируслардан ҳолидир.

Соматотропинни (191 та аминокислота қолдиғидан иборат) олиш учун биринчи босқичда мРНК қўшиқли ДНК нусхаси клонланади ва рестрикцион эндонуклеазалар ёрдамида парчаланиб гормоннинг биринчи 23 та аминокислотасидан ташқари барча аминокислоталарни кодлайдиган кетма-кетлик ҳосил қилинади. Сўнг 1 дан 23 гача аминокислотага мос келадиган синтетик полинуклеотид клонланади. 2 та фрагмент бир-бири билан бирлаштирилади ва рибосомаларни бирлашадиган участкасига жойлаштирилади. Олинадиган гормон миқдори 1 мл культурага 2,4 мкг тўғри келади. Бактерияларда синтезланган гормон керакли молекуляр массага эга бўлади ва бошқа бактериал оксиллардан холи бўлади.

Қон ҳужайралари ва фибриобластларда интерфероннинг ҳосил бўлиши. Культураларда ўстирилувчи ва интерферон ҳосил қилувчи ҳужайраларнинг барча типи учун интерферон олиш жараёни деярли бир хил. Ҳужайралар Сендай вируси билан зарарлантирилади ва 24 соатдан сўнг центрифугаланади: чўкма усти суюқлигидан интерфероннинг “дағал” препарати олинади ва тозаланади. 2 л қон қайта ишланганда 4 млн бирликдаги интерферон олинади. Деярли ўтган 10 йил давомида интерферон ишлаб чиқаришнинг катта қисми Хельсинкидаги соғломлаштириш маркази лабораториясига тўғри келиб, бу ерда Канделл соғлом донорлар қони лейкоцитларидан интерферон олиш методини такомиллаштирди. Бу лаборатория лейкоцитар интерферон ишлаб чиқариш бўйича лидер бўлиб, йилига 400 млрд интерферон ишлаб чиқарилган.

1960 йилнинг бошларидан бошлаб, Шани соғломлаштириш ва медицина илмий текшириш миллий институти, ИНСЭРМ, Париждаги Сент-Винсент-де-Поль клиникаси) Пастер Институти билан ҳамкорликда интерферон олишнинг ярим масштабда ишлаб чиқаришни йўлга қўйди. 1980 йилнинг мартада ушбу муаммо илмий текшириш институтларининг миллий марказлари, ИНСЭРМ, Пастер институти ва университетларининг олимлари томонидан конференцияда муҳокама қилинди. ИИП фирмаси ва қон қуйиш маркази (лейкоцитлар билан таъминлайди) интерфероннинг ишлаб чиқариш методини

такомиллаштирди ва интерферонни кўп миқдорда ҳосил бўлиш йўллари аниқлади. Ярим йил ичида ИИП 26000 донордан олинган қондан 48 млрд бирлик интерферон олишга эришилган ва Франция, Европада интерферон ишлаб чиқариш бўйича 2-ўринни эгаллади. 1980 йил охирига келиб, ИИП ва соғлиқни сақлаш вазирлиги ўртасида интерферонни синаш бўйича шартнома тузилиб, унга кўра интерфероннинг вирусларга ва ўсмаларга қаршилик хусусияти текширилиб кўрилди ва уни кўп миқдорда ишлаб чиқариш йўлга қўйилиши белгиланди. Интерфероннинг ишлаб чиқарилиши йилига 100 млрд бирликгача орттирилиб (200 касални даволашга етарли), унинг 80 млрд бирлиги клиникаларнинг марказий дорихоналари томонидан сотиб олинган, қолган қисми эса илмий-текшириш институтларига юборилган.

1982 йилининг июлида интерфероннинг захираси 70 млрдгача борган бўлиб, ундан фақат 20 млрд ишлатилган. ИИП ва қон қуйиш маркази институти ишлаб чиқаришни тўхтатишга мажбур бўлди, чунки маҳсулот сарфланмай қолди ва уни экспорт қилиш зарурати туғилди. Ойига 2 млрд лейкоцитар интерферон ишлатилади. Бироқ соғлиқни сақлаш вазирлигининг 1982 йил июл ойидаги қарори препарат ишлаб чиқаришни тўхтатиш вақтинчалик эканлиги аниқланди.

Ген муҳандислигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

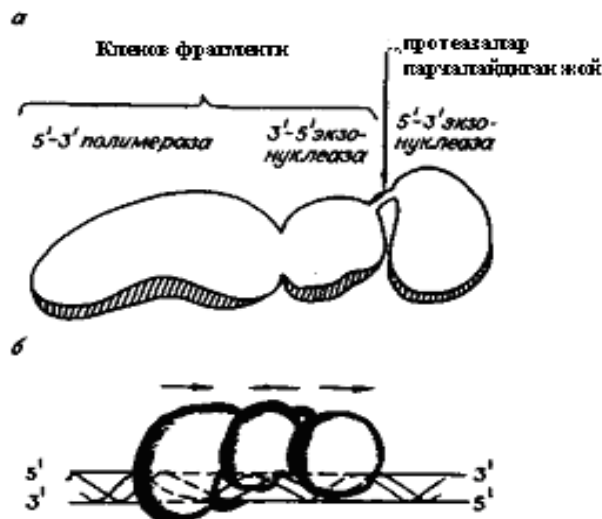
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

Рестриктазалар (рестрикцияловчи эндонуклеазалар) – ДНК молекуласида маълум бир нуклеотидлар кетма-кетлиги (рестрикция сайтлари)ни таниб уларга «хужум қилувчи» ферментлардир.

Рестрикция ва модификация системалари бактерияларда кенг тарқалган: улар резидент ДНКни бегона нуклеотидларни киришидан ҳимоя қилади. 1968 йили Мезельсон ва Юанлар метилланмаган ДНКни парчаловчи рестриктазани ажратиб олишган. 1970 йили эса Смит ва Вилькоккс Ҳаемотропилус инфлуэнзае дан ДНКнинг аниқ бир кетма-кетлигини парчаловчи биринчи рестриктаза (Ҳинд III)ни ажратиб олишган. Турли бактериялар шизининг ДНКсини турлича белгилаганлиги сабабли, рестриктазалар ҳам турли кетма-кетликларни таниши керак. Шундан бери, рестрикциянинг 150 та сайтини танийдиган рестрикциялар ажратиб олинган.

Бактерияларнинг барча рестрикция эндонуклеазалари ўзига хос, қисқа ДНК кетма-кетлигини танийди ва улар билан боғланади. Бу жараёнда ДНК молекуласи таниш сайтида кесилади. Бактерия штамми рестрикция фаоллигига эга бўлиши бирга ДНКни метиллаш хусусиятга эга.

Рестриктазаларни 3 синфга бўлиш мумкин: 1, 2 ва 3.



16-расм

Барча рестриктазалар ДНКнинг қўш спиралида қатъий бир кетма-кетликни танийди, лекин 1-синф рестриктазалари ДНК молекуласининг ихтиёрий нуқтасини кесади, 2- ва 3-синф рестриктазалари эса таниш сайтининг ичидаги қатъий бир нуқталарни парчалайди.

1 ва 3 типдаги ферментлар мураккаб субъбирликдаги тузилишга эга бўлиб, 2 типдаги, яъни метилловчи ва АТФга боғлиқ эндонуклеазали фаолликка эгадир.

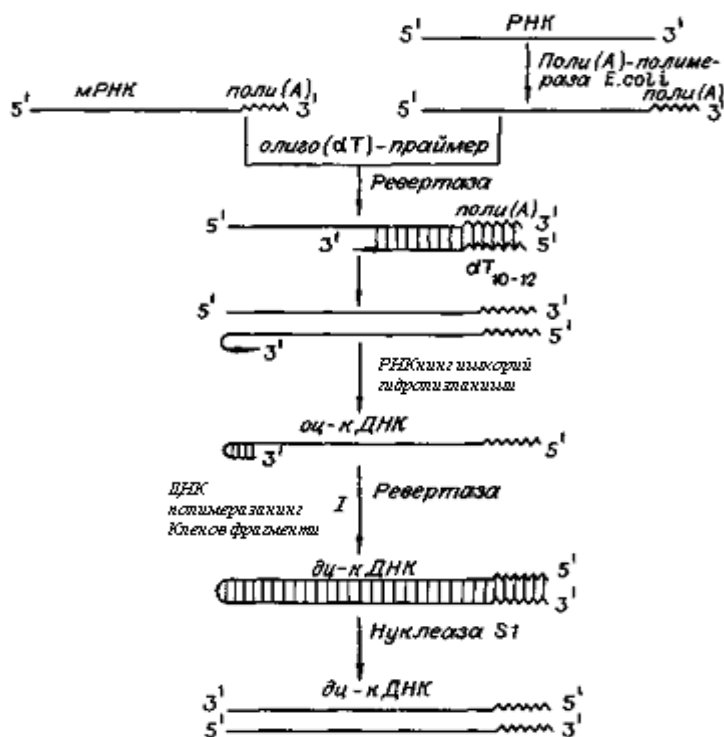
2-синф ферментлари 2 та алоҳида оксиллардан: рестрикцияловчи эндонуклеаза ва модификацияловчи метилазалардан ташкил топган. Шунинг учун ген инженериясида асосан 2- синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

Ҳозирга келиб 500 дан ортиқ 2- синф рестриктазалари ажратиб олинган. Шунга қарамай турли микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар ичида ДНКни муайян бир кетма-кетлигини танийдиган ферментлар учрайди. Бундай жуфтликлар ёки гуруҳлар **изошизомералар** деб аталади. Агар ферментлар ДНКни муайян бир кетма-кетлигини таниса ва ДНК муайян бир нуқтада кесадиган бўлса ҳақиқий изошизомералар, ҳамда ДНКнинг битта сайтини таниб, лекин ўша сайтнинг турли нуқталарини кесадиган бўлса, сохта изошизомералар дейилади.

Қайтар транскриптаза м-РНКни ДНКнинг комплементар занжирига транскрипциялаш учун ишлатилади. Геноми бир занжирли РНК молекулаларидан иборат бўлган ретровируслар ўрганилганда ретровирус ички хужайравий ривожланиши жараёнида хужайра хўжайин хромосомасига 2 занжирли ДНК кўринишида ўз геномининг интеграция босқичини босиб ўтиши аниқланган. 1964 йили Темин РНК-матрицада комплементар ДНКни синтезловчи фермент борлигини аниқлаган. Ушбу РНКга боғлиқ **ДНК-полимераза** қайтар транскриптаза ёки ревертаза деб номланган.

Қайтар транскриптаза реакциясини РНК фаолликка эга бўлган кучли ингибиторлардан фойдаланган ҳолда махсус шароитларда олиб борилади. Бунда РНК молекулаларининг тўлиқ ҳажмли ДНК-нусхалари олинади. Праймер сифатида поли (А)-тутовчи мРНК нинг қайтар транскрипциясида олиго (дТ), 3'-поли (А) учига эга бўлмаган РНК молекулалари учун эса кимёвий синтезланган олигонуклеотидлар ишлатилади. мРНКда ДНКнинг комплементар занжири синтезлангандан ва РНК бузилгандан кейин ДНКнинг 2 занжири синтезланади.

Матрица сифатида кДНКнинг биринчи занжири бўлиши мумкин. Бу реакция ревертаза сингари Э.Солнинг ДНК-полимеразаси ёрдамида катализланиши мумкин. Синтез тугагандан сўнг кДНКнинг 1- ва 2-занжирлари шпилька тугуни билан ковалент боғланган ҳолда қолади. Бу тугун эндонуклеаза С1 билан парчаланади. Ҳосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида кўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.



17-расм

РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси.

Лигазалар. 1961 йили Мезельсон ва Вейгл фаг л мисолида рекомбинациянинг моҳияти ДНК молекулаларининг кесилиши ва кейинчалик бирлашишидан иборатлигини кўрсатганлар. Бу ДНК фрагментларини тикилишида қатнашадиган ферментларни топишга сабаб бўлган. 1967 йили бундай фермент топилган ва улар ДНК-лигазалар деб номланган. Бу фермент нуклеин кислотанинг 2 занжирли молекуласидаги фосфодиэфир боғни катализлайди. Бошқача айтганда, ДНК-лигазалар ёнма-ён жойлашган нуклеотидларни қанд қолдиқлари аро боғ ҳосил қилиб бирлаштиради. ДНК-лигазалар ДНК репарацияси жараёнларида, репликацияда жуда керакдир.

ДНК-лигазалар кофакторга бўлган зарурияти ва таъсир қилиш хусусиятига қараб 2 типга ажратилади. *Э.коли* нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид, Т4- фагининг лигазаси эса Mg^{2+} иштирокида АТФ ни ишлатади.

Ген муҳандислиги ферментлари

Ген муҳандислигида қўлланиладиган қарийб барча ферментлар бактериялар хужайрасидан ажратиб олинади ва прокариот ҳамда еукариотлар хужайрасидаги ДНК лар устида “қирқиш” ёки “тикиш” каби ишлар бажарилади.

Рекомбинант ДНК конструкциясини яратишда қўлланиладиган ферментлар бир неча гуруҳга ажратилади:

- ДНК ни фрагментларга бўлувчи ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК ни она ДНК дан (ДНК – полимеразалар) ёки РНК дан (Тескари транскриптазалар, ревертазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бириктирувчи (лигазалар) ферментлар;
- ДНК фрагменти охирларини ўзгартирувчи ферментлар.

Рестриктазалар (рестриксион эндонуклеазалар) – ёрдамида ДНК молекуласи фрагментларга ажратилади. Бу ферментлар юқори спексифигликка эга бўлиб, ДНК молекуласидаги азотли асослар изчиллигини (**рестриксион сайтлар**) таниб кесади. Ген муҳандислигида рестриктазаларни донор ДНК дан керакли участкаларни қирқиб олишда ишлатилади.

Рестриктазалар асосан бактериялардан лекин, айримлари ачитки ва бир хужайрали сувўтлардан ҳам ажратиб олинади. Рестриктазаларнинг номенклатураси 1973 йилда С.Симит ва Д.Натанслар томонидан таклиф етилган.

Э.Столи нинг алоҳида штамми ДНК си бошқа штамми хужайраси (масалан, В штамми ДНКси С штамми хужайраси) га киритилганда, одатда, генетик фаоллик кўрсата олмайди, чунки у махсус ферментлар-рестриктазалар билан тезда бўлакларга бўлиб юборилади. Бу ҳодиса 1953-йилда аниқланган еди. Ҳозирги кунда турли хил микроорганизмлардан мингдан ортиқ ҳар хил рестриктазалар ажратиб олинган бўлиб, ген муҳандислигида 200 дан ортиқ тури кенг қўлланилмоқда. Шундай қилиб, бир турдаги рестриктаза таъсирида битта ва айнан ўша ДНК кетма-кетлиги ҳар доим ҳам бир хилдаги фрагментлар йиғиндисини ҳосил қилади. Рестриктазала номланишида фермент ажратиб олинган бактерия турининг латинча номини бош ҳарфлари ва қўшимча белгиларидан фойдаланилади. Чунки бир турдаги бактериялардан бир неча хил рестриктазалар ажратиб олиш мумкин. Масалан, *Эсчеричиа Столи-ЭцoPII*, *ЭцoPB*, *Ҳаеmоpхилус инфлуензае -Ҳинф II*, *Стрептомйцес албус - Сал II*, *Тхермус акуатицус - Тақ II*.

Рестриктаза ферментларининг табиий функцияси бактерияни ёд ДНК молекуласидан ҳимоя қилиш (авалам бор хужайра ичига кириб унда трансформация чакирувчи бактериофаг ДНК сидан) ҳисобланади. Улар фаг ДНК сини бўлакларга ажратиб уни кўпайишини чегараб туради. Бактериянинг

шахсий ДНК си ДНК – метилаза ферменти билан метилланган (модификацияланган) бўлганлигидан рестриктазалар унга таъсир етмайди.

Рестриктазалар ДНК нуклеотидларини таниб қирқишига кўра тўмтоқ (симметрик) ва ёпишқоқ (носимметрик) учлар ҳосил қиладиган турларга бўлинади. Тўмтоқ учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар бактерияларга нисбатан ёд ДНК ларга (патоген бактериофаглар ДНК сидан ҳимояланишда) нисбатан таъсир еца, ёпишқоқ уч ҳосил қилувчилар бир турдаги бактерияларда ўзаро алмашилиб (плазмидлар ва кўчиб юрувчи генетик элементлар) юрувчи ДНК га таъсир этади. Ёпишқоқ учлар ҳосил қилиб қирқувчи рестриктазалар ҳам ўз навбатида ёпишқоқ учлардаги нуклеотидлар сонига кўра (тўрттадан саккизтагача нуклеотидлар орасидан) бир биридан фарқланади. Уларнинг ичида тўртта нуклеотидлар орасидан кесубчи рестриктазалар ген муҳандислигида енг кўп қўлланилади. Ҳозирги кунда 150 дан кўпроқ рестриксион сайтларни таниб кесувчи 2000 дан ортиқ рестриктаза ферментлари ажратиб олинган.

ДНК – полимераза ва тескари транскриптазалар. ДНК – полимеразалар ДНК ни она ДНК дан синтезловчи ферментлар бўлиб, биринчи мартаба Э.цолли ҳужайрасидан 1958 йилда А.Корнберг ва унинг ҳамкасблари томонидан ДНК – полимераза И ажратиб олинган. Бу фермент малекуляр оғирлиги 110 мингга тенг битта полипептид занжиндан тузилган, у полимеризацияланиш реакцияларини катализлайди. Ген муҳандислигида кенг қўлланиладиган ферментлардан бири Эцолли нинг Т4 фагидан ажратиб олинган ДНК полимеразаси И ҳисобланади. ДНК полимераза И комплементар нуклеотидларни бириктириш йўли билан ДНК занжирини 5' -3' йўналишида узайтириш хусусиятига ега. ДНК полимеразанинг бу хусусияти ген муҳандислигида иккинчи комплементар занжирни ҳосил қилишда қўлланилади (бир занжирли матрица —ДНК сига қўшилганда праймер иштирокида икки ҳисса ортиши кузатилади). Бу хусусият ДНК-библиотекаларини тузишда, ДНК занжиридаги «бўшлиқ» ларни тўлдиришда ва ДНК полимеразанинг экзонуклеаза фаоллигидан ДНК бўлагига радиоактив нишон киритишда қўлланилади. Табиий ҳолдаги ДНК – полимеразалар ДНК репарациясида (ДНК нинг шикастланган қисмларини қайта тиклаш) ҳам муҳим рол ўйнайди. Бундан ташқари махсус термостабил ДНК полимеразалар Ттх ва Тақ - полимеразалар иссиқ сув чиқадиган булоқлар (гейзерлар) да яшовчи бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, *полимераза занжир реакцияси (ПЗР)* усули ёрдамида ДНКнинг исталган бўлаги устида кўплаб ишларни амалга ошириш имконини берди. ПЗР усули асосида Тақ - полимераза ётади, у ген муҳандислигининг ески усуллариини нафақат соддалаштириш, балки алоҳида генларни ва яхлит геномни ҳам молекулар нишонлашни амалга оширишга шароит яратади.

РНК га боғлиқ ДНК – полимеразалар яъни **ревертазалар** бу комплементар ДНК занжирини мРНК дан синтезловчи ферментлар бўлиб, биринчи марта 1970 йилда Г.Темин ва С.Мизуталар томонидан ўсма вирусларидан ажратиб олишган. Ревертаза ёрдамида синтезланган кўш

занжирли *комплиментар ДНК* (кДНК) молекуласини векторларга киритиб гибрид ДНК лар шаклида кўпайтириш йўли билан кейинги тадқиқотларда фойдаланиш мумкин. *кДНК* генларининг тузилишини ўрганиш бу генларнинг геномдаги тўлиқ нусхаларини аниқлаш имконини беради.

Лигазалар – ДНК фрагментларининг 3' ва 5' охирларини фосфодиэфир боғлари ҳосилқилиб тикувчи ферментлар ҳисобланади. Бу жараён *лигирлаш* деб аталади. Ген муҳандислигида кўпинча лигирлаш учун Т4 фагининг ДНК-лигазасидан фойдаланилади. Т4 лигаза ёрдамида ДНК нинг ҳар қандай бўлагини «ёпишқоқ учли» ёки «тўмтоқ учли» қисмлари бириктирилади. Бу энг кўп қўлланиладиган ферментлардан биридир.

Нуклеазалар-нуклеин кислоталар молекулалари гидролизи реакцияларини катализловчи ферментларнинг йирик гуруҳи ДНК ёки РНК молекулалари нуклеазалар таъсирида бўлакларга ёки алоҳида нуклеотидларга парчаланиб кетади. Нуклеазаларнинг ҳужайрадаги дастлабки вазифаси ҳаётий жараённинг айна вақти учун кераксиз бўлган молекулалари (масалан, *мРНК* трансляциядан сўнг) деградациясини ва нуклеин кислоталарни бегона молекулалардан ҳимоя қилиш (бактерияфаг билан зарарланганда фаг ДНК сини бактерия нуклеазалари томонидан парчалаб юборилиши) дан иборат.

Нуклеазаларни уларнинг таъсирига кўра, гуруҳларга ажратиш мумкин. Нуклеазалар нафақат ДНК молекулалари (ДНКазалар) ёки РНК (РНКазалар) молекулаларига, шунингдек, ДНК ва РНК га бир вақтнинг ўзида (*олтин ранг ловия нуклеазаси*) бир хилда таъсир етиши мумкин. Нуклеазалар бир занжирли (С1 нуклеазаси) ёки қўш занжирли (экзонуклеаза ИИИ) ДНК молекулалари, ёки гибрид ДНК-РНК молекулари (рибонуклеаза Х) га таъсир етиши мумкин.

Бундан ташқари, нуклеазаларни икки типга: экзонуклеазалар ва эндонуклеазаларга бўлиш мумкин. Экзонуклеазалар, одатда, молекулаларни 5' ёки 3' еркин учларидан бошлаб гидролизласа, эндонуклеазалар ДНК молекуласи бўлаги ёки ҳалқасимон ДНК молекуласининг ички кетма – кетликларидан бошлаб парчалайди. Нуклеаза *Бал 31* – бу фермент ДНК даги нуклеотидлар изчиллигини носпексифик парчалаш хусусиятига ега. У носимметрик (ёпишқоқ учли) ДНК фрагментларида “тўмтоқ” учлар ҳосил қилишда ёки ДНК фрагментларини қисқартириб функционал аҳамиятли қисмларни бир – бирига яқинлаштиришда иштирок этади.

Нуклеотидлар кетма – катлигини аниқлаш (секвенирлаш)

Нуклеотидлар кетма – катлигини аниқлаш ДНК нинг генетик муҳим қисимларини белгилашда муҳим аҳамият касб этади. Секвенирлаш усули 100 – 150 нуклеотидлар жуфтига ега ДНК фрагментининг нуклеотидлар изчиллигини анча тез аниқлаш имконини беради. Бу еса рекомбинацияларнинг структураси, функцияси ҳамда имкониятларини ва молекулалар ампликациясини ёки нуклеин кислота молекулаларининг фрагментларини ўрганишда муҳим аҳамиҳатга ега. Секвенирлашининг иккита асосий, кимёвий ва ферментатив секвенс усуллари мавжуд.

Кимёвий усул – 1976 йилда А.М. Максам ва В. Гилберт томонидан таклиф етилган ва уларнинг номи билан аталади. ДНК ни бу усулда секвенирлашда ДНК молекуласини битта занжири олиниб, унинг бир учини ^{32}P изотопи билан нишонланади, нишонланган бир занжирли ДНК препарати тўрт бўлакка бўлинади ва ҳар бирига тўрт асосни бир ёки иккига бўлувчи махсус реагент билан ишлов берилади. Масалан, пурин асослари (А+Г) ни 60%-ли чумоли кислотаси, гуанин асосларини диметилсулфат, тоза гидразин еса пиримидин асослари (Т+С) ни парчалайди, 1,5 Н На Cl еритмасида еса фақат ситозин асослари парчаланаяди. ДНК бўлакларини бир неча жойидан шикастлантириш учун реакцияни амалга ошириш шароитини танлаб олиш муҳимдир. Шикастланган молекулаларга пиперидин билан ишлов берилганда ДНК нинг узилиши айнан азотли асос шикастланган жойда ҳосил бўлади.

Натижада нишонланган бўлаklar тўплами олиниб, уларнинг узунлиги шикастланган асосдан то молекуланинг охиригача бўлган масофада аниқланади. Тўрттала реакция натижасида ҳосил бўлган бўлаklarни денатурацияловчи шароитда акриламид гелида тўртта қўшни йўлакчаларга қуйиб чиқилади. Шундан сўнг радиоавтография амалга оширилади, натижада радиоактив нишонга ега бўлаklar рентген плёнкасида из қолдиради. Уларнинг жойлашувига кўра, нишонланган қисмдан шикастланган асос қандай масофада жойлашганини, буни ўрганиш орқали уларнинг ҳолатини аниқлаш мумкин бўлади. Рентген плёнкасидаги чизиқлар йиғиндисини таҳлилига кўра, ДНК бўлагининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланади.

Ушбу усул ёрдамида қисқа муддат ичида *SV40* вируси, *nBR322* плазмидаси ва бошқа кўплаб организмлар ДНК си нуклеотидлари кетма-кетлигини тўлиқ аниқлашга муваффақ бўлинган. Бироқ Максам-Гилберт усули муолажаларининг сезиларли даражада қийинлиги ва узок давом етиши билан боғлиқ бир қатор камчиликларга ега. Ҳозирги вақтда кимёвий деградация ёрдамида секвенирлаш асосида нуклеотид кетма-кетликларни тез ва мукамал аниқлаш усуллари ишлаб чиқилган бўлиб, қаттиқ фазали секвенирлаш ва айланма фазали хромотографиядан фойдаланиш орқали секвенирлаш шулар жумласидандир.

Ферментатив усул - бу усул ДНК репликациясида иштирок етувчи ферментлар билан ишлашга асосланган бўлиб, 1977 йилда Сенгер томонидан ишлаб чиқилган. Сенгер таклиф етилган усулга кўра нуклеотиди занжирни терминацияси (синтезни тўхтатиб қўйиш) йўли билан ДНК занжири секвенирланади. Бунда олим ДНК нинг якка занжиридан матрикс сифатида фойдаланиб комплиментар иккинчи занжирни синтезловчи ДНК – полимераза II дан фойдаланган.

Репликацияни тўхтатишга сабаб бўладиган терминация агентлари дидезокситрифосфатлар (дд АТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддСТФ) ҳисобланади. Мазкур модификация қилинган азотли асослар кейинги дезоксирибонуклеотид билан фосфодиэфир боғлами ҳосил қилолмайди.

Пробиркаларга тўртта бир. хил таркиб: нуклеотид кетма-кетлиги олдиндан аниқлаб олинган ДНК матрицанинг денатурланган бўлаги, тўртта

дезок-синуклеотид, ДНК-матрицага комплементар бўлган ва ундан ДНК полимераза II синтезини давом еттирадиган ҳамда ДНК полимераза II ферментининг ўзи, радиоактив нишонланган қисқа праймер (16-24 н.ж) дан иборат реакцион аралашма солинади. Шундан сўнг ҳар бир пробиркага дидезоксинуклеотидлардан бири қўшилади. Ҳар бир пробиркада синтезлаҳадиган занжир ДНК полимераза II дидезоксинуклеотидни бириктириб оладиган жойда терминацияланади. Дидезоксинуклеотид реакция аралашмасига қўшилган бўлиб, битта пробиркадаги синтез комплементар занжирнинг ддАТФ билан боғланиши ҳисобига, иккинчисига ддГТФ ҳисобига узилади ва ҳ.к. Занжир узилиши тасодифий нуқталарда амалга ошиши ҳисобга олинadиган бўлса, праймердан бошлаб секвенирланадиган бўлак охирига қадар узунликдаги фрагментлар йиғиндиси ҳосил бўлади.

Олинган ДНК фрагментлари полиакриламидли гелда (битта нуклеотидга қадар аниқликда) ажратилади, радиоавтография қилинади ва тўртта пробиркадаги бўлакларнинг ажралишининг кўринишига асосан ДНКнинг нуклеотид изчиллиги аниқланади.

Ҳозирги вақтда исталган ДНК бўлагининг нуклеотид кетма-кетлигини тўлиқ аниқлаш ечими топилган. Бугунги кунда про- ва еукариотларнинг бир неча минглаб генлари нуклеотид кетма-кетлиги ўрганилган. Кўплаб прокариот организмлар геномининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланган. Эукариотлардан ачитқилар (*Сачаромйцес церевисиае*), нематодалар (*С.елеганс*), арабидопсис, дрозифилла пашшаси ва одам геномини тўлиқ секвенирлашга муваффақ бўлинган.

Геннинг нуклеотид кетма-кетлиги ва генетик кодини билган ҳолда, у кодирлайдиган оқсил аминокислоталари кетма-кетлигини аниқлаш мумкин. Илгари оқсил таркибини аниқлаш учун ажратиб олинган ва тозаланган оқсилнинг ўта мураккаб ва кўп меҳнат сарфланадиган таҳлилини ўтказиш талаб этилар еди. Кўпинча нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш орқали оқсилнинг структурасини аниқлаш, оқсилнинг ўзини тўғридан-тўғри сқквенирлашга нисбатан осон кечади.

Ҳозирги кунда секвенирлаш йўли билан олинган нуклеотид кетма-кетликларнинг компютер талилилини амалга ошириш илгари аниқланган нуклеотид кетма-кетликлар билан таққослаш, гомология (ўхшашлик) даражасини аниқлаш, махсус (масалан, регулятор-бошқарувчи) изчилликларни ажратиб кўрсатиш, РНКнинг иккиламчи тузилмасини моделлаштириш имконини берадиган компютер дастурларининг кўплаб турлари мавжуд.

Секвенирлашнинг тезкор усуллари ишлаб чиқилгач, олдиндан белгиланган муайян кетма-кетликларга ега, нисбатан узун олигонуклеотидларни синтез қилишнинг оддий, тезкор усуллари йўлга қўйилди. Ҳозирда 100 нуклеотидга қадар кетма-кетликларни осон синтез қилиш мумкин. Бу жараёни автоматлаштириш еса синтезни янада тезлаштиради.

Генни ажратиш ва текшириш усуллари

Генларни ажратиб олишнинг иккита асосий усуллари мавжуд: генларни сунъий (кимёвий – ферментатив ва ферментатив) синтезлаш ёки ДНК дан ажратиб олиш мумкин.

ДНК таркибидан ажратиб олиш- тозалаб олинган ДНК ни рестриктаза ферментлари билан ишлов бериб такибидаги генларни ажратиб олиш мумкин. Бу жараёнда ДНК нинг тақдири рестриктазалар табиати билан боғлиқ бўлиб, улар ДНК ни шартта иккига ажратиб бўлакларга бўлиб юбориши ёки 4-7 та нуклеотидлар орасидан таниб ёпишқоқ учлар ҳосил қилиб кесади.

Бактерияларнинг трансформацияси

Трансформация – маълум шароитда бир организм ирсий молекуласи ҳар қандай бўлагининг иккинчи организм ирсий молекуласи таркибига бирикиш ҳодисасидир. Бу йўл билан организм ирсийлантирилади.

ДНК нинг генетик роли биринчи маротаба зотилжам касаллигини қўзғатувчи юмалоқ шаклдаги бактериялар-пневмококларда исботланган. Пневмококлардаги трансформация ҳодисаси 1928 йили инглиз бактериологи Ф.Гриффиц томонидан ихтиро қилинган. Унинг тажрибаси пневмококларнинг икки С ва Р формалари устида ўтказилган. Бактерияларнинг С штамми агардан тайёрланган қуюқ озуқа муҳитида текис, ёрқин колония ҳосил қилади. У полисахарид капсулага ега бўлиб сичқонларга юктирилгач улар ўлимига сабабчи бўлади. Бактерияларнинг Р штамми капсуласиз бўлиб, қуюқ озуқа муҳитида ғадир-будур колония ҳосил этади ва штамм сичқонларга юктирилганда, улар омон қоладилар. Тажрибада С штаммли бактериялар 65-70° С иссиқлик таъсирида ўлдирилгач, уларнинг патогенлик хусусияти йўқолади. Ф.Гриффиц тажрибаларининг бирида ўлган С штамм қолдиғи билан тирик Р штамм бактериялар аралашган ҳолда сичқонлар танасига юктирилганда, баъзи бир сичқонларнинг ўлганлиги кузатилган. Ўлган сичқонлар танаси текширилганда уларда тирик С бактериялар борлиги аниқланган. Бошқа сичқонларга иссиқлик таъсирида ўлган С штаммли бактериялар ёки тирик Р бактериялар алоҳида-алоҳида юборилганда сичқонлар ўлмай, тирик қолган (60-расм). Ўтказилган тажриба асосида агар ўлган С бактерия ва тирик Р штамм бирга бўлса, у ҳолда Р штамм ўлган С штамм хоссасига ега бўлиши мумкин деган хулосага келинди. Лекин олим бактериялар қандай моддаси ирсий хоссани ташиб юришини била олмади.

1944 йилга келиб О.Эвери, К.Мак Леод ва М.Мак Карти Гриффиц тажрибасини қайтадан такрорладилар ва С штаммида унинг патогенлик хусусиятини ташиб юрувчи ДНК эканлигини маълум қилдилар. Шундай қилиб дастлаб бактерияларда ДНКнинг ирсиятга алоқадорлиги исботлаб берилди.

Трансдуксия

Трансдуксия – маълум шароитда махсус тузилишга ега бўлган бактериофаг ДНК бўлагининг бактерия хромосомасига бирикиши ва ундан

ажралиб чиқиш жараёнида бактерия хромосомасининг бир бўлагини ўзига бириктириб олиб чиқиш жараёни.

ДНК ирсиятнинг моддий асоси еканлиги иккинчи маротаба 1952 йили А.Херши ва М.Чейз бактериофаглар устида ўтказган тажрибасида исботланди. Улар Н.Зиндер, Дж.Ледерблар билан бир вақтда трансдукция ҳодисасини кашф этдилар. Трансдукция атамаси остида ДНК молекуласини бир бактериядан иккинчи бактерияга бактериофаглар ёрдамида ўтказилиши тушунилади.

Мазкур тажрибага қадар бактериофаглар бактерия танасига кирганда уларнинг ҳужайрасида кўпайиб бактериялар ёрилиб ўлиши ва натижада бактериофагалар билан зарарланган бактерия колонияси лизис бўлиши маълум эди. Бу жараён фагларнинг литик реакцияси деб аталади. Айрим ҳолларда фаг билан зарарланган бактерия ҳужайраларининг баъзилари офатдан қутилиб қолиши мумкин. Бунинг асл сабаби бактерия танасига тушган фагнинг ирсий молекуласи бактерия хромосомасининг махсус нуклеотидлари изчиллигини кесиб, унга бирикиши ва фаол ҳолатдан кўпая олмайдиган яъни бактерияни лизис қила олмайдиган нофаол - профаг ҳолатга ўтиши бўлган. Офатдан қўтилган бактерия лизоген бактерия, бу жараён еса лизоген реакцияси деб номланади. Айрим ҳолатларда ўз-ўзидан ёки физик-кимёвий омиллар таъсири туфайли бактерия хромосомасидаги фаг ирсий молекуласи ажралиши ва бошқа бактерияларни зарарлантириши, ўлдириши ёки бактерия хромосомаси билан бирикиб профаг ҳолатга ўтиши мумкин. Бинобарин, трансдукция ҳодисаси ҳам организмлар ирсиятини моддий асоси ДНК еканлигидан далолат беради.

Ирсиятнинг моддий асоси ДНК еканлигани исботловчи яна бир мисол бактерияларнинг конъюгациясидир. Бактериялар одатда жинсиз – бўлиниш йўли билан кўпаядилар. Лекин уларда “жинсий” кўпайиш – бактериялар конъюгацияси ҳам содир бўлади.

Конъюгация пайтида бактериялар айрим қисмлари билан яқинлашиб, икки бактерия ядроси орасида ситоплазматик кўприк ҳосил бўлади ва у орқали донор бактерия хромосомасининг айрим бўлаги реципиент бактерия танасига ўтади ва натижада реципиент бактерия фенотипда донор бактерия хоссасини ўзида намоён этади.

Вектор молекулалар. Трансформация. Таркибида кўшимча ирсий ахборотлар тўтувчи рекомбинант ДНК молекулаларини ҳужайраларга киритиш ва унинг барқарорлигини сақлаш ген муҳандислигининг асосий калит операцияси ҳисобланади. Буни амалга ошириш учун вектор молекулалардан фойдаланилади. Агар ДНК шундайлигича ҳужайрага киритилса, бактерия ҳужайраларидаги ферментлар уларни нуклеотидларга парчалаб ташлайди. Баъзи ҳолларда ДНК ҳужайрага кириб ўрнашиши мумкин, лекин ҳужайранинг бўлиниши жараёнида у наслдан-наслга берилмай йўқолиб кетади. Рекомбинант ДНК ҳужайранинг генетик аппаратини ташкил қилувчи қисмига айланиши учун у геномга бирикиши (хромосомага

интеграцияси) ва шунинг ҳисобига репликацияланиши ёки автоном репликацияланиш хусусиятига ега бўлиши керак.

Бегона ДНКнинг репликацияси, экспрессияси ва трансфер-мациясини (бошқа организмга кўчишини) таъминловчи ДНК молекуласи *вектор* деб аталади. Вектор хужайрага кўшимча ирсий ахбо-рот киритилишини амалга оширади. Вектор сифатида плазмидалар, бактериофаглар, мобил элементлар ва ҳайвонларнинг вирусларида фойда-ланиш мумкин. Ҳозирги вақтда жуда кўп векторлар яратилган бўлиб, уларни бир нечта типга бўлиш мумкин:

1, Клонлаш учун векторлар. Бундай векторларга бириктирилган ДНК фрагментларни репликациялаш орқали сони (амплификацияси) ни кўпайтириш учун фойдаланилади. Бундай мақсадлар учун бактерия плазмидалари ва фаглар қўлланилади. Геномнинг катта ўлчамдаги фрагментларини клонлаш учун еса бактерия ва ачитки хромосомалари асосида яратилган (ВАС ва ЙАС) сунъий векторларидан фойдаланилади.

2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-қўтчилигини аниқлаш ва уларнинг оқсил маҳсулотларини таҳлил қилиш, муайян оқсилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Шунингдек, сутемизувчилар, ўсимликлар ва ачитки хужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган. Эукариот организмлар учун кўп лонли экспрессион тизимлар яратилган экспрессион векторлар полиаде-ниллиниш сайти ва мазкур организмда ишлаш қобилиятига ега промотордан иборат экспрессион кассета тутди.

3. Трансформация учун векторлар. Бу векторлардан реципиент гцномига бегона ДНК фрагментларини киритиш учун фойдаланилади.

Бундай векторлар одатда геномга интеграцияланишига ёрдам И берувчи махсус изчилликлар тутди. Замонавий вектор тизимлар полифункционал бўлиб, бир нечта функцияни битта векторга жамлайди. Ҳиринчи табиий векторлар бактериялардан ажратилган бўлиб, кўпчилиги тажриба мақсадидан келиб чиққан ҳолда (экспрессион, клонлаш учун, трансформация учун векторлар) ген муҳандислиги усуллари ёрдамида қайта яратилган.

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген хужайрада вектор иштирок этаётгани ҳақида маълум қилувчи фенотип бериши, яъни вектор селектив ирсий белгига ега бўлиши керак. Кўпинча селектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлилик ленидан фойдаланилади. Бу генларнинг оқсил маҳсулоти-ферментлар антибиотикларни модификациялайди ва уларнинг таъсирини инактивлаштиради (кучсизлантиради). Масалан, нптл гени канамицин антибиотигини инактивлаштирувчи неомицин фосфотрансфераза генини кодирлайди. Ҳактерия хужайраси нптл гени иштирокида канамицинга нисбатан чидамлиик ҳосил қилади ва шу антибиотик озика муҳитларида ўсиб, клон ва луижайралар колониясини ҳосил қилади. Одатда таркибида нптл гени лио^б!магаии хужайралар бундай озика муҳитларида ўса олмайди ва нобуд бўлади. Демак, вектор конструкция таркибида нптл генини тутиши

вектор иштирок этаётган хужайраларни аниқлаш ва уларни танлаб олиш имконини беради.

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

Бактерия ва тубан эукариот организмлар хужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга эга бўлган халқасимон ёки чизиксимон структурага эга бўлган қўшимча хромасомалар мавжуддир бу мини-хромасомалар плазмидлар деб аталади. Плазмид ДНКси кўпи билан 3-10 тагача генларни ўзида сақлайди. Бу генлар, асосан антибиотик ёки заҳарли токсинларни парчаловчи ферментларни синтезига жавобгардир. Шу туфайли плазмидлар бактерия, ачитки ва замбуруғларнинг антибиотик ва заҳарли токсинларга чидамлилигини таъминлайди.

Плазмиднинг антибиотик парчаловчи генлари бир плазмиддан иккинчисига транспозонлар билан бириккан ҳолатда ҳам кўчиб ўта олади. Бу молекуляр жараён касал чакирувчи микробларнинг антибиотикларга чидамлилигини нихоятда оширади. Плазмидалар ўз хусусиятига кўра иккига бўлинади.

Биринчиси транспозон ёки бактериофаг ирсий молекуласи каби хужайра асосий хромосомасининг махсус ДНК изчиллигини кесиб, рекомбинация бўла оладиган плазмидлар.

Бундай рекомбинацияланувчи плазмидлар трансмиссибл, яъни наслдан-наслга ўтувчи плазмидлар деб аталади.

Трансмиссибл плазмид асосий хромосомага бириккандан кейин ўз мустақиллигини йўқотади. Асосий хромосомадан мустақил равишда ўз-ўзини репликация қила олмайди. Айни пайтда бундай плазмидларда жойлашаган генлар асосий хромосомада ўз фаолиятини бажаради. Хужайра бўлинганда рекомбинацияланувчи плазмид генлари асосий хромосома генлари бириккан ҳолда наслдан-наслга берилади. Иккинчи тоифа плазмидлар автоном ҳолда репликацияланувчи плазмидлар деб аталади. Бундай плазмидлар асосий хромосомага бирика олмайди, асосий хромосомалардан мустақил равишда ўз-ўзини репликация йўли билан ўнлаб ва ҳатто юзлаб марта кўпайтира олади. Автоном плазмидлар бактерия ёки замбуруғ бўлинганда киз хужайралар орасида тасодикий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир хужайрадан иккинчисига хужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади.

Табиатда бирор микроорганизм хужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол хужайра нуклеаза ферментлари орқали парчалаб ташланади.

ДНК молекуласини майда бўлақларга бўлувчи ферментлар кесувчи эндонуклеазалар ёки рестриктазалар деб аталади. Ҳар бир рестриктаза тўрт ёки кўпроқ махсус нуклеотид жуфтларни таниб олиб боғланади ва ДНК молекуласини кесади. Айрим рестриктазалар ДНК қўш занжирини қайчи

сингари шартта икки бўлакка бўлади. Бундай рестриктазаларга Алу И, Дра И, Ҳае ИИИ, Ҳпа И, ЭцоР В, Ҳинц ИИ, Пву ИИ, Рса И, Сца И, Сма И ва бошқаларини мисол қилиб келтириш мумкин (5-жадвал).

Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (Аат ИИ, Адц ИИИ, Апа И, Бам ҲИ, ЭцоРИ, Ҳинд ИИИ ва бошқалар). Бу рестриктазалар функцияси жиҳатдан транспозага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқоқ" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлакларини бир - бирига боғлаш осонлашади. Ана шу хусусияти туфайли бу хил рестриктазалар ген муҳандислигида кенг қўлланилади. Ҳозирги кунгача 500 дан ортиқ хилма хил рестриктазалар тоза ҳолда ажратиб олинган ва ўрганилган.

Одатда микроорганизм ирсий моддасининг хромосомаси бир неча миллион нуклеотид жуфтлари изчиллигидан иборат. Ўсимлик ёки ҳайвон геноми бир неча юз миллиондан то 1 миллиардгача нуклеотид жуфтлари изчиллигидан тузилган. Бундай буюк молекулани юқорида қайд қилинган хилма - хил рестрикциион эндонуклеазалардан фойдаланиб кўплаб бўлақларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК бўлаклари электрофорез мосламасида махсус молекуляр "элак" тешикларидан юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлаги махсус бўёқ билан бўяш натижасида ультрабинафша нурлари ёрдамида оддий кўз билан кўрилади.

8-жадвал.

Ген муҳандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	Рестриктаза олинган микроорганизмлар	Рестриктазаларнинг "аниқлайдиган" ва кесадиган охириги учлари
Eco RI	Escherichia coli RI	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-
Hind III	Haemophilus influenzae	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-
Sal I	Streptomyces albus	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-
Bam I	Bacillus amyloliquefaciens	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-
Hpa II	Haemophilus parainfluenzae	-C-C-G-G- -G-G-C-C-
Alu I	Arthrobacter luteus	-A-G-C-T- -T-C-G-T-
Haem III	Haemophilus aegyptius	-G-G-C-C- -C-C-G-G-
Sma	Serratia marcescens SD	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-

ДНК нинг майда бўлаклари электр майдонида гел ғовакларидан йирик бўлақларга нисбатан тез ҳаракат қилгани учун уларнинг стартдан босиб ўтган масофасини ўлчаб ДНК бўлагининг катта-кичиклиги аниқланади. Электрофорез мосламасида бир-биридан фақат бир нуклеотид кам ёки кўплиги билан фарқланувчи ДНК бўлагини ажратиш мумкин. Рестрикцион эндонуклеаза ферментларининг очилиши ва электрофорез мосламасида ДНК бўлақларини ўта аниқлик билан бир-биридан ажратишнинг такомиллашуви гигант ДНК молекуласидан исталган ДНК бўлагини ажратиб олиш имконини беради.

Хулоса қилиб айтганимизда ген муҳандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформация ва трансдукция жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестрикцион эндонуклеаза ферментларини тўла фундаментал асосларини ўрганиш киради. Юқорида қайд қилинган биологик фаол моддалар ген муҳандислиги биотехнологиясининг амалий жараёнларида ўта қимматли омил ҳисобланади.

Рекомбинант ДНК олиш усуллари

Сунъий шароитда рекомбинант ДНК олиш ва генларни клонлаш илк бор 1972 йилда АҚШ олимлари Бойер ва Коэн томонидан амалга оширилган. Бу олимлар Э.цоли бактериясининг хромосома ДНКсига ва шу бактерия плазмидасига алоҳида идишларда ЭцоРИ рестриктаза ферменти билан ишлов берганлар. Плазида таркибида фақат 1 донга ЭцоРИ рестриктаза ферменти таниб кесадиған махсус нуклеотидлар изчиллиги бўлганлиги сабабли фермент плазмиданинг халқасимон ДНК қўш занжирини фақат бир жойдан кесиб, плазмидани «ёпишқоқ» учли очик ҳолатга ўтказди. Хромосома ДНК молекуласида ЭцоРИ рестриктаза ферменти таний оладиган махсус нуклеотидлар изчиллиги қандай бўлса, бу молекула шунча бўлақка бўлинади.

Турли хил ўлчамга эга бўлган ДНК молекуласи электрофорез услуби ёрдамида ажратиб олинади. Ажратиб олинган «ёпишқоқ» учли хромосома ДНКси бўлаги очик ҳолатдаги «ёпишқоқ» учли плазмид ДНКси билан аралаштирилиб лигаза ферменти ёрдамида тикилади. Натижада плазмид таркибига хромосома ДНК бўлаги киритилади.

Шу боисдан рекомбинант ДНК га қуйидагича тариф бериш мумкин: ҳар қандай тирик организм ирсий молекуласининг исталган бўлагини вектор молекулаларига бирикишдан ҳосил бўлган сунъий ДНК рекомбинант ДНК дейилади.

Рекомбинант ДНК олишнинг учта усули мавжуд-коннектор усули, рестриктаза-лигаза ва линкер молекулаларидан фойдаланиш усули. Коннектор усулида рекомбинацияда иштирок этувчи ДНК бўлагининг 3' ўчига дезоксинуклеотидилтрансфераза ферменти ёрдамида малум узунлик даги олиго (дА) - сегменти уланади. Иккинчи ўчига эса олиго (дТ) - сегменти уланади. Бу ДНК бўлаклари аралаштирилганда дА ва дТ сегментларнинг

водород боғлари асосида комплементар бирикиши туфайли халқасимон ДНК структураси ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган ДНК даги бир занжирли бўш жойлар ДНК-полимераза II ферменти ёрдамида тулдирилади.

Рестриктаза-лигаза усули энг содда ва осон рекомбинант ДНК олиш усули ҳисобланади. Бу усулда ДНК молекуласи ва вектор плазмида «ёпишқоқ» учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳолда маълум шароитда реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари ўзаро водород боғлари ёрдамида бирикиб халқасимон структура ҳосил қилади ва ДНК занжирининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади.

Линкер молекулаларидан фойдаланиш усулида ДНК молекуласига ва вектор плазмидага T4 фаг ДНК-лигаза ферменти ёрдамида махсус нуклеотид кетма-кетлигига эга бўлган линкер молекула уланади. Олинган икки турдаги ДНК молекуласи рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилиб аралаштирилган ҳолда реассоциация қилинади. ДНК ва вектор плазмида молекулаларининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Шу йусинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Вектор молекулалар, генлар библиотекасини яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

Рекомбинант ДНК ни автоном репликация бўлиши учун жавоб берадиган ДНК бўлаги вектор молекулалари дейилади. Вектор молекулалар ўз вазифасига кўра икки типга бўлинади. Биринчиси автоном репликация бўлувчи векторлар. Иккинчиси хромосомага интеграция бўлувчи векторлар. Вектор молекулалар ген муҳандислиги биотехнологиясида генларни клонлашда ва трансформация қилишда асосий иш қуроли бўлиб хизмат қилади.

Вектор молекулалари вазифасини фаг ДНК лари, плазмидалар ва ўсимликларни хлоропласт ҳамда митохондриял ДНК лари ўташи мумкин.

Хўжалик аҳамияти қимматли бўлган генларни ажратиш учун ген библиотекаси тузилади. Хромосомал ДНК асосида ген библиотекасини тузиш қуйидагича амалга оширилади:

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва маълум шароитда реассоциация қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия хужайрасига трансформация қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига эътибор бериш керак. Бу кўрсаткич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

$$N_k = \frac{p}{\ln(1-p)} \cdot \ln(1-x/y)$$

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва $0,99$ га тенг бўлса 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

Генларни клонлашда кўпинча кДНК библиотекасини тузиш мақсадга мувофиқдир. Бу ҳолда махсус поли (Й) ва олиго (дТ) колонкалари ёрдамида учларида поли (А) нуклеотидлар кетма-кетлигини сақловчи иРНК тРНК ва пРНК дан ажратиб олинади. Олинган иРНК молекуласи олиго (дТ) нуклеотидлари билан аралаштирилиб реассоциация қилинади. Бунда иРНК молекуласининг поли (А) учида дА-дТ қўш занжирли сегмент ҳосил бўлади. Ушбу икки занжирли сегментнинг олиго (дТ) учи кДНК синтезини амалга оширувчи ревертаза ферменти учун праймер (кДНК синтезининг бошланиш нуктаси) вазифасини ўтайди.

Синтез қилинган кДНК молекуласи қисқа учли икки занжирли структура билан тугалланади. кДНК синтезида матрица вазифасини ўтаган иРНК молекуласи NaOH билан парчаланади натижада қисқа икки занжирли ва тўлиқ иРНК молекуласига комплементар бўлган бир занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Ҳосил бўлган қисқа икки занжирли структура кДНК нинг иккинчи занжирини синтез қилишда праймер вазифасини ўтайди. ДНК-полимераза II ферменти ёрдамида кДНК нинг иккинчи занжири синтез қилинади. Ҳосил бўлган кДНК нинг бир занжирли қисми СИ-нуклеаза ферменти ёрдамида парчаланади ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу йусинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмада денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., $0,2 \text{ N}$ NaOH эритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза фильтрига бириктирилади. Олинган филтр $[\text{Г}^{32}\text{П}]$ АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

Молекуляр гибридизация жараёнида фильтрга бириккан рекомбинант ДНК молекуласига комплементарлик қонуният асосида нишонланган иРНК молекулалари бирикади.

Ҳосил бўлган гибрид ДНК молекуласи денатурация қилиниб нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (элюция ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи хужайрасиз оксил синтез қилиш тизимида текшириб курилади. Ҳосил бўлган оксил молекуласининг идентификация қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

МИКРООРГАНИЗМЛАР ИШТИРОКИДА БИРЛАМЧИ ВА ИККИЛАМЧИ МЕТОБОЛИТЛАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШ

Ҳар бир организмда кўплаб кичик ва катта молекуляр оғирликка эга бўлган оксил моддалари учрайди ва улар ҳаётий жараёни бошқариб туради. Уларнинг орасида гармонлар алоҳида ўрин тутади. Гармонлар узоқ вақтлардан буён тиббиётда даволаш воситасида кенг қўлланиб келинмоқда. Аммо яқин - яқинларгача уларни ҳайвонлар органларидан жуда оз миқдорда эса одамларнинг қон тўқималаридан ажратиб олинадими.

Гармонлар нафақат тиббиётда, балки чорвачиликда ҳам кенг ишлатилади. Табиатда икки хил гармонлар учрайди: оксил - пептид ва стероид табиатли гармонлар. Биринчи гуруҳ гармонлар ҳар хил узунликка эга бўлган пептидлардан ташкил топган бўлса, иккинчи гуруҳ гармонлар - стероидлардан ташкил топгандир.

Биотехнологик усуллардан фойдаланиб – стрептокиноза, урокиноза, аспаргиноза, супероксиддисмутоза ва бошқа ферментлар, ингибиторлардан; В – глюкозидазалар, амилазалар, протеаза ва бошқа, қон факторлари (тўқима плазмигормонлар активатори, ВИИИ фактор, одам қони альбумин зардобини, плодекстранлар), гормонлар (инсулин, проинсулин, Л-, Б-, ва В-интерферонлар, инсон ўсишига гармон, самототропин) ва бошқалар олинадими.

Гормонлар: Гормонлар хусусияти ўзидан унча катта бўлмаган пептид молекулалари ва оксил молекулаларини номоён қилади. Гормонлар молекуласи тузилиши ва ҳажмига (катталигига) боғлиқ ҳолда уч гуруҳга бўлинади:

Биринчи гуруҳ: пептидли гормонлар. Булар бир неча аминокислоталардан иборат, унча катта бўлмаган молекулалардир (бир неча ўнтагача). Бу гуруҳ гипоталамус, гормонлар гипофиз гормонлар, ҳимоя безлари (кальцитанин ва пратагормонлар), овқат ҳазм қилиш жараёни ва ошқозон ости безлари, ноуропептидларга боғлиқ таъсир этувчи факторлардир. Ички секреция гормонлари ҳосил қиладиган без, парчаловчи ферментлар таъсир остида содда тузилганлар молекуласидан ҳосил бўлади.

Иккинчи гуруҳ: пролактинлар ва ўстириш гормонлари. Бу гормонлар 170–195 аминокислоталардан иборат бўлади, бу гормонлар прегормон сигнал пептидида узунлиги 25 аминокислота ҳолда парчаланайди. Ген муҳандислиги тажрибаларида бу гормонлар ҳам узун молекула ҳолида синтез қилиб олинадими ва кейин маълум участкасидан кесилади. Ҳужайранинг мРНК сида синтезланувчи ўсиш гормонлари генлари ҳам сунъий ҳолда олинадими.

Амалиётда–191 аминокислотадан ташкил топган гипофизгормони – самототропин олинган ва қўлланмоқда. У специфик турга эга бўлади ва шунинг учун медицинада ҳайвон самототропини қўлланилади.

Учинчи гуруҳ: гликозилланган гормонлардан ташкил топган бўлиб, иккита субъединицадан иборат. Бу гуруҳ: фолликуляр стимулятор, лютеонизирловчи ва тиреотропинли гормонлар киради.

Булар ҳаммаси гликозилланган бўлгани ҳолда бактерия хужайрасида тўлиқ ҳолда синтезланмайди. Тўлиқ синтезланса гормонлар олиш учун уларнинг генлари ачитқиларга (ачитқи ҳосил қилган гликозилланган гормонлар одамга гормонларига мос келади) ёки тўқима хужайраларига ўтказилади. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида аурикулин гармонни ишлаб чиқиладиган рекомбинант микроорганизмлар яратилган. У организмда қон айланиши босими, организмдан туз ва сувлар ажралиш регуляцияси, юрак тўқималари синтезида асосий рол ўйнайди.

Ренин ҳосил қилувчи ген марказий звено бўлиб, ренин– ангиотензин– альдостерол ва қон босимининг ошишини таъминлайди.

Гармонлар махсус хужайраларда ишлаб чиқарилиб қон орқали бутун организмга тарқатилади ва хилма хил хужайра - нишонларга таъсир этиб уларда ўтадиган маълум ҳаётий зарур жараёнларни бошқаришда фаол иштирок этадилар.

Кўпинча қандай шароитда гармонлардан фойдаланилади?:

1. Авлоддан-авлодга ўтадиган баъзи-бир нуқсонларни (қанд касаллиги, паст бўйлик, жинсий сустрлик ва х.к.) тўлдириш учун ёки ҳаёт давомида келиб чиқадиган касалликларни даволаш учун.
2. Гармонлар томонидан бошқарилиб туриладиган жараёнларни янада жадаллаштириш учун (кўп наслиликни жадаллаштириш ва х.к.).

Гармонлардан тиббиётда янада кенгроқ фойдаланишга энг аввало уларнинг камлиги тўғон бўлиб турибди. Ўтган асрнинг 80-йилларигача гармонлар манбаи бўлиб, инсон ва ҳайвон тўқималари ва органлари ҳамда донорларнинг қонлари хизмат қилган.

Аммо, кейинги йилларда биопрепаратлар манбаи сифатида инсон органларидан ёки қонидан фойдаланиш чеклаб қўйилди. Бунга асосий сабаб инсонлар орасида кенг тарқалиб кетадиган хилма-хил вирус касалликларини, айниқса ОИТС (СПИД) ни тарқалишидан ҳадиксирашдир.

Ҳайвонлардан олинадиган оқсил табиатли гармонлар инсон оқсилларидан иммунологик фарқ қилади ва шу сабабли инсонларда ҳар хил аллергия реакциялар чиқишига сабаб бўлади. Бундай реакцияларнинг кучи гармон табиатига ҳамда уни қабул қилувчи касалларни табиати билан узвий боғлиқдир.

Шунга қарамасдан ҳозирги вақтгача ҳам кўпчилик касалликларни олдини олиш ёки даволаш учун ҳайвон гармонларидан фойдаланиб келинмоқда.

Ген муҳандислиги даврига келган биотехнология фани инсон ва ҳайвонлардан анънавий усулда олиниб келинадиган гармонлар ва бошқа препаратларни саноат миқёсида ишлаб чиқариш мумкинлигини бутун дунёга намоиш қилди. Шу туфайли ҳам, ҳозирги вақтда кўплаб ҳаётий зарур биопрепаратлар ген муҳандислиги усулларида фойдаланиб яратилган микроорганизмлар ёрдамида ишлаб чиқарилмоқда. Мана шундай препаратлардан энг муҳимларини кўриб чиқамиз.

Инсулин - ошқозон ости безининг Лангерганс оролининг бета-хужайрасида синтез бўлиб, қондаги шакар миқдорининг 1% атрофида сақлаб туришга хизмат қилади. Шакар миқдорини бундай ошиб ёки камайиб кетиши жуда оғир хасталикларни келиб чиқишига олиб келади. Жумладан қондаги шакар миқдорининг ошиб кетиши, қандли диабет касалигини келтириб чиқаради. Оқсил мухандислиги усулларида фойдаланиб, инсулинни синтез қилувчи ачитки замбурғининг штаммлари яратилган. Шу йўл билан дунёнинг бирқанча мамлакатларининг ҳар хил фирмаларида ген - мухандислик инсулини тайёрлаш йўлга қўйилган. Бу янги биотехнологияни яратилиши дунё бозорида инсулинни нархининг пасайиб кетишига олиб келди ва яқин келажакда бу препаратга бўлган муҳтожлик бутунлай тугатилади.

Ўстириш гормони. Бу гормон организмда гипофиз безининг олди қисми хужайраларида синтез бўлади. Ўтибор қилинг, гипофиз безининг бу қисмининг оғирлиги 0,1 граммдан камроқ бўлиб, унинг ҳам бир қисмигина шу гормонни ишлаб чиқаришга хизмат қилади. Организмда бу гормонни етмаслиги ўсиш тезлигини пасайтиради, масалан ўсиши секинлашган сичқоннинг оғирлиги, оддий сичқон оғирлигидан 2 маротаба кам бўлади. Шу гормонни ўз вақтида, керакли миқдорда организмга киритилиши ўсишни мўтадил қилади. Тиббиётда битта касални даволаш учун ҳафтасига 7 мг тозаланган гормон ишлатилса кифоя. Бу гормонни илгарилари одамларни (ўлик одамларни) гипофизидан ажратиб олишган. Ҳозирги пайтда бу гормонни ишлаб - чиқаришни микробиологик, тўғрироғи ген - мухандислик усули яратилган бўлиб, 1 л культурал суяқликдан 100 миллиграммгача тоза ҳолдаги гормонни ажратиб олиш мумкин. Умуман олганда ген мухандислиги усулларида фойдаланиб, яратилган трансген микроб штаммлари ёрдамида, нафақат гормонлар балки, барча керакли биологик моддалар ишлаб чиқариш мумкинлиги микробиологик усулни рентабел соҳага айлантирди. Бунинг устига бу соҳа об-ҳаво, иссиқ-совуқ, фасл, табиат инжиқликларига боғлиқ эмаслиги бу йўлнинг келажаги порлоқ эканлигидан далолат беради. Бир мисол, атиги 25-30 мкг. “секкетин” деб аталмиш гормонни ажратиш учун 1 т. қорамол ичагини қайта ишлаш керак бўлса, шу миқдордаги гормон оддий микробиология лабораториясида бемалол ажратиб олиниши мумкин. Ишлаб чиқариладиган гормонларни рўйхати доимий равишда ошиб бормоқда. Уларни ишлаб чиқариш энг аввало шу гормонларга бўлган муҳтожлик ҳамда, илмий лабораторияларни бу жараёнларни бажаришга тайёр эканлиги билан белгиланади. Бугунги кунда эритропоэтин (эритроцитларни, демак гемоглобинни ҳосил бўлишини бошқарувчи гормон) энкефалинлар ва эндорфинлар (инсонни кайфиятини, эслаш қобилиятини кўтарувчи, тонусини оширувчи асаб тизимини бошқарувчи гормонлар) ишлаб чиқариш бошлаб юборилган. Микроб хужайралари баъзи бир стероидли гормонларни ишлаб чиқаришга ҳам қодир.

Масалан, Артхробактер глобиформис бактерияси гидрокортизонни преднизолонга айлантириш учун ишлатилади. Шунингдек, микробиологик трансформация усули, буйрак усти безининг гормони бўлган кортизон кимёвий синтезини бир неча этапини қисқартиришга олиб келади.

Интерферонлар -хужайранинг иммун тизимини фаоллаштирувчи, оқсил табиатли биостимуляторлардир. Бундан ташқари, улар вирусга қарши фаолликка эга бўлиб, рак хужайраларини кўпайишдан тўхтатиш хусусиятига эга. Одам интерферонларининг уч синфи маълум : а, б ва г. Ўтган асрнинг 70- йилларидаёқ, инсон б-интерферонини синтез қилувчи гибрид ДНК ни бактерия хужайрага ўтказишга мувофиқ бўлинган эди. Орадан кўп ўтмай бунга ўхшаш конструкциялар а- ва г- интерферонлар учун ҳам тузилди. Э.цоли бактерияси хужайрасига, бактерия триптофан ёки лактоза оперони ва интерферон гени сақловчи, гибрид ДНК ўтказилиши билан у ёки бу хусусиятга эга бўлган интерферон синтез қилувчи бактерия штамлари яратилган эди. Кейинроқ эса, штамларни ҳосилдорлигини ошириш ҳамда вирусга қарши хусусиятларини кўпайтириш мақсадида рекомбинант ДНК да модификация (хусусан баъзи-бир аминокислоталарни алмаштириш) қилинди ва хўжайин хужайранинг генотиби ҳамда уларни ўстириш шароитлари танланди. Ҳар уч синфга мансуб интерферонлар синтез қилувчи бактериялар штамлари Россиянинг кўпгина олимлари томонидан ҳам яратилган эди. Хусусан, а- ва г- интерферонлар штамлари биорганик кимё институтида б - интерферон штамми эса Россия ФА Генетика ва саноат микроорганизмлари селекцияси институтида яратилган эди. Интерферонлар ишлаб чиқариш учун Э.цоли дан ташқари Метхйломонас, Салмонелла, Псеудомонас каби грамманфий бактериялардан ҳам фойдаланиш мумкин. Масалан, Псеудомонас сп. штамми асосида б- интерферон ишлаб чиқариш биринчилардан бўлиб Россияда йўлга қўйилган эди. Интерферон синтез қилувчи ачитқи замбуруғларини трансмутантлари ҳам яратилган бўлиб, уларнинг бактерия штаммлардан анча афзаллик томонлари ҳам бор. Хусусан, ачитқи замбуруғлари арзон озиқа талаб қилади, фаглар таъсирига ва лизисга чидамли, осон чўкади, энг муҳими преинтерферонлар ҳосил бўлишини тўғри ташкил қилади.

Интерлейкинлар -қисқа полипептидлар бўлиб, улар организмда иммун жавоб ташкил бўлишида қатнашадилар. Ген муҳандислиги усуллари асосида Э.цоли нинг ҳар хил типга мансуб, Интерлейкинлар ишлаб чиқарувчи штамлари яратилган. Латвияда (Органик синтез институтида) Интерлейкин-2 синтез қилувчи штамм яратилган бўлиб, буйрак раки хасталигини даволашда кенг ишлатилиб келинмоқда. Шунингдек, Интерлейкин - 1 синтез қилувчи Э.цоли штамми ҳам яратилган. Бу оқсил нафақат иммун реакция бузилганда шунингдек, баъзи бир шишларни қайтаришда ҳам ишлатилмоқда. Юқори сифатли ва юқори фаолликка эга

бўлган дори - дармонлар ишлаб чиқариш учун охириги вақтда ген муҳандислиги усулларида фойдаланиб бифункционал (яъни, икки хил фаолликка эга бўлган) оқсиллар яратилмоқда. Масалан, аминокислоталарнинг кетма-кетлиги Интерлейкин-2 га ва макрофаг ҳамда гранулоцитларни колонияларини мўътадил қилувчи факторга ўхшаган оқсил моддалардир. Тиббиёт учун зарур бўлган оқсил пептид препаратлари ишлаб чиқариш замонавий биотехнологиянинг энг гуркираб ривожланаётган йўналишларидан бири ва бу йўналишга ривожланган мамлакатлар кўплаб маблағ ажратиб турибдилар. Мисол тариқасида рақамларга мурожаат этамиз: биргина АҚШ даволовчи полипептидларни ишлаб чиқариш учун 1987 йил 568 млн. доллар; 1995 йил 1.117 млн. доллар ажратган бўлса 2000 йилда бу рақам 100 млрд. долларни ташкил этди.

Ген инженерлигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

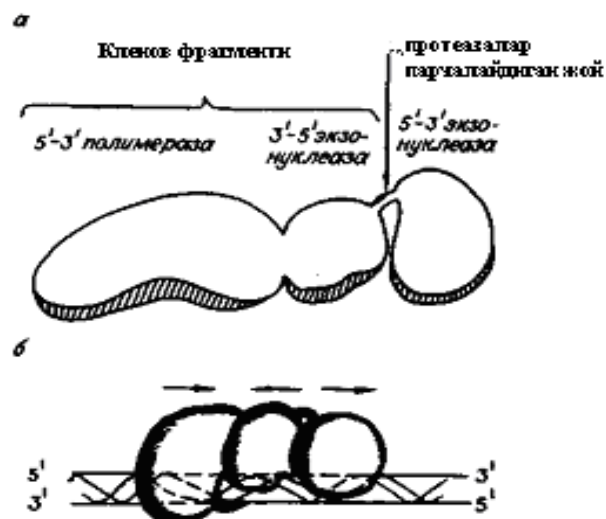
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимераза) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

Рестриктазалар (рестрикцияловчи эндонуклеазалар) – ДНК молекуласида маълум бир нуклеотидлар кетма-кетлиги (рестрикция сайтлари)ни таниб уларга «хужум қилувчи» ферментлардир.

Рестрикция ва модификация системалари бактерияларда кенг тарқалган: улар резидент ДНКни бегона нуклеотидларни киришидан ҳимоя қилади. 1968 йили Мезелсон ва Юанлар метилланмаган ДНКни парчаловчи рестриктазани ажратиб олишган. 1970 йили еса Смит ва Вилкокс *Хаеомпхилус инфлуензае* дан ДНКнинг аниқ бир кетма-кетлигини парчаловчи биринчи рестриктаза (Ҳинд III)ни ажратиб олишган. Турли бактериялар цзининг ДНКсини турлича белгилаганлиги сабабли, рестриктазалар ҳам турли кетма-кетликларни таниши керак. Шундан бери, рестрикциянинг 150 та сайтини танийдиган рестрикциялар ажратиб олинган.

Бактерияларнинг барча рестрикция эндонуклеазалари ўзига хос, қисқа ДНК кетма-кетлигини танийди ва улар билан боғланади. Бу жараёнда ДНК молекуласи таниш сайтида кесилади. Бактерия штамми рестрикция фаолликка эга бўлиши бирга ДНКни метиллаш хусусиятга эга.

Рестриктазаларни 3 синфга бўлиш мумкин: 1, 2 ва 3.



Барча рестриктазалар ДНКнинг қўш спиралида қатъий бир кетма-кетликни танийди, лекин 1-синф рестриктазалари ДНК молекуласининг ихтиёрий нуктасини кесади, 2- ва 3-синф рестриктазалари еса таниш сайтининг ичидаги қатъий бир нукталарни парчалайди.

1 ва 3 типдаги ферментлар мураккаб субъбирликдаги тузилишга ега бўлиб, 2 типдаги, яъни метилловчи ва АТФга боғлиқ эндонуклеазали фаолликка егадир.

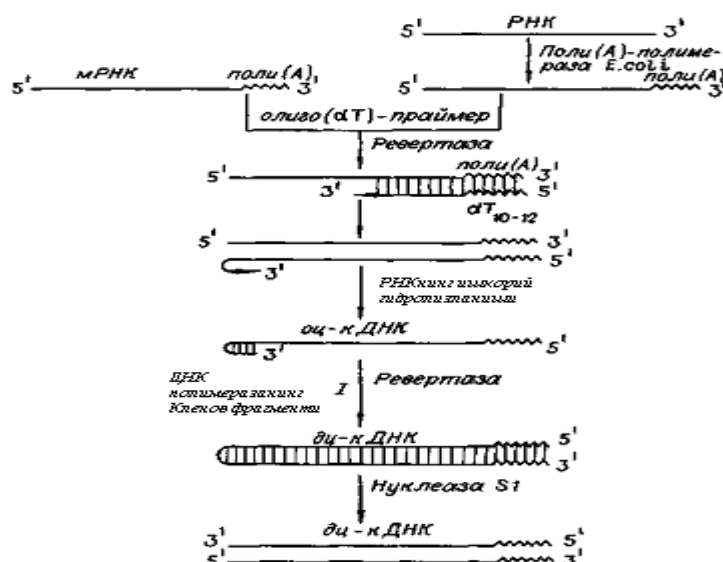
2-синф ферментлари 2 та алоҳида оқсиллардан: рестрикцияловчи эндонуклеаза ва модификацияловчи метилазалардан ташкил топган. Шунинг учун ген инженериясида асосан 2-синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

Ҳозирга келиб 500 дан ортиқ 2-синф рестриктазалари ажратиб олинган. Шунга қарамай турли микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар ичида ДНКни муайян бир кетма-кетлигини танийдиган ферментлар учрайди. Бундай жуфтликлар ёки гуруҳлар **изошизомералар** деб аталади. Агар ферментлар ДНКни муайян бир кетма-кетлигини таниса ва ДНК муайян бир нуктада кесадиган бўлса ҳақиқий изошизомералар, ҳамда ДНКнинг битта сайтини таниб, лекин ўша сайтнинг турли нукталарини кесадиган бўлса, сохта изошизомералар дейилади.

Қайтар транскриптаза м-РНКни ДНКнинг комплементар занжирига транскрипциялаш учун ишлатилади. Геноми бир занжирли РНК молекулаларидан иборат бўлган ретровируслар ўрганилганда ретровирус ички ҳужайравий ривожланиши жараёнида ҳужайра ҳўжайин хромосомасига 2 занжирли ДНК кўринишида ўз геномининг интеграция босқичини босиб ўтиши аниқланган. 1964 йили Темин РНК-матрицада комплементар ДНКни синтезловчи фермент борлигини аниқлаган. Ушбу РНКга боғлиқ **ДНК-полимераза** қайтар транскриптаза ёки ревертаза деб номланган.

Қайтар транскриптаза реакциясини РНК фаолликка ега бўлган кучли ингибиторлардан фойдаланган ҳолда махсус шароитларда олиб борилади. Бунда РНК молекулаларининг тўлиқ ҳажмли ДНК-нусхалари олинади. Праймер сифатида поли (А)-тутувчи мРНК нинг қайтар транскрипциясида олиго (дТ), 3ъ-поли (А) учига ега бўлмаган РНК молекулалари учун еса кимёвий синтезланган олигонуклеотидлар ишлатилади. мРНКда ДНКнинг комплементар занжири синтезлангандан ва РНК бузилгандан кейин ДНКнинг 2 занжири синтезланади.

Матрица сифатида кДНКнинг биринчи занжири бўлиши мумкин. Бу реакция ревертаза сингари Э.Солнинг ДНК-полимеразаси ёрдамида катализланиши мумкин. Синтез тугагандан сўнг кДНКнинг 1- ва 2-занжирлари шпилка тугуни билан ковалент боғланган ҳолда қолади. Бу тугун эндонуклеаза С1 билан парчаланади. Ҳосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида кўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.



19-расм

РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси.

Лигазалар. 1961 йили Мезелсон ва Вейгл фаг л мисолида рекомбинациянинг моҳияти ДНК молекулаларининг кесилиши ва кейинчалик бирлашишидан иборатлигини кўрсатганлар. Бу ДНК фрагментларини тикилишида қатнашадиган ферментларни топишга сабаб бўлган. 1967 йили бундай фермент топишган ва улар ДНК-лигазалар деб номланган. Бу фермент нуклеин кислотанинг 2 занжирли молекуласидаги фосфодиефир боғни катализлайди. Бошқача айтганда, ДНК-лигазалар ёнма-ён жойлашган нуклеотидларни қанд қолдиқлари аро боғ ҳосил қилиб бирлаштиради. ДНК-лигазалар ДНК репарацияси жараёниларида, репликацияда жуда керакдир.

ДНК-лигазалар кофакторга бўлган зарурияти ва таъсир қилиш хусусиятига қараб 2 типга ажратилади. Э.цол нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид, Т4- фагининг лигазаси еса Mg^{2+} иштирокида АТФ ни ишлатади.

Вектор молекулалар, генлар библиотекасини яратиш ва алоҳида генларни ажратиш технологияси

Рекомбинант ДНК ни автоном репликация бўлиши учун жавоб берадиган ДНК бўлаги вектор молекулалари дейилади. Вектор молекулалар ўз вазифасига кўра икки типга бўлинади. Биринчиси автоном репликация бўлувчи векторлар. Иккинчиси хромосомага интеграция бўлувчи векторлар. Вектор молекулалар ген муҳандислиги биотехнологиясида генларни клонлашда ва трансформация қилишда асосий иш қуроли бўлиб хизмат қилади.

Вектор молекулалари вазифасини фаг ДНК лари, плазмидалар ва ўсимликларни хлоропласт ҳамда митохондриял ДНК лари ўташи мумкин.

Хўжалик аҳамияти қимматли бўлган генларни ажратиш учун ген библиотекаси тузилади. Хромосомал ДНК асосида ген библиотекасини тузиш қуйидагича амалга оширилади:

ДНК ва вектор молекулалар рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилади ва маълум шароитда реассоциация қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия ҳужайрасига трансформация қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига еътибор бериш керак. Бу кўрсаткич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

$$n = \frac{1}{p} \quad (1-p)$$

р

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва рк0,99 га тенг бўлса 99% хромосомал ДНК нинг мос қисми клонланади.

Генларни клонлашда кўпинча кДНК библиотекасини тузиш мақсадга мувофиқдир. Бу ҳолда махсус поли (Й) ва олиго (дТ) колонкалари ёрдамида учларида поли (А) нуклеотидлар кетма-кетлигини сақловчи иРНК тРНК ва пРНК дан ажратиб олинади. Олинган иРНК молекуласи олиго (дТ) нуклеотидлари билан аралаштирилиб реассоциация қилинади. Бунда иРНК молекуласининг поли (А) учига дА-дТ қўш занжирли сегмент ҳосил бўлади. Ушбу икки занжирли сегментнинг олиго (дТ) учи кДНК синтезини амалга оширувчи ревертаза ферменти учун праймер (кДНК синтезининг бошланиш нуктаси) вазифасини ўтайди.

Синтез қилинган кДНК молекуласи қисқа учли икки занжирли структура билан тугалланади. кДНК синтезида матрица вазифасини ўтаган иРНК молекуласи NaOH билан парчаланади натижада қисқа икки занжирли ва тўлиқ иРНК молекуласига комплементар бўлган бир занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади.

Ҳосил бўлган қисқа икки занжирли структура кДНК нинг иккинчи занжирини синтез қилишда праймер вазифасини ўтайди. ДНК-полимераза II ферменти ёрдамида кДНК нинг иккинчи занжири синтез қилинади. Ҳосил бўлган кДНК нинг бир занжирли қисми СИ-нуклеаза ферменти ёрдамида парчаланади ва икки занжирли кДНК молекуласи ҳосил бўлади. Шу юсинда ҳосил бўлган кДНК молекуласи вектор молекулаларига уланган ҳолда клонланади.

Ҳар икки усул билан яратилган геном библиотекасидан индивидуал генларни ажратиб олиш қўйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., $0,2 \text{ N}$ NaOH еритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил кўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза филтрига бириктирилади. Олинган филтр $[\text{g}^{32}\text{P}]$ АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

Молекуляр гибридизация жараёнида филтрга бириккан рекомбинант ДНК молекуласига комплементарлик қонунияти асосида нишонланган иРНК молекулалари бирикади.

Ҳосил бўлган гибрид ДНК молекуласи денатурация қилиниб нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (елюция ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи ҳужайрасиз оқсил синтез қилиш тизимида текшириб курилади. Ҳосил бўлган оқсил молекуласининг идентификация қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

Ген инженерлигининг мақсади лаборатория усуллари билан ирсий хусусиятлари комбинацияланган янги организмларни яратишдир.

Америкалик олимлар Уоцон ва Крик 1953 йилда ўзларининг оламшумул янгиликлари, яъни ДНКнинг иккиламчи структурасини аниқлашлари ва матрица синтезини тушунтириб беришлари билан ген инженерлигини алоҳида фан сифатида ривожланишига асос солдилар.

ДНКнинг қўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини кўчирадилар. Натижада ҳужайра бўлиниши олдидан 2 та бир хил ДНК молекулалари ҳосил бўлади ва улардан бири ҳужайра бўлингандан сўнг қиз ҳужайрага ўтади. Қиз ҳужайра она ҳужайра ташиган ахборотни ташийди ва у бажарган функцияларни бажаради. Шундай қилиб тирик организм ҳужайраларида ўзига хос реакция – **матрица синтези** рўй беради. Молекулаларнинг бири – матрица, иккинчиси еса шу матрица асосида тузилади. ДНК репликацияси, барча турдаги РНК ва иРНК структурасига мос равишда оқсил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг

барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

Худди шу механизм билан РНКнинг йиғилиши амалга ошади, фақатгина 2 та спирал емас, балки битта спиралники. Бу жараён **транскрипция** дейилади. Демак, хужайрадаги ахборот оқимини матрица синтезининг реакциялари амалга оширади, яъни, **ДНК репликацияси** (ирсий ахборотни киз хужайраларга узатиш учун керак), **транскрипция** (хужайра ядросида и-РНКни синтези) ва **трансляция** (рибосомалар ёрдамида и-РНКда оқсил занжирларини йиғилиши).

Организмнинг ирсий хусусиятларини ўзгартириш билан трансген ўсимлик ва ҳайвонлар яратиш ва уларни клонлаш имкони туғилган.

Эукариотлар хужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан овалбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информатив РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872 та нуклеотиддан 1158 тасигина оқсилнинг 386 та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5'-учдаги 64 та нуклеотид ва 3'-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овалбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмадага жойлаштирганлар ва уни *Э. coli* хужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар еса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овалбуминнинг информатив РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фарз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

Кейинчалик Шамбон ва Курилскини кўрсатишларича, овалбумин генининг ДНКси и-РНК билан қисман бирлашади: ДНКнинг 7 та участкаси РНК билан гибридланмайди ва мРНКда учрамайдиган геннинг ушбу участкалари **интронлар** деб аталади. Интронлар овалбуминни кодлайдиган ДНК кетма-кетлигини 8 та фрагмент - **экзонларга** ажратади.

Интронлар геннинг маълум бир қисмида учрайди, ҳажми катта бўлиб 100 дан бир неча минг нуклеотидлар жуфтдан иборатдир. Ўртача ҳисоблаганда интронлар экзонлардан узунроқдир.

Ҳозиргача ўрганилган сут емизувчилар, қушлар ва амфибияларнинг гени тузилиши яхлит кўринишда емаслиги аниқланган, яъни улар экзонлар ва интронлардан тузилгандир. Фақатгина гистон ва интерферонларнинг генлари бундан мустаснодир. Яхлит бўлмаган генлар булардан ташқари ҳашоротлар ва ачитқиларда, ҳамда ДНКси мавжуд ва еукариот хужайралар ядросида кўпаядиган вирусларда топилган.

Генетик рекомбинация – икки хромосомалараро генларнинг алмашинувидир. Понтекорвонинг 1958 йилда берган таърифига кўра, рекомбинация – 2 ёки ундан ортиқ детерминант ирсий белгиларга ега бўлган хужайра ёки организмларнинг ҳосил бўлишга олиб келадиган жараёндир. Бундай рекомбинация сут емизувчиларда жинсий хужайраларнинг ҳосил бўлишида албатта рўй беради. Меёз вақтида гомологик хромосомалар генлар билан алмашинади (кроссинговер); айнан ана шу алмашинув орқали ирсий белгиларни авлоддан-авлодга ўтишини тушунтириш мумкин. Вирус ва бактерияларда генетик рекомбинация ҳайвонларга нисбатан камроқ бўлади. Генетик материалнинг алмашинуви, ундан кейин содир бўладиган рекомбинация бир ёки бир-бирига яқин турларда рўй беради.

Барча тирик организмларда рестрикцион эндонуклеазалар мавжуд бўлиб, улар организмга кирган ёт ДНКни танийди ва уни парчалайди.

Генлар алмашинуви ёки генни хужайрага киритиш *Ин vitro* шароитидаги генетик рекомбинация орқали амалга оширилиши мумкин. Бу усул бактерияларда, хусусан, ичак таёқчаси хужайраларига ҳайвон ва одам генлари киритилиб, улар репликацияланишига еришиш натижасида ишлаб чиқилган.

Ин vitro шароитида генетик рекомбинацияни амалга оширишнинг моҳияти турли турлардан ДНКни ажратиш, ДНКнинг гибрид молекулаларини олиш ва ҳосил бўлган

рекомбинант молекулаларни янги белги, масалан, ўзига хос оксилни синтезини ҳосил қилиш мақсадида тирик ҳужайраларга киритишдан иборатдир (расм)

Генни ажаратиб олиш учун биокимёвий методлардан фойдаланилади. Ҳайвон ҳужайраларида мРНК транскрипцияси ҳужайра ядросида содир бўлади: мРНК молекулалари информацияни ядродан ситоплазмага ташийди, (бунда улар оксиллар трансляцияси учун ишлатилади). Бактерия ҳужайраларида еса транскрипция ва трансляция бир вақтда ва уйғунлашган ҳолда рўй беради: мРНК рибосомалар билан боғланган. Рибосомалар трансляция жараёнида ва ҳайвон ҳужайраларида муҳим рол ўйнайди.

ДНК молекуласи оксил структураси ҳақидаги ахборотдан ташқари бир қатор бошқарувчи сигналларга ҳам ега. Бу сигналлар транскрипция ва трансляция учун бошланғич нуқта ҳисобланади. Ҳайвон ҳужайраларида оксил структураси тўғрисидаги ахборот ДНКнинг бир нечта сегментида, яъни ДНК қисмлари билан ажралган сегментларида (интронлар деб номланади) кодланиши мумкин.

Бактерия ҳужайраларига ДНКни киритиш 2 усулда амалга оширилади:

3. Вектор сифатида плазмидадан фойдаланиш

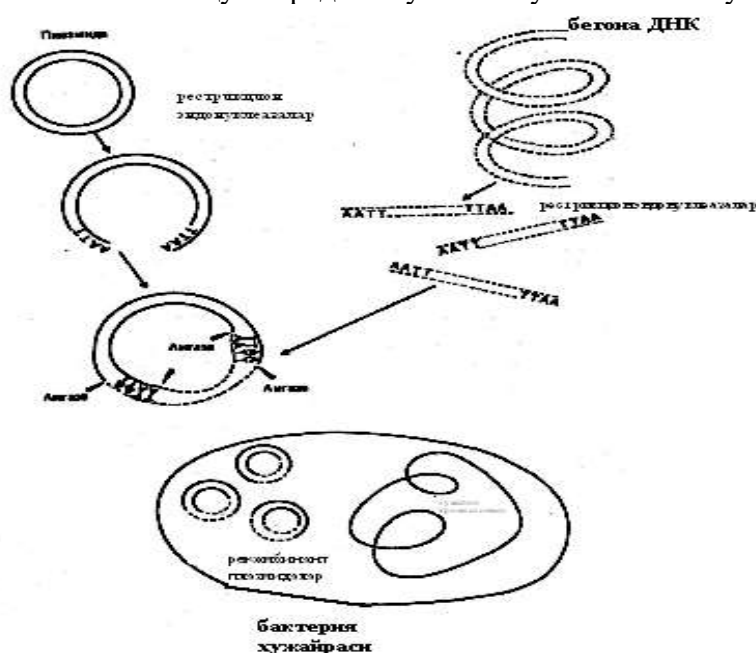
4. Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиш.

1950 йилнинг бошларида Ледерберг *Э.коли* да конъюгация жараёни рўй беришини кўрсатиб бергандан сўнг бактерия ҳужайраларининг “қўшилиши” генетик белгиланган ва бу генетик информация ота типидagi ҳужайрадан она типидagi ҳужайрага ёки реципиент ҳужайрага ўтиши аниқланган. Конъюгация пайтида ҳужайраларнинг донорлик қилиши (ёки Ф⁺ -ҳосилдорлик омили) бошқа исталган генетик белгига нисбатан кам учрайди. F-омил донор ҳужайранинг исталган маълум генидан мустақил равишда узатила олади. Ледерберг ушбу F-омил юқори организмлар ситоплазмасида учрайдиган хромосомадан ташқари генетик элементга ўхшашлигини таъкидлайди. 1952 йилда хромосомадан алоҳида жойлашган генетик системаларни умумий ном – **плазмидалар** деб аташ қабул қилинган.

Плазмидалар бактерияларнинг деярли барча турларида учрайди. Плазмидали штамм плазмидасиз вариантларни тиклайди. Бундай ҳолатларда плазида бутунлай йўқолади ва ҳужайра уни регенерация қила олмайди. Буни фақатгина бошқа бактериянинг ҳужайрасидан олиш мумкин.

Плазмидалар ДНКнинг ҳалқасимон молекулалари бўлиб, бактерия ҳужайралари геномини 1-3 %ини ташкил қилади. Ирсий аппаратнинг шу кам қисмининг ўзи одатда бактериал хромосома кодламайдиган муҳим генетик белгиларни кодлайди. Масалан, улар бактерия ҳужайраларини конъюгациялаш учун керакли информацияни сақлайди. Улар ҳужайранинг озуқа манбаи сифатида кўплаб мураккаб бирикмаларни сарфлаши учун ёрдам беради, ҳамда турли токсик агентларга нисбатан, айниқса антибиотикларга, чидамлилигини таъминлайди. Масалан, стафилококк плазмидалари пенициллин, летал ҳолатга келувчи симоб ва бир қатор оғир металлларга чидамли генларни ташийди. *Э.коли*нинг R-плазмидалари таркибида ҳам оғир металлларга чидамли генлар топилган. *Бациллус тхурингиенсис* ҳужайраларида инсектицид синтезини бошқаради. Бактерия ҳужайраларига бегона генларни плазмидалар ёрдамида киритиш 1975 йилдан бошлаб уларнинг структураси ва репликация ҳарактерини аниқлаш учун туртки бўлди. Ҳужайрада плазмидалар сони 1 ва 100 ортик бўлиши мумкин, плазида қанчалик катта бўлса, унинг

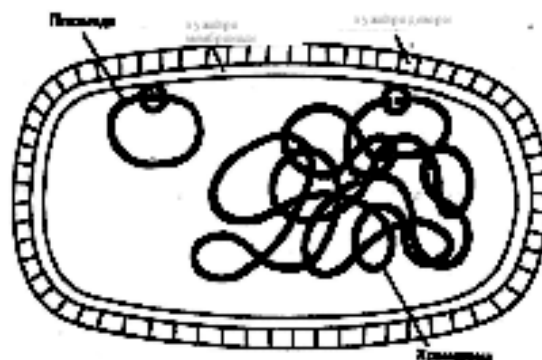
хужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



20-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия хужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактериялараро плазмидалар алмашиниши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плаزمидадаги генларнинг ўзаро алмашинувига олиб келади. Натижада реципиент хужайралар донор хужайралар ҳисобига тирик қолади.



21-расм

Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиб генни киритиш методида ген вирус геномига жойлаштирилади ва у бактерия хужайрасида вирус геномини кўпайиши давомида ген вируси билан бирга репликацияланади.

Бактерия хужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.

Бактерия хромосомасининг узунлиги 1 мм атрофида бўлиб, у тахминан 3 млн нуклеотидлардан иборат ДНК молекуласидан тузилгандир; у хужайрада бир неча минг марта зич жойлашган ва 1 мкм майдонни егаллайди. Инсон хужайраси ДНКси 46 та хромосомада тузилган, уларнинг ҳар бирининг узунлиги тахминан 4 см, нуклеотидлар сони эса 3 млрдга яқиндир. Рестрикция эндонуклеазалар ДНК молекуласини маълум бир нуқталарда парчалайди, натижада бир неча юздан бир неча минггача нуклеотидли фрагментлар ҳосил бўлади. Ҳар бир рестриктазалар ДНКни ўзига хос равишда парчалайди.

Бактерия хужайрасига генларни экспрессия қилиш учун ҳайвонларнинг ўзига хос оқсил (масалан, инсулин) ишлаб чиқарадиган махсус хужайрасидан ушбу оқсилни

кодлайдиган мРНК ажратиб олинади. Сўнг қайтар транскриптаза ёрдамида мРНКга комплементар ДНК ипи синтезланади. ДНК нусхасига комплементар бўлган иккинчи ип ДНК-полимеразалар ёрдамида ажратилади. Кейинги босқичда қўш ипли ДНКнусхаси трансфераза ферменти иштирокида плазмидага киритилади. Трансфераза ДНК учларида нуклеотидларнинг қисқа кетма-кетлигини тиклайди. Сўнг плазмиданинг махсус жойи рестрикцион эндонуклеаза билан парчаланади. Плазмида парчалангандан кейин унинг учлари трансфераза ёрдамида гуанин қолдиғи бўлган 4 та нуклеотид жойлаштирилади. Шундан сўнг ҳосил бўлган 2 та ДНК молекулаларининг учлари нуклеотидлар кетма-кетлиги ўзаро таъсирлашиши ҳисобига бирикади; бактериал фермент – ДНК-лигаза ёрдамида киритилаётган ДНК ва плазмида ДНКси тикилади. Ҳосил бўлган янги ҳалқасимон плазмида рекомбинант ДНКга ега бўлади.

Маълумки, ҳозирги пайтда инсонлар орасида диабет касаллиги кўп учрайди ва унинг бир неча кўринишлари мавжуддир. Инсулин ёрдамида даволанадиган формаси ушбу гормонни синтезлайдиган ҳужайраларнинг танлаб нобуд бўлиши билан боғлиқдир. Диабетнинг инсулин талаб қилинмайдиган кўриниши еса тегишли диета ёрдамида даволанади.

1921 йили Торонтода Бантинг ва Бест итнинг ошқозон ости безидан гормон ажратиб олишган ва унинг антидиабетик хусусияти борлигини айтиб ўтишган. 1922 йили ҳайвондан ажратиб олинган инсулин касалланган ёш болага юборилган ва кўтилган натижага еришилган. Шундан сўнг инсулин кўп миқдорда ишлаб чиқарила бошланган.

Инсулиннинг биринчи кристаллари 1952 йилда олинган, кейинчалик уни тозалаш методлари такомиллаштирилиб, бошқа гормонал моддалар (масалан, глюкогон – инсулин ва соматотропин антогонисти) ҳам олина бошланган. Гилберт ва унинг шогирдлари инсулин мРНКсини каламуш ошқозон ости безидаги β-ҳужайрасининг ўсмаларидан ажратиб олишган. Бунинг учун мРНКнинг ДНКнусхасини рБР322 *Э. coli* плазмидасига геннинг ўрта қисмига пенициллиназа жойлаштирилади. Ҳосил бўлган ДНКнинг кетма-кетлиги аниқланганда, унинг рекомбинант плазмидаси проинсулин структура тўғрисидаги ахборотга егаллиги маълум бўлган. Ичак таёқчаси ҳужайраларида мРНК трансляцияси жараёнида пенициллаза ва проинсулин кетма-кетлигини тутган гибрид оқсил синтезланган. Оқсил таркибидан трипсин ёрдамида гормон ажратиб олинган. Ушбу йўл билан олинган молекулалар ҳам ошқозон ости безидан ажратиб олинган гормон сингари қанд алмашинувига таъсир қилган.

Инсоннинг ўсиш гормони ёки соматотропин, гипофизнинг олд бўлмасидан секрецияланади. Бу гормоннинг етишмаслиги натижасида инсонда гипофизар паканалик келиб чиқади. 4-5 ёшли болаларга гормонни инъекциялаш билан касалликни тузатиш мумкин. Илк марта соматотропин мурдадан олинган ва уни етарлича олиш имкони бўлмаган.

Махсус конструкцияланган бактерия ҳужайраларида синтезланадиган ўсиш гормонини бир неча афзалликларга егадир, яъни бу йўл билан гормонни кўп миқдорда олиш мумкин, унинг препаратлари биохимик тоза ва вируслардан ҳолидир.

Соматотропинни (191 та аминокислота қолдиғидан иборат) олиш учун биринчи босқичда мРНК қўшиқли ДНК нусхаси клонланади ва рестрикцион эндонуклеазалар ёрдамида парчаланиб гормоннинг биринчи 23 та аминокислотасидан ташқари барча аминокислоталарни кодлайдиган кетма-кетлик ҳосил қилинади. Сўнг 1 дан 23 гача аминокислотага мос келадиган синтетик полинуклеотид клонланади. 2 та фрагмент бири бири билан бирлаштирилади ва рибосомаларни бирлашадиган участкасига жойлаштирилади. Олинадиган гормон миқдори 1 мл културага 2,4 мкг тўғри келади. Бактерияларда синтезланган гормон керакли молекуляр массага ега бўлади ва бошқа бактериал оқсиллардан холи бўлади.

Қон ҳужайралари ва фибриобластларда интерфероннинг ҳосил бўлиши. Култураларда ўстирилувчи ва интерферон ҳосил қилувчи ҳужайраларнинг барча типини учун интерферон олиш жараёни деярли бир хил. Ҳужайралар Сендай вируси билан

зарарлантирилади ва 24 соатдан сўнг центрифугаланади: чўкма усти суюқлигидан интерфероннинг “дағал” препарати олинади ва тозаланади. 2 л қон қайта ишланганда 4 млн бирликдаги интерферон олинади. Деярли ўтган 10 йил давомида интерферон ишлаб чиқаришнинг катта қисми Хелсинкидаги соғломлаштириш маркази лабораториясига тўғри келиб, бу ерда Канделл соғлом донорлар қони лейкоцитларидан интерферон олиш методини такомиллаштирди. Бу лаборатория лейкоцитар интерферон ишлаб чиқариш бўйича лидер бўлиб, йилига 400 млрд интерферон ишлаб чиқарилган.

1960 йилнинг бошларидан бошлаб, Шани соғломлаштириш ва медицина илмий текшириш миллий институти, ИНСЭРМ, Париждаги Сент-Винсент-де-Пол клиникаси) Пастер Институти билан ҳамкорликда интерферон олишнинг ярим масштабда ишлаб чиқаришни йўлга қўйди. 1980 йилнинг мартада ушбу муаммо илмий текшириш институтларининг миллий марказлари, ИНСЭРМ, Пастер институти ва университетларининг олимлари томонидан конференцияда муҳокама қилинди. ИИП фирмаси ва қон қуйиш маркази (лейкоцитлар билан таъминлайди) интерфероннинг ишлаб чиқариш методини такомиллаштирди ва интерферонни кўп миқдорда ҳосил бўлиш йўллари аниқлади. Ярим йил ичида ИИП 26000 донордан олинган қондан 48 млрд бирлик интерферон олишга еришилган ва Франция, Европада интерферон ишлаб чиқариш бўйича 2-ўринни егаллади. 1980 йил охирига келиб, ИИП ва соғлиқни сақлаш вазирлиги ўртасида интерферонни синаш бўйича шартнома тузилиб, унга кўра интерфероннинг вирусларга ва ўсмаларга қаршилик хусусияти текширилиб кўрилди ва уни кўп миқдорда ишлаб чиқариш йўлга қўйилиши белгиланди. Интерфероннинг ишлаб чиқарилиши йилига 100 млрд бирликгача орттирилиб (200 касални даволашга етарли), унинг 80 млрд бирлиги клиникаларнинг марказий дорихоналари томонидан сотиб олинган, қолган қисми еса илмий-текшириш институтларига юборилган.

1982 йилнинг июлида интерфероннинг захираси 70 млрдгача борган бўлиб, ундан фақат 20 млрд ишлатилган. ИИП ва қон қуйиш маркази институти ишлаб чиқаришни тўхтатишга мажбур бўлди, чунки маҳсулот сарфланмай қолди ва уни экспорт қилиш зарурати туғилди. Ойига 2 млрд лейкоцитар интерферон ишлатилади. Бироқ соғлиқни сақлаш вазирлигининг 1982 йил июл ойидаги қарори препарат ишлаб чиқаришни тўхтатиш вақтинчалик эканлиги аниқланди.

Назорат учун саволлар

1. Рестриктазалар ва уларни тавсифланг?
2. Лигаазалар ва уларни тавсифланг?
3. Изомеразалар ва уларни тавсифланг?
4. Ингибиторлар нима?
5. 1.Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.
6. 2.Қайтар транскриптазалар
7. 3.Лигаазалар.
8. 4.*Ин vitro* шароитида генетик рекомбинацияни амалга ошириш
9. 5.Рекомендант ДНК-лар тўғрисида тушунча
10. 6. Векторларнинг умумий хусусиятлари
11. Бактерия ҳужайраларига ДНКни киритиш методлари
12. 8.Бактерия ҳужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.
13. 9.Ичак таёқчаси ҳужайраларида инсон инсулинини биосинтезлаш
14. 10.Ичак таёқчаси ҳужайраларида инсон ўсиш гормонини биосинтезлаш.
- 15.

16. Назорат учун саволлар

- 1.Генетик ахборот ташилишига масъул молекуляр механизмларни тушинтиринг?
- 2.Транскрипция ва трансляция жараёнларини ген муҳандислигидаги аҳамияти?

3. ДНК синтези- репликациянинг ген муҳандислигидаги аҳамияти?
4. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонларга таъриф беринг?
5. Генетик ахборот ташилишига масъул молекуляр механизмларни тушинтиринг?
6. Транскрипция ва трансляция жараёнларини ген инженерлигидаги аҳамияти?
7. ДНК синтези- репликациянинг ген инженерлигидаги аҳамияти?
8. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонларга таъриф беринг?
9. Ген муҳандислигининг моддий асослари ҳақида маълумот беринг?
10. Репликация нима?
11. Трансдукция нима?
12. Оқсил биосинтезини гапириб беринг?
13. Векторлар ҳақида маълумот беринг?
14. Транспозонлар ҳақида маълумот беринг?

6- МАЪРУЗА.

ЎСИМЛИКЛАР ГЕН МУҲАНДИСЛИГИ (2с)

Режа:

1. Ўсимлик ген муҳандислиги
2. Протопластлар.
3. Каллус тўқима. Трансген ўсимликларнинг яратилиши ва аҳамияти
4. Ўсимлик гибридларини олиш
5. Бегона генларни ўсимликларга киритиш йўллари
6. Агробактер тумифациенс бактерияси . Ти-плазмида
7. Ўсимлик ген муҳандислигида қўлланиладиган маркерлар
8. Трансген хужайраларини саралаб олиш.
9. Трансген ўсимликларининг истиқболлари

Таянч сўзлар: агробактериялар, микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, протопластлар, регенерация, ретровируслар, хайвон хужайралари.

Адабиётлар: А- 1, А-3 , Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Ўсимлик хужайраларига генларни киритиш

Ўсимлик хужайраларига генлар турли усул билан киритилади:

Икки паллали ўсимликлар учун табиий вектор, яъни агробактериялар плазмидаси мавжуддир. Бир паллали ўсимликлар учун ҳам ушбу усулдан фойдаланилади, лекин бу усул озроқ қийинчиликлар туғдиради.

Агробактерияларга нисбатан чидамли бўлган ўсимликларда эса генлар бевосита физик йўл билан киритилади. Булар: микрозаррачалар билан «хужум» қилиш ёки балластик метод; электропорация, полиэтиленгликол билан ишлов бериш; ДНКни липосома таркибида ўтказиш ва б.

Энг қулай метод микрозаррачалар билан «хужум» қилиш методи ҳисобланади. Юқори тезликда заррачалар ядрога бевосита кириб, трансформация самарадорлигини оширади. Шу усул билан ДНКга эга бўлган хужайранинг бошқа органеллалари – хлоропластлар ва митохондрияларни ҳам трансформациялаш мумкин.

Охириги вақтларда комбинацияланган трансформация методи – агролистик методи ҳам яратилиб, амалда қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқимага бирор-бир физик йул, масалан баллистик йўл билан киритилади. Киритилаётган ДНК да Т-ДНК вектор ва маркер

гени, ҳамда вирулентликнинг агробактериал гени бўлиши керак. Ўсимлик хужайрасида вирулентлик генини вақтинчалик экспрессияси оксиллар синтезига олиб келади. Бу оксиллар плазмидадан Т-ДНКни тўғри кесиб, уни агробактериал трансформациядаги сингари хўжайин геномига жойлаштиради. Сўнг *ин vitro* да таркибида хужайраларнинг кўпайиши учун зарур бўлган фитогормонли озуқа муҳитига экилади. Озуқа муҳитида одатда трансген ўсимликлар чидамлилика эришиши учун селектив маркер бўлиши керак.

Регенерация кўпроқ каллус босқичидан сўнг рўй беради. Сўнгра муҳит тўғри танлай олинса органогенез бошланади. Униб чиққан куртаклар илдиз бериши учун бошқа муҳитга ўтказилади.

Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси.

Олимлар ўсимлик хужайрасига бегона генларни киритишда бўйича олиб борган тадқиқотларида янги ҳодисаларга гувоҳ бўлганлар. Аниқланишича, бир тажрибанинг ўзида бир хил ДНК конструкцияси билан трансформацияланган трансген клонлар киритилаётган ген экспрессияси бўйича фарқланар экан. Экспрессия даражаси кўпгина омилларга боғлиқ бўлиб, у айниқса киритилаётган геннинг ядро хроматинини қайси қисмига тушишига боғлиқ экан. Бундан ташқари, ядро геномига ДНК конструкцияланганда бир қанча ўзгаришларга учрайди (дупликация, инверсия ва б.) ва бу экспрессиянинг пасайишига олиб келади. Яна аниқланишича, қўлланилаётган трансформация процедуралари хўжайин геноми учун ҳам бефарқ эмасдир.

Биринчидан, трансгенни жойлашиши қайсидир хўжайин генини бирламчи структурасини бузиши билан биргаликда уни инактивациялайди.

Иккинчидан, ўсимлик геномига генлар агробактериал ёки физик ўтказилганда турли кўринишдаги қайта тузилишлар, ҳатто хромосома фрагментларининг транслокациясигача кузатилади. Буларнинг барчаси ўсимлик геномини нормал фаолият кўрсатишини ўзгартиради.

Ўсимликка керакли генни тутувчи *Ти*-плазида кетма-кетлигини киритишнинг 2 хил методи яратилган:

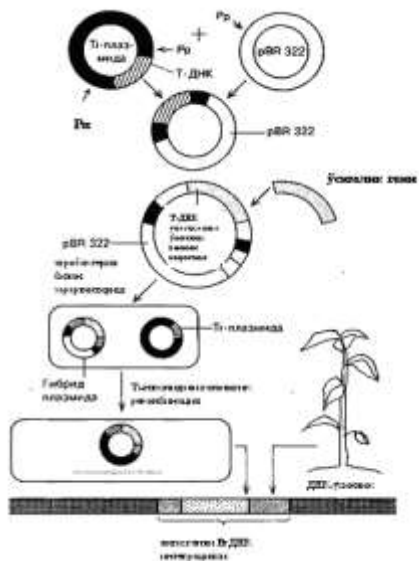
1-метод — «оралиқ векторлар» методи (коинтегратив векторлар) — пБР 322 ичак таёқчасидан фойдаланишга асосланган (расм).

Ти-плазмидадан Т-ДНК рестриктазалар ёрдамида кесилади ва *E. соли* да клонлаш учун пБР 322 плазмидасига жойлаштирилади. Т-ДНК плазмидали бактериялар кўпайтирилади ва плазида ажратиб олинади. Сўнгра клонланган Т-ДНКга рестриктаза ёрдамида керакли ген жойлаштирилади. Ҳосил булган Т-ДНКли рекомбинант молекула яна бир бор катта микдорда кўпайтирилади, яъни ичак таёқчасида клонланади. Шундан кейин конъюгация ёрдамида тўлиқ Ти-плазмидани ташувчи агробактерия хужайрасига киритилади. Натив Ти-плазмидасининг Т-сегментлари ва оралиқ векторлар ўртасида гомологик рекомбинация рўй беради. Бунинг натижасида ген жойлаштирилган Т-ДНК нормал ДНК ўрнига натив Ти-плазмидага киради. Т-сегментга керакли генлар жойлашган Ти-плазмидани ташувчи *A. Тумефацис* хужайралари ҳосил бўлади. Уларнинг навбатдаги кўчирилиши агробактерияларга хос бўлган оддий йўл билан амалга оширилади.

Иккинчи метод бинар (кўш) векторлар системасини яратишга асосланган.

Охириги тадқиқотлардан маълум бўлишича, зарарлаш ва трансформация учун яхлит Ти-плазида керак эмас, балки Т-ДНК нинг чекка участкаси ва Ти -плазмиданинг вирулентликка жавобгар бир участкасининг ўзи етарлидир. Бу иккала участка бир плазмидада бўлиши ҳам шарт эмас. Агар агробактерияда вир сегментли Ти-плазида ва Т-ДНКли бошқа плазида бўлса, бу бактериялар ўсимлик хужайрасини трансформациялаши мумкин. Бундай ҳолда исталган ген жойлаштирилган Т-ДНК ўсимлик геноми билан интеграцияланади. Бунинг учун бактерия хужайраларида гомологик рекомбинация содир бўлиши керак эмас. Бегона генлар экспрессияси учун Т-ДНКнинг махсус промотори, масалан нопалинсинтетаза промотори керакдир.

Ўсимлик хужайрасига конструкцияланган Ти-плазмидани киритишнинг бир нечта методлари бор. Булардан энг оддий табиий усул –



22-расм

Ти-плазмида асосида коинтегратив векторни яратилиши. Рп - рестриктаза 1рдамида парчаланиш

конструкцияланган штаммларни ўсимликнинг зарарланган қисмига киритишдир.

Бошқа метод – протопластларни агробактериялар билан кокультивациялаш йўли билан трансформациялаш. Агробактериялар янги ажратиб олинган ёки бир кунлик протопластларга қўшилса, бактериялар бирлашмайди ҳам, трансформацияланмайди ҳам. Трансформациялаш учун 3 кунлик протопластларда хужайра девори қайтадан ҳосил бўлган бўлиши керак. Бу ҳол хужайра деворини ҳосил қилувчи ва бактерияларни бирлаштирувчи ингибиторларни қўшиш билан исботланган. Кокультивациялаш даври (бу даврда протопластлар агробактериялар билан агрегацияланади), яъни бир суткадан ортиқ вақтдан сўнг бирлашмаган бактериялар қайта ювиш билан олиб ташланади. Сўнг ўсимлик хужайралари гормонлар қўшилган муҳитда ўстирилади. 3-4 ҳафтадан сўнг колониялар гормонсиз муҳитга ўтказилади. Бу муҳитда фақатгина трансформацияланган хужайраларнинг колониялари ўсади.

Шундай усул билан тамаки ва петуниннинг трансформацияланган ўсимлик-регенерантлари олинган.

Охирги 10 йил мобайнида ташқи бозорда янги хусусиятларга эга бўлган **трансген ўсимликлар** чика бошлади. 1996 йили АҚШда трансген ўсимликлар эгаллаган майдон 3 млн. акр бўлса, 2002 йилга бу майдон 80 млн акрга етди. Асосий трансген ўсимликлар: жўхори, соя, гербицид ва ҳашоротларга чидамли ғўзалардир.

Кундан-кунга аҳоли сони ортиб бораётгани сабабли инсоният олдида муҳим бир муаммо, озиқ-овқат маҳсулотларини ишлаб чиқариш масаласи турибди. Яна бир муаммо, бу тиббий даволашдир. Буларни трансген ўсимликлар яратиш билан ҳал қилиш мумкин.

Ген муҳандислиги ёрдамида кишлоқ хўжалиги учун қуйидаги ўсимликлар яратиш учун таклифлар киритилган:

1. Ҳашоротларга чидамли ўсимликларни яратиш. Уларни яратиш учун ўсимликларнинг геномига *Бациллус тхурингиенсис* (бу микроорганизм ҳашоротлар организмида ривожланиб тангақанотлиларда касаллик келтириб чиқаради, одамларга таъсир қилмайди)дан ажратиб олинган токсин гени киритилади. Токсинни синтез

қиладиган ўсимликлар айрим зараркундаларга нисбатан чидамли бўлади. Буларнинг бари далаларда пестицидларни ишлатишни ва атроф-муҳит ифлосланишини камайтиради.

2. Озиқ-овқат маҳсулотларини сифатини яхшилаш. Маълумки, қишлоқ хўжалиги экинларининг ҳаммасининг таркибида ҳам алмашмайдиган аминокислоталар ва витаминлар етарли миқдорда бўлмайди. Буларнинг ўрнини тўлдириш учун ўсимликларга витамин ёки аминокислоталарни синтезлайдиган генлар киритилади. Ҳозирда таркибида каратиноид кўп бўлган трансген гуруч ва оқсилга бой соя ўсимлиги олинган.

3. Товар сифатини яхшилаш. Гулларга пигмент синтезловчи генлар киритилиб ажойиб рангли гуллар ёки оқсилларни флуоресценцияловчи генларни киритиб қоронғуда нур берувчи декоратив ўсимликлар олинган.

4. Гербицидларга чидамли ўсимликларни яратиш.

5. Ўсимликларнинг чидамлилигини ошириш. Маълумки, айрим балиқ ва ҳашоротлар гидрофил оқсиллар ажратади. Бу оқсиллар гени иссиқсевар ўсимликларни совуққа чидамли қилиш учун уларга киритилади.

Ўсимликларда ген муҳандислиги

Ўсимликлар ер юзасида дастлабки организмлар ҳаёт манбаи бўлиб, куёш энергиясидан оқилона фойдаланади. К.А.Темирязов ўсимликлари космик таърифини берган. Ер юзасига барча энергия ишлаб чиқарувчи станциялар йилига 9×10^{12} кВт.с., ўсимликларда еса йилига $1,7 \times 10^{18}$ ккал 2×10^{15} кВт.с куёш энергиясини олади. Кишилар иссиқлик, сув, атом электростанциялари куриб фойдаланса, табиат – 90 А келадиган хлорофилл молекулаларини яратган. Шулардан англаш мумкинки ўсимликларни молекуляр даражада ўрганиш, хужайра технологияси, ген инженерлигини ёлга қуйилиши улкан муаммоларни ҳал қилиш мумкин.

Ўсимликларда генларни кўчириш (трансгенез) табиатда мавжуд ҳолатдир. Генларни кўчиб юришини вируслар, бактериялар таъминлайди. Ўсимликларни поя, илдиз қисмларида зарарланган тўқималарда Агробактериум тумефациенс туфайли ўсма (шиши) ҳосил бўлади. Бу хромосаманинг бактериал типи Ти плазмида туфайли юз беради. У бактерия ва ўсимлик хужайра каби кўпайиши қобилятига ега ва ўсимлик геноми таркибига қўшилиб кетади.

Ти плазмида таркибида регуляторлик хоссаси билан бирга опин моддаларни синтез қилувчи генлари, фитогармонлар (Ауксин, ситокинин) ни синтез қилувчи генлар плазмида ДНК сида кодлашган.

Плазмида хужайраларни сунъий муҳитда ўстиришда уларга регуляторлар керак бўлмайди.

Шундай қилиб, Ти-плазмида табиатан генларни бактериядан ўсимликларга кўчирувчи вектор ҳисобланади. Шу плазмида асосида векторли системалар конструкцияси (тузилмаси) ишлаб чиқилган. У турли генларни кўчиришга мослаштирилган.

Истикболли векторлардан бири – Агробактериум ризогененс асосида махсус генетик тузилма бўлиб, М.Ф.Шмякин шогирдлари билан турли хил организмга хос генлар таркибида ҳосил қилган. Ушбу тузилма инъексия ёли билан ўсимлик шоначасига юбориш ёли билан трансгенли ғўза навлари олинган (А.П.Ибрагимов). Ўсимлик генларни кўчиришининг яна бир усули ўсимлик тўқималарини инкубация қилишдир. Лекин генларни тўғридан – тўғри кўчириш усули ҳам бор. Галла ўсимликларида трансгенли шаклларни олишни макбул ёли протопластларни қўшиш ва шу асосда регенерация қилиб фертил ўсимлик олишдир.

1984 йил Д.Сенфорд., Е.Валф ва Н.Аллен Корнел университетида АКШда) генларни кўчиришни янги усулини – биолистика (биологик балластика) усулини ишлаб чиқди.

Махсус вакуумли қурилмада волфрам микро қисмлари (4 мкм) билан тамаки мозаика РНК вируси ўсимлик тўқималарини бузиб, хужайра ичига волфрам қисмлари билан кириб вирус бўлаклари кўпая боради.

АҚШда ушбу усулда фертилли соя ўсимлиги олинган. Биолистика ё'ли билан маккажўхори чангдонларини трансформация қилиш фертилл трансгенли маккажўхори олинган. Ушбу усулни афзаллиги трансгеноз агробактериосиз амалга оширилиб, каллус тўқималарни ҳосил кийиш, улардан регенерант олиш шарт емас.

Шунга кармасдан трансгенли формалар кўпроқ Ти плазмада орқали олинган. Яқинда АҚШнинг бир фирмасига Европа патент бюроси тамонидан генларни кўчириш бўйича биринчи патент берилган.

Австралияда ген инженерлиги ё'ли билан ё'нғичка ўсимлиги олинган, уни қоракўл кўйлари истеъмол қилганда жунларни ўсиши тезлашар экан. Ё'нғичка ДНК сига горохнинг олтингугурт сақловчи оқсил молекулаларини синтез қилувчи генларини кодлаштириш амалга оширилган. Бу туфайли йилига жун ишлаб чиқариш 5% га оширилган. Ушбу генлар себарга ўсимлигига ўтказиш бўйича тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Галла екинлари дон оқсил таркибидаги лизин треонин моддаларини кўпайтириши асосий муммолардан ҳисобланади. Ушбу муаммони ҳал қилишда генларни кимёвий синтез ё'ли билан алмаштириб бўлмайдиган аминокислоталарни сақловчи полипептидларни ҳосил қилиш. К.Джейнс шогирдлари билан 80% алмаштириб бўлмайдиган аминокислоталарни кодлаштрувчи ДНК фрагментини синтезлашга еришган. Агробактерия вектори ёрдами билан тамаки ўсимлигига ушбу ген юборилган. Регенирация туфайли ўсимликда сунъий оқсил моддаларини кўплиги қайд қилинган.

Ўсимликларда ширин таъм берувчи тамутин оқсил сақловчи ва уни кодловчи генлар ёрдамида меваларни истеъмол сифатини ошириш мумкин. АҚШда помидор резавор меваларни узоқ сақланишини белгиловчи полигалактуроноза ферменти фаолиятининг камайитириш ё'ли билан амалга оширилган. Агробактерия ёрдамида ген тузилмасини ўзгартириб полигалактуроноза ферменти камайитирилган. Бу помидор меваларни ҳам хомида териб олишни ва тез пишириш учун этилен била ишлашни олдини олади.

Ўсимликларда вирусли касалликларга бардошли навлар олиш ё'лга кўйилмоқда. И.Т.Атабеков в К.Т.Скрябин тамаки «Х» – вируси генини картошкага ўтказиб шу вирусга бардошли хусусият ҳосил қилинган.

АҚШда «Монсанто» фирмаси помидор ўсимлигига тамаки мозиака вирусларини сақловчи генларини ўтказиб, шу вирусга бардошли хусусият ҳосил қилган.

Зараркунандаларга бардошли ўсимликлар олишда кишлоқ хўжалик екинлари навлари зараркунандалари асосида олинади. Басиллус турингенсис бактерияси мавжуд бўлиб, у ўзига хос оқсил синтезлайди, қайсики ҳашорат озикланганда уни ҳалокатга олиб келади.

Ушбу бактерия асосида ҳашоратга бардошли АҚШда ғўза, тамаки, помидор навлари олинган. Хитойда кишлоқ хўжалик академиясининг биотехнология марказида ентомоцид гени бациллус турингенсис бактериясидан генларни кўчириш асосида трансгенли шоли, карам ўсимликлари олинган.

Ўсимликлар куёш энергиясидан келаётган ёруғлик тўлқинини 3 – 4 % гача қисмини ўзлаштиради. Фатосинтез жараёнини тезлаштириб ўсимлик маҳсулдорлигини ошириш мумкин. Маълумки, икки гуруҳ ўсимликлар бор. Улар СО₂ углеводлар (С₃) бирикма ва тур углерод (С₄) бирикма ҳосил қилади. С₄ гуруҳига оид ўсимликлар (маккажўхори, жўхори, лавлаги ва тропик ўсимликлар) да С₃ гуруҳига оид ўсимликларга (галла екинлари) нисбатан бир баробар фотосинтез фаоллиги юқоридир.

Фотосинтез жараёнининг оширишнинг асосий ё'ли РБК фотосинтез ферментини фаоллигини оширишдир. РБК ферменти фаоллиги С₄ гуруҳда С₃ гуруҳидаги ўсимликларга нисбатан 60 марта юқоридир. Лекин С₃ гуруҳидаги баъзи екинларда (кунгабоқар) фотосинтез РБК ферменти фаоллиги маккажўхоридан қолишмайди. Шу сабабли кунгабоқарда РБК ферментини бошқарадиган генларни С₃ гуруҳидаги бошқа ўсимликларга ўтказиш лозимлиги еҳтимолдан йироқ емас.

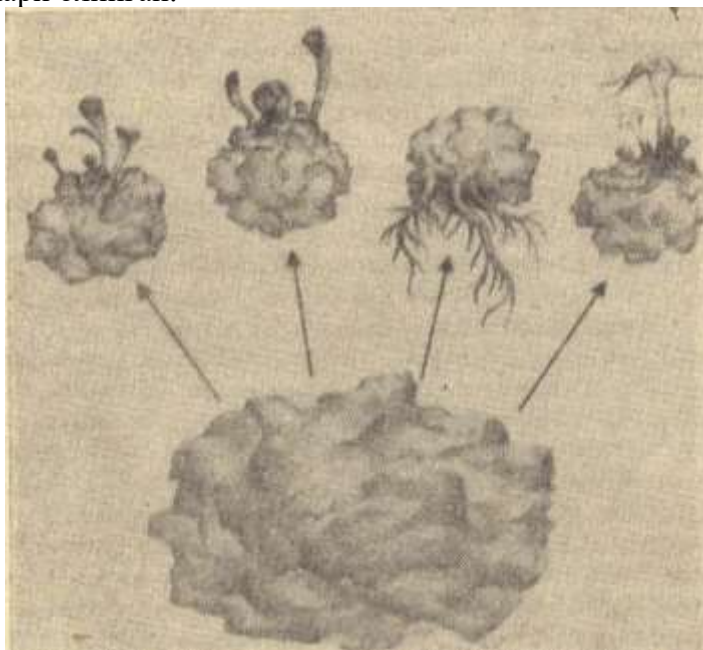
Ўсимлик қисмларини сувда узоқ вақтда сақлаш, ёки кўпайтириш мумкинлиги маълум. Ўсимлик хужайраларидан бир бутун ўсимлик олиш, бир неча бор кўпайтириш ҳозирги кунда олиб борилмоқда.

Ўсимлик хужайралари технологияси қуйидаги ё'налишларда олиб борилади:

1. Қимматли екин навлари банкини ташкил етиш ва сақлаш
2. Соғломлаштириш ва жадал кўпайтириш
3. Селексия жараёнини интенсификациялаш
4. Саноатлашган ҳолда қимматли озиқ – овқат, саноат учун, тиббиёт ва қишлоқ хўжалиги учун зарур препаратлар ишлаб чиқариш

Ўсимлик тўқималарини ўстириш дастлаб XX асрнинг бошларида помидор ва маккажўхори илдиз учки қисмларидан олиб етиштирилган. 1960-1970 йилларда англиялик олим Кокинг изоляцияланган протопластлар қобиғи олинган хужайрани ўстириб нормал хужайра ҳосил қилган. 1960 йил сунъий муҳитда ўсимлик хужайраларини кенг қамровли ишлаб чиқариш технологияси ишлаб чиқилган.

Ҳозирги кунда кўпчилик ўсимлик тўқималаридан бутун ўсимлик олиш ё‘лга қўйилган. Тўқима хужайраларидан регенерасия қилиб маккажўхори, шоли, тарик, жўхори, буғдой, картошка, сабзи, кейинги йилларда еса ўсимлик тўқималарини ўстириш ё‘ли билан ғўза, соя, галла екин навлари олинган.



22-расм. Хужайра културасида морфогенез типлари

Ўсимлик тўқималарини асосий тип каллус бўлиб, тўлиқ шаклланмаган тўқима ҳисобланади. Каллус тўқима ўсимлик учки нукталаридан, эркин кўпаявчи хужайраларидан олиниб махсус озиқа муҳитда 100% стрелизация шароитида ўстирилади.

Каллус тўқима ҳосил қилиш ва улардан бутун ўсимлик ўстириш технологияси картошкада яхши ўрганилган. Бунда ўсув нукталардан олинган апикал меристема хужайралари махсус озуқа муҳитда (Мурасега – Скуга) қўйилганда, муҳит 27 – 28°C да, суткада 16 соат ёруғлик давомийлигида ва намлик 80 – 85% бўлса 12 – 14 кунда каллус тўқима ҳосил бўлади ва у озиқаси етарли тўйинтирилган муҳитга ўтказилса 12 – 13 кунда 8 – 10 см ниҳол олинади. Олинган ўсимлик ниҳолларини (ёки каллус тўқимани) 4 – 5 мартача барг банди билан регенерация қилиш етарли миқдорда ўсимлик ниҳол сонига ега бўлади. Ўсимликлар опикал меристема хужайраларидан ўстирилганда уларда вирусли, бактериал, замбуруғ касалликлардан холи бўлади ва ўсимлик маҳсулдорлиги одатдаги (уруғдан, туганакдан) усулда ўстирилган ўсимликларга нисбатан юқори бўлади.

Россияда биринчи бўлиб микроклонлаштириш ва микротуганаклар етиштириш технологияси Россия қишлоқ хўжалиги беотехнологияси институтида О.С.Мелик–Саркисов ва шогирдлари томонидан ишлаб чиқилган. Пробиркада микротуганак етиштиришдан самарали усул каллус тўқималарни регенерация қилиб озиқа муҳитида 1м² да 1500- 7000 донага микротуганак етиштириш технологияси ишлаб чиқилган. Ушбу усул сифатли

уруғлик олиш, ўсимлик генофондини сақлаш, трансгенли ўсимликларни жадал кўпайтириш имконини беради.

Ҳужайра технологияси йил давомида узлуксиз олиб борилади ва кўпчилик екинларда соғломлаштириш ва елита уруғларини етиштириб беради.

Биотехнологияда гаплоид тўқималар - ўсимликда рецессив ҳолатда генларни аниқлашда ва ўсимлик геномига кўчирилган бегона генларни ўрганишда аҳамиятга эга.

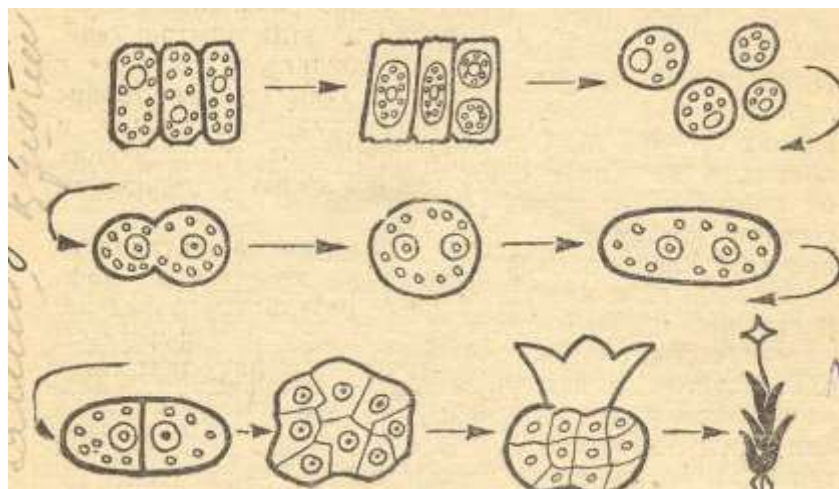
Гаплоид хромосомали тўқималарни хромосомасини ошириб фертилли (диплоид) қилиш гомозиготали қимматли формалар олинади. Протопластларни қўшиш ё'ли билан гаплоидлар биргаликда (иккита) регенерация қилиш селекция учун диплоидлар қимматли дастлабки материал бўлади.

9-жадвал

**Ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраларини ўстириш учун
озуқа муҳитлар таркиби**

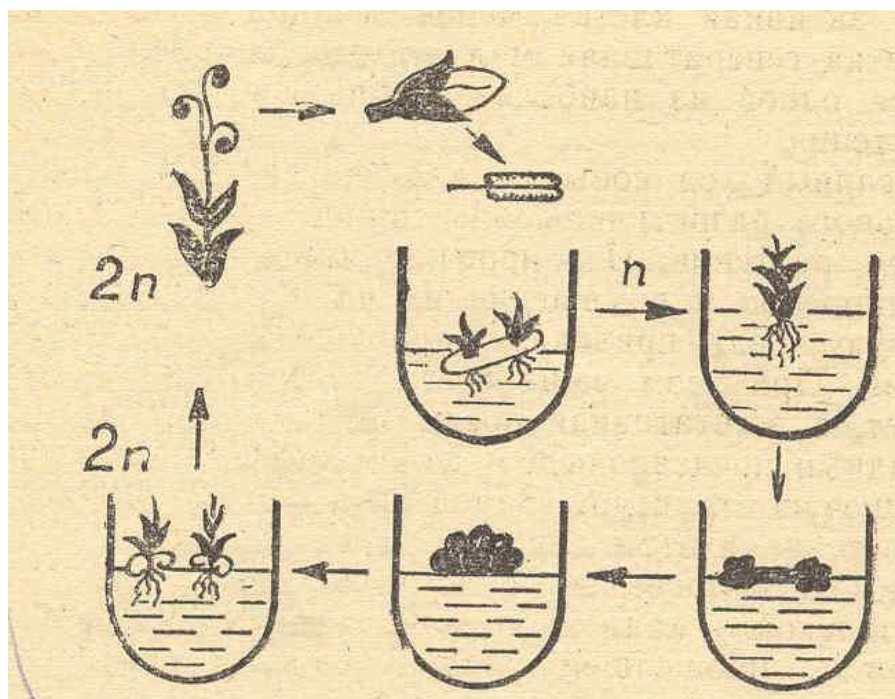
Гамборга озуқа муҳити, ўсимликлар учун		Ваймура озуқа муҳити ҳайвон ҳужайралари учун	
Компонентлар	мг/л	Компонентлар	мг/л
Минерал тузлар			
КНО ₃	2500	НаСл	6000
НаХ ₂ ПО ₄ · Х ₂ О	150	КСл	150
(НХ ₄) ₂ СО ₄	134	СаСл ₂ · 2Х ₂ О	120
МгСО ₄ · 7Х ₂ О	250	МнСл ₂ · 6Х ₂ О	240
СаСл ₂ · 2Х ₂ О	150	МгСО ₄ · 7Х ₂ О	200
Фе-ситрат	3,5	На ₂ ХПО ₄	300
МнСО ₄ · Х ₂ О	10	КХ ₂ ПО ₄	80
Х ₃ БО ₃	3	НаХСО ₃	2240
ЗнСО ₄ · 7Х ₂ О	3	ФеСО ₄ · 5Х ₂ О	0,26
На ₂ МоО ₄ · 2Х ₂ О	0,25	СуСО ₄ · 5Х ₂ О	0,25
СуСО ₄ · 5Х ₂ О	0,25	МнСО ₄ · Х ₂ О	0,08
СоСл ₂ · 6Х ₂ О	0,25	(НХ ₄) ₆ Мо ₇ О ₂₄ · 4Х ₂ О	0,12
КХ ₂ ПО ₄	0,75	ЗнСО ₄	0,15
Органик моддалар			
Сахароза	30000	Глюкоза	5000
α-нафтилуксус кислота	0,1-1	Аскорбин кислота	17,5
Кинетин	0,01-0,5	Систеин- ХСл	90
		Глютатион	15
		Гипоксантин	25
		Холин- ХСл	250
		Инсулин	8
		Тиамин- ХСл	10
		Са-пантотенат	10
		Рибофлавин	10
		Пиродиксин ХСл	10
		Мезо-инозит · 2Х ₂ О	10
		Никотинамид	10
		Витамин В ₁₂	0,2

		Фолиевая кислота	0,4
		Биотин	0,02
		20 та аминокислота аралашмаси	



23-расм. Изоляцияланган протопластларни олиш, қўшиш ва ўзгартириш

Гаплоидли каллус тўқималар еркак (микроспара) ва ургочи (микропора) жинсий хужайралардан ўстирилади, яъни чангдон ёки муртак халтаси озиқа муҳитларда ўстирилади. Гаплоидларни олишнинг қулай усули чангдонларни ўстиришдир. Бу усул билан томатдошлар, бошққдошлар, карамгуллилар оиласига мансуб ўсимлик гаплоидлари олинган. Хитойда шоли ва бугдойни бир неча навлари гаплоидлари, дигоплоидлар олиш асосида яратилган ва екилиб келинмоқда. Украинада арпанинг Одесса нави яратилган.



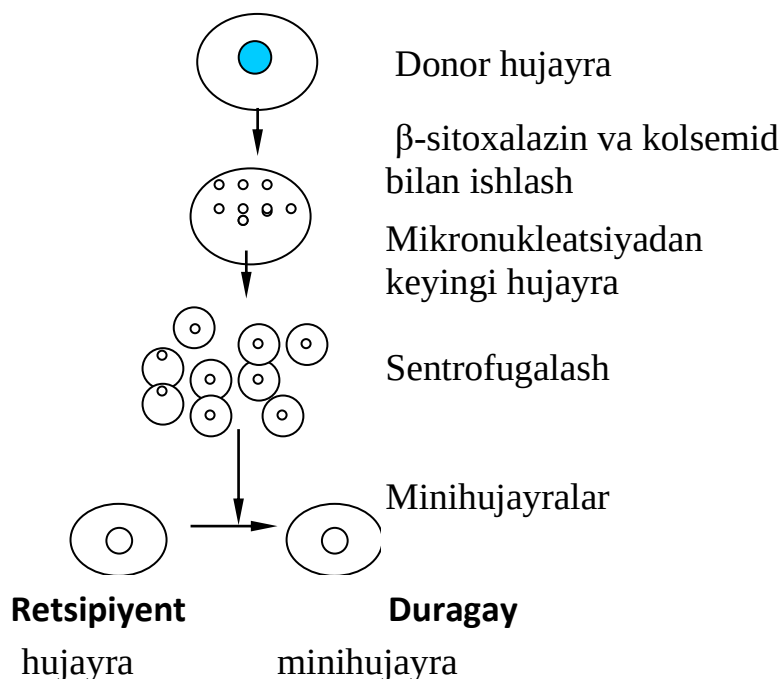
24-расм. Ёш чангдон тўқимасидаги эмбриогенез

Соматик тўқималарни дурагайлаш. Хужайра инженерлиги билан соматик тўқималарни дурагайлаш – турли турларга, навларга хос ўсимлик хужайраларни протопластларни қўшилиши тушунилади. Ушбу ё‘л билан икки ёки ундан ортиқ организм геноми (генлари) бирикиши тўлиқ комбинацияси кузатилади.

Протопластларни электрофортик усул билан кушиб ўстириш ва сунъий муҳитда регенерация туфайли ҳар хил турлар ядроли, хлоропластли ва митохондрияли ДНКларни комбинация билан тўлиқ ўсимлик олинади.

Тана хужайраларни дурагайлашда уларни қўшилиб нормал ўсишини таъминлаш учун Харрис ва Окадалар ишлаб чиққан «Сендай» вирусида фойдаланилади.

Протопластларни қўшиш ё‘ли билан картошка ва помидор дурагайи ҳосил қилинган ва помидор деб ном берилган. Дурагай ота – она формаларни хусусиятларни ўзида сақлаган. Дурагай меваси ёввойи итузум мевасидан йирикроқ, туганаги еса резавор мева катталигича бўлган.



25-расм. Генларни минихужайра орқали кўчириш

АҚШда протопластларни қўшиш билан соматик дурагайлар олинган. Дурагай маданий картошка билан ёввойи С. Бревиденс асосида ҳосил қилинган.

Дурагай касаликларга чидамли бўлиб туганак ҳосил қилмаган. Шундан сўнг, маданий навлар билан бир, икки чатиштириш ўтказилганда нормал туганак ҳосил қилувчи навлар яратилган.

Соматик хужайраларни дурагайлашнинг яна бир аҳамиятли томони, ижобий хусусиятга ега, хужайра қисмлари протопластларга қўшилади. Масалан митохондрия маккажўхорида стерилликни бошқаради. Хлоропластли ДНК ларда генлар тузилмасини ўзгартириш гербицидларга бардошлиликни бошқаради. Бу қарам, картошка ва тамаки ўсимликларида амалга оширилган. Японияда картошка ва ёввойи тоmat асосида қурғоқчиликка ва вилтга чидамли картошка нави олинган.

Биотехнологиянинг асосий юналишлардан бири регуляторлардан фойдаланишдир. Бу кенг қамровли табиий ва органик синтетик бирикмалар кам микдорда ишлатилганда ўсимликларда моддалар алмашинувининг, хужайралар фаолиятини тезлаштириб, ўсиш, ривожланишга тасир қилади.

Табиий регуляторлардан тарқалган фитогармонлар бўлиб, ўсимликлардан олинган моддалар ҳисобланади ва ҳаётий жараёнларни тезлаштиради.

Ҳозирги кунда 5000дан ортиқ регуляторлар синтез қилинган бўлса, шулардан 1% гина ишлаб чиқаришда ишлатилади. Регуляторлар ўсимлик ёки микроорганизмлар асосида олинганлари эндогенли деб ҳам юртилади.

Фитогармонлар кам миқдорда ишлатилганда ҳам ўсимликларда физиологик жараёнлар (хужайраларни бўлиниши, ўсиши тиним даврини бузиш, барглар оғизчаларни очиш, курук модда тўпланишини кучайтириш ва х.к) бошқарилади.

Ўсимлик, ҳайвонларда гармонлар одатда 2 гуруҳга ажратилади:

1. Терпеноидлар – мевалонот асосида ишлаб чиқиладиган- гиббереллин к-т, бросихлар, фузикаксин, ситокинен.

2. Аминокислоталар асосида ишлаб чиқиладиган ауксинлар, этилин.

Гиббериллин – ўсимликларда жадал ўсишини, тиним даврини бузишини, катта биомасса ҳосил қилишни, гуллаш интенсивлигини, партенокарпик мева ҳосил қилишни таъминлайди.

Ситокинин – хужайраларни ўсишини тезлатади, қаришни олдини олади, генератив органларни шаклланишини таъминлайди.

Фитогармонлардан ташқари синтетик регуляторлар – ретордонтлар ҳам мавжуд. Улар фитогармонларга ўхшамасада ўсимликлар гармонал системасига таъсир қилади. Улар ўсишни тўхтатиш, секинлаштириш бақувват ўсимлик ниҳоллари олишда ишлатилади. С.Петербург қишлоқ хўжалик микробиология ва Москва қишлоқ хўжалик биотехнология институти олимлари Карбит колсия тавсия қилинган. Улар тупроққа солинганда ацителенга ажралади ва тупроқ микроорганизмлари фаолиятини кучайиб нитрогеназа ферменти таъсирида этилен ҳосил бўлади, қайсики ўсимлик илдиз орқали қабул қилади.

Ишлаб чиқаришда кенг қўлланиладиган регуляторлардан гиббереллин (узумчиликда, сабзавот, гулчиликда) ИУК (индолилуксусная кислота) сунъий муҳитда хужайралардан ўстиришда қўлланилади, ИУК ауксин регуляторлар гуруҳига оид бўлиб, хужайраларни тўлиқ шаклланишида ён новда, шох, илдиз шакллантиришда фойдаланилади. Ауксин ўсиш нуқтани тўхтатиб, ён новларни, илдизини кучайтиради.

Синтетик регуляторлардан бири – ГМК гидрозид маленовой кислота – картошка, лавлаги ўсимликларга ҳосил йиғиш олдидан палакка пуркалади ва ҳосилни узоқ сақланишини таъминлайди.

ГМК – тамакичиликда, лавлаги уруғчилигида палакка ер устки қисмга пуркалади ва ўсиш нуқтасини тўхтади, натижада ён навдалар барглар ривожини жадаллаштиради.

Хужайра биотехнологияси - хужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Хужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир узгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмдан ташқирда яшаши ва кўпайиши учун шароит тугдириб бериш лозим. Ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда (*ин vitro*) ўстириш, усули ажратилган тўқималар култураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли, катта аҳамият касб етди.

Биотехнология узоқ - узоқлардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида утган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният энг аввало узи учун ута зарур бўлган яъни озик-овқат, энергетика, захира (ресурс), атроф - муҳитни муҳофазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон тўқималари, хужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида ётибор берилмоқда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқд технологияларга нисбатан бир қатор устунликка егалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к Шунинг билан бир қаторда, биотехнология стандарт жихрзлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иқлим шароитига қарамадан ҳамда кўп майдон егалламаган ҳолда жараёнларни йил буйи утказишга

асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни ҳужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги ролини уч юналишда куриш мумкин:

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соҳалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, эфир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боғлиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар каттиқ (агарли) ёки суюқ озуқа муҳитида ўстирилган каллус туқималардан олинади. Ҳужайра технологияси асосида диосгенин - диоскоре уужайрасидан; аймолин - илон рацвольфи уужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар - женьшен хужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг билан бирга олиш керакки, ўстириладиган ҳужайраларни ҳосилдорлиги, бутун ўсимликни ҳосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти булмаган шароитда (совуқ ёки иссиқ иқлимли минтакаларда), уларни ҳужайраларини бутун йил мабойинида устриши мумкин.

Иккинчи йўналиш - ажратиб олинган ҳужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва шу орсали тез ривожланувчи, хор хил таъсири муҳит таъсирига чидамли (иссиқса, совуқса, шурланишга, оғир металлларга, кургоқчиликка, касалликка ва х.к.) ўсимликлар яратиш. Шунинг билан бирга бу юналиш, ажратилган протопластларни қўшилиши орсали янги ўсимликлар яратиш ҳамда ножинсий (сомотик) гибридлар олишни ҳам уз ичига олади. Ажратиб олинган протопластларга ген муҳандислиги методлари ёрдамида бегона генларни киритилиши, кейинчалик янги, мерос соладиган хоссаларга ега бўлган ўсимлик яратишга ҳам олиб келади. Ажратиб олинган чангдон ва уруғ куртакни сунъий Озиқа муҳитида ўстириш, гаплоидлар, олиш имконини берса, муртакларни ўстириш - усаолмайдиган (ендоспермаси ёмон ривожланган) ўсимликлардан гибрид уруғларетиштириш имконини беради.

Учинчи йўналиш - ажратиб олинган туқималарни кўпайтириш ва екув материалларини вируслар ва бошқа патогенлардан соғломлаштириш маъсадида ишлатиш. Бу усул, ўсимликларни клонал микрокўпайтириш дейилади ва битта медистемадан йилига юз минглаб ўсимлик олиш имконини беради.

Ҳужайра ва тўқималар култураларини ишлатишдаги натижалар биринчи навбатда ҳужайраларни бўлиниши, уларни табакдланиши ва улардан ўсимлик ўсиб чиқишини белгиловчи, физиологик жараёнларни оптимизациясига боғлиқ. Энг мураккаб томон бу алоҳида ҳужайрадан ўсимлик регенерация қилиш. Биринчи навбатда бу бошқоқли ўсимликларга тегишли. Шунинг учун ҳам ин витро шароитда морфогенез регенерация ва уларни асосида ётган жараёнларни механизмларини аниқлаш, энг муҳим аҳдмиятга егадир.

Ўсимликлардан ажратиб олинган тўқималарни ўстиришга ҳаракат анча узоклардан маълум. Бу методни ривожланиш тарихини бир неча босқичларга бўлиб ўрганиш мумкин:

- > **1-босқич (1892 — 1902 йиллар)** — Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер каби немис олимларини номлари билан боғлиқ. Улар саҳароза еритмасида хор хил ўсимликлар тўқималарини ўстиришга уриниб куришган, аммо ўсимликларни ўсиши кузатилмаган. Фацатгина соқи утини ва тол дарахтини пояларини сигментлари учун бирламчи каллус олинган ва каллусгенезга айланиши мумкин бўлган сегментин энг кичик размери аниқланган. Экспериментал муваффақиятларга етаолмасдан бу олимлар катор гоё ва гипотезалар яратганлар. Бу гоё ва гипотезалар анча кечироқ уз тасдиқини топган. Масалан, Харерландт хор кандай тирик ўсимлик ҳужайрасини тотипотентлиги яъни ҳужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенсиалини

намоён силиши ва бутун ўсимлик ҳосил булишига бошлаши ҳақида гипотеза ёллон қилган еди.

- > **II-боссич (1902-1922 йиллар)** - хайвон тўқималарини ўстириши учун биринчи Озиқа муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу Озиқа муҳитлари табиий бўлиб, таркибида кон плазмаси (сонни суюқ сисми) ва куртак суюклиги саклаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстрактлари саклаган сунъий Озиқа муҳитида ўстириб куриши мувоффақиятиз чицкан, чунки экспериментларда юксак ўсимликларни ўсиши фаоллигини намоён қилишига туғри келмайдиган ҳужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.
- > **III-боссич (1922 — 1932 йиллар).** Бу даврда бир-бирлари билан боглиц булмаган холда Америкалик олим В.Робине ва немис олими Котте саттиц Озиқа муҳитида помидори ва маккажухори илдизи учидаги меристемаларни ўстириши мумкин еканлигини намойиши қилганлар. Аммо, маълум вақт утгач, ўсимлик тўқималари кунгир рангга кириб, халок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириши методи ривожланиши - 1932 йилдан бошланган.
- > **IV-боссич (1932 — 1940 йиллар), франсуз олими Р.Готре номи билан боглиц.** У, ин витро шароитида ўсимлик туқималарини вацти- вацти билан тоза озуца муҳитига кучириб туриши оркали узоқ вацт ўстириши мумкинлигини намойиши силган. Бу янгилик тўқималар технологиясини ривожланишига катта хисса кушиди ва ўстиришига куйиладиган ўсимликлар сони жуда хам кпайди.
- > **V-боссич (1940 — 1960 йиллар).** 1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон - ситокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) ҳужайраларни бўлинишини кучайтириши имконини яратади. Ўсишини кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, експлант ҳужайрасини бўлинишини кучайтириши, каллус тўқималарни ўсишини мухохаза қилиши, морфогенезни мндуцироват қилиши мумкин еканлиги намойиши етилди. Шу даврда какое ёнгогини, каштан, маккажухори ва бошка ўсимликлар ендоспермаларини ҳужайрани ўсиши, моргенез жсараёнлари (каллус туцима ва ҳужайра суспензиясида)га ижобий таъсир курсатиши аниқлашган.
- > **VI-боссич (1960 — 1975 йиллар).** Бу даврни енг мухим воцеаси Ноттинген университети профессорши Э.К.Коккинг томонидан ферментатив йўл билан помидорини илдизи ва мевасидан протопластлар олиниши ва уларни назорат қилиниб турилган шароитда ўстирилганлиги бўлган. Кейинроқ шу лабораторияда Пауер ўзини шогирдлари билан протопластларни сунъий қўшилиши шароитларини яратишган. Бу еса, соматик гибридар яратишида янги йўл бўлиб хизмат қилган. Уша даврда яратилган яна бир усул - бу ўсимликларни ин витро шароитида меристин культуралар ишлатиб микро кўпайтиришидир. Дастлаб бу усул франсуз олими Ж.Морел томонидан орхидей усимлигини соглом кучатини олиши мацеадида яратилган.
- > **VII-боссич — (1975 йилдан ҳозирги вацтгача).** Ин витро техникасини жадаллик билан ривожланиши ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиши давом етмоцда ажратилган протопластларни електро совуштириши усуллари ишлаб чиқилди, мутагенез ва ҳужайра селекцияси усуллари, гаплогидли ўсимликлар яратиши усуллари, ҳужайраларни ажратилган протопластлар ва Ti ва Ri Агробактериум тумефациенс ва Агробактериум рҳизогенес асосида тайёрланган Ti ва Ri плазмид векторларни ишлатиб суюкликда ўстириши усуллари мукаммаллаштирилмокда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кучириб утказишини самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай килиб, охирги йилларда ажратиб олинган ўсимлик ҳужайралари ва тўқималари билан ишлаш техникаси такомилаштирилди. Аммо, бу ишларда асосий манба бўлиб, бир паллали ва икки паллали утлик ўсимликлар хизмат қилган. Дарахтларни ўрганиш бўйича олиб борилган ишлар унчалик кўп емас.

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашни асосий шarti - стерилликга қатъий риоя қилишдир. Таркиби бой бўлган озуқа муҳити микроорганизмларни ривожланиши учун ҳам жуда яхши субстрат ҳисобланади, ўсимликлардан ажратиб олинган фрагментлар (эксплантлар) озуқа муҳити билан аралаштирилганда микроорганизмлар таъсирига тез учрайдилар. Шунинг учун ҳам екслантни ҳам, озуқа муҳитини ҳам стерилизация қилиш керак. Ажратилган хужайралар ва тўқималар билан қилинадиган барча нозик ишлар (манипуляция) асептик шароитда (ламинар-боксларда) стерилланган ускуналар ёрдамида бажарилади. Ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақдаш керак айниқса ҳарорат ва намлик узгарганда, чунки пробиркаларни пахта-бинтдан тайёрланган тикинчалари намланади ва ундан микроорганизмлар осон утишади.

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек уруғлар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи еритмада ушлаб туриш, кейин еса стерил сув билан юйиб ташлаш орқали амалга оширилади. Стерилизация даври експлантни характериға ҳамда еритмани стерилизация қилиш хусусиятиға боғлиқ Одатда уруғ 10-20 мин, вегетатив қисмлар еса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи еритмаларға мисоллар 3.1-жадвалда курсатилган.

Эксплант олинмокчи бўлган ўсимлик органи, дастлаб совунли сув билан шеткалар ёрдамида яхшилаб ювилади ва дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин еса бир неча секунд давомида 70 % ли этанолға ботириб олинади. Уруғлар спиртда 1-2 мин. ушлаб турилади. ТЎҚИМАларға спирт билан ишлов бериш, уни стерилизация қилиш хоссасидан ташқдри, асосий стерилизация қилувчи еритмани таъсирини кучайтириши билан ҳам боғлиқ.

Стерилизация кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб юйиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация експлантни фақат ташки инфекциядан озод қилади. Агар експлант тўқималари ички инфекцияға еға булсалар, уларға антибиотиклар билан ишлов беришға тугри келади. Айниқса ички инфекцияға йирик томирли тропик ва субтропик ўсимликлар бой булишади. Култураларни замбуруғлар ёки бактериялар билан ифлосланиши еқилгандан 1-14 кун утганда кузға ташланади. Ёруғлик хонасидаги хавони ифлосланишдан сақлаш учун, ифлосланган културани дархрл юкртиш керак.

Озуқа мхитларини автокльда, 120 С да 0.75 - 1,0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация қилинади. Агар озуқа муҳити таркибига юқори ҳароратда парчаланадиган моддалар кирса, уларни алоҳида совуқ стерилизация қилинди. Уларни тешиқлар диаметри 0,22 - 0,45 мкм, бўлган бактериал филтрлардан утказилади ва автоклавдан чикдан Озиқа муҳитини 40 С гача совутиб, кейин уларни аралаштирилади. Олдиндан фолгача ёки урайдиган кргозға уралган идишларни куруқ иссиқ билан, курутгич шкафларида 160 С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган Озиқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроелементлар (азот, фосфор, калий, калсий, магний, олтингугурт ва бошқалар) ва микроэлементлар (бор, марганец, руҳ мис, молибден ва бошқалар) ҳамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини сақлаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казеин гидролизоти, ЭДТА (етилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни хужайра киришиға ёрдам беради) ва бошқд керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озикд муҳитиға кокос ёнгогини (какое сути), каштан дарахтини ендоспермасини кушилади. Карбон сувлар озуқа учун енг керакли компопенентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни автотроф озикланишға курблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпрок 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза еритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар хужайраларни табакдланиши (дедифференсировки) ва хужайра бўлинишини кучайтириш (индуксия) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (хужайра

бўлинишини кучайтирувчи) булиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар микдорини камайтириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сакламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «урганган» тўқималар усади. Хдр икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик бу хужайраларни узларини гормон синтезқилиш хусусияти билан боглик

Ауксин манбаи сифатида озуқа муҳитига 2,4-дихлорфенокси сирка кислота (2,4-Д), индолил-3-сирка кислота (ИУК), Л-нафтил сирка кислота (НУК) кушилади. Яхши усувчи каллус олиш учун кўпроқ 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки ИУК 2,4-Д га нисбатан 30 маротаба кучсиздир.

Сунъий озуқа муҳитига қўшиш учун, ситокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопури (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажратилган тўқималарни ўсишига оргоногенезни индукциясига кинетинга нисбатан фаолроқ таъсир кўрсатади. Баъзи бир Озиқа муҳитлар таркибига аденин ҳам кушилади.

Ҳозирги пайтда жуда кўп сонли озуқа муҳитларни таркиби аниқ бўлсада, ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини *ин vitro* шароитида ўстириш учун Т.Мурасига ва Ф.Скуга муҳитлари ишлатилади. Бу муҳитни таркиби биринчи марорта 1962 йилда еълон қилинган ва у жуда яхши балансланган озуқа моддалари таркибига ега ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ килади.

Қаттиқ Озиқа муҳит тайёрлаш учун агар-аграр ишлатилади. Агар-агар денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, махрова микроелментлар еритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар куюкрок килиб тайёрланади ва совуқ шароитда сакланади ҳамда керак бўлганда суйўлтирилиб ишлатилади.

Ўстириш шароити

Ўсимликлардан ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни яхши ўстириш учун, ўстиришни маълум шартларига роия қилиш кера. Кўпчилик каллус тўқималари ёругликга ехтиёжи юк чунки уларни хлоропластлари булмасдан, гетероторф озикланадилр. Баъзи -бир яшил рангдаги каллус тўқималар бундан мустасно. Баъзи бир ҳолатларда каллус тўқималар автотроф озикланишига кобилиятли емас, буларни доимий ёруглик шароитида ўстирилади, бу еса мувоффақиятли морфогенез учун мажбурий шароитдир кўпрок каллус тўқималар коронгиликка олинади.

Морфогенезга аниқланган (детерминировануе) тўқималар ёругликга утказилиб, кейин 1000-4000 лк ёругликда ўстирилади. Ажратиб олинган меристемлар ва уларни микрокўпайтириш ҳам ёругликда утади. Ёруг уйчани ёруглиги 1000 - 10000 лк булиши керак ва ёругликни кучи ўсимликни хусусиятларига боглик. Устриладиган объектни фото даврини ҳам хисобга олиш керак.

Ўстириладиган хонада намлик 60-70 % булиши керак. Ундан курукроқ хаво озикд муҳитини куришиб юборади, агар пробирка пахтали тикин билан бектилган булса, Озиқа моддаларни концентрацияси узгашиб, ўстириш шароити бузилади.

Кўпчилик тўқималарни ўстириш учун оптимал ҳарорат 25-26 С Агар тропик ўсимликларни тўқималари булса 29-30 С да ўстирилади. Морфогенез индукция қилинганда ҳарорат 18-20 С гача туширилади. Одатда климатик камералардан фойдаланилади.

Ажратилган тўқималар култураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуа кам ҳолатда) тўқима булиши мумкин. Каллусли култура табакдлашмаган (дедифференсированнуй) хужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига

ихтисослашади, яъни узига хос равишда табакалашади. Каллус дегани кадоқ (котиб колган) деган маънони англатиб, ин витро шароитида алохида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо булиши мумкин.

Ин витро шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сарикроғ жуда хм кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус ҳужайралар кдриганда, туқ кунгир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тупланиши билан боглиқ Вақт утиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан кутулиш мақсида озуқа муҳитига антиоксидантлар кушилади.

Каллус тўқималар аморф бўлиб, маълум бир анатомик тузилишга ега еамслар, аммо келиб - чиқиши ва ўстириш шароитига кдраб, ҳар хил консистенсияга (суёқ - куюк ва х.) ега бўладилар:

- > **Биринчи** - уваланиб кетадиган пук ҳолатда кичик агрегатларга енгил майдаланиб кетадиган, кўпли сувланган ҳужайралар;
- > **Иккинчи** — урта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемали учокдар;
- > **Учинчи** — зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик путлоги тагидаги булинувчан ҳужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табакаланишган (дифференсация) ҳолатда учрайди.

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч босқичда утади:

- > **Бўлиниш;**
- > **Чўзилиш;**
- > **табақаланиши (дифференсировка).**

Охирги босқични (фазани) ҳарактерли томони ҳужайрани иккиламчи кобигини калинлашуви ва ҳужайрани булинишга бўлган кобилиятини юкотишидир. Дифференсацияга учраган ҳужайралар яна кайтадан булиниш кобилиятига ега булиши учун, уларни дедифференсировка булиши шарт, яъни ҳужайра худди меристема ҳолатига кдйтиши керак. Табакдланган ҳужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва окибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай килиб, ихтисослашган ҳужайраларни каллус тўқималарга айланиши ҳужайра бўлинишини кучайтириш билан боглиқ бўлиб, табакаланиш жараёнида, ҳужайра булиниш кобилиятини юкотади.

Озуқа муҳити таркибида ситокининларни булмаслиги тамаки усимлигини узак кдтлами паренхимасида ҳужайра сиклини тўсиб куяди. Шунинг учун ҳам агар озуқа муҳити таркибида фақатгина ауксин булса, ҳужайра булинмайди ва турт кунлик даврдан кейин чузилиб, ўсишга утади.

Ауксинларсиз, фақат ситокининларни узлари ҳам гормон сакдамаган озуқа муҳитига ухшаб, ўсимликни кдришига олиб келади. Тамаки усимлиги мисолида келтирилган далиллар бирта гормон сакдаган Озиқа муҳитида каллусли тўқима ҳосил булишини барчасини тушунтира олмайди. Бунга зид бўлган мисоллар ҳам бор.

Масалан, бугдойни етилмаган куртакларида ситокининсиз 2,4-Д саклаган Озиқада каллус ҳосил булиши ёки кунгабокарни уруг палласида ситокинин саклаган ауксин сакдамаган Озиқада каллус ҳосил булиши ва х.к. Кузатиладигн натижалар кўпроқ ендоген гормонларга, аникроги у ёки бу експлантни ҳужайрасида сакланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статусей билан боглиқ еканлиги исботланган.

Баъзи бир олимларни фикрларича, ҳужайрани бўлинишини ауксин ёки ситокинин емас, балки полисахаридлар ва бошкд қандайдир индукторлар чакириши ва каллус ҳосил булишига олиб келиши мумкин.

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга утиш жараёни ҳужайра бўлинишини тухташи билан бошланади. Лаг - фаза 24-28 соат давом етади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез булиниб, каллус

тўқима ҳосил килади. Шундай қилиб, агар ихтисослашган хужайраларни дедифференсацияси фитогармонлар таъсирида булинишни кучайиши (индукцияси) билан боғлиқ бўлса, булинадиган меристемали хужайраларни дедифференсацияси бўлинишини тухташ билан хужайрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил бўлишига олиб келувчи булинишни кучайиши билан боғлиқ.

Бир фитогормонни таъсир самараси, нишон тўқимани физиологик тавсифига кдраб ҳар хил булиши мумкин.

Хужайрани *ин vitro* шароитида дифференциалланган ҳолатдан дидифференциалланган ҳолатга ва хужайрани фаол булинишга утиши, генларни фаоллигини узгаРиши билан бошланади. (Эпигеномни узгаРувчанлик)- Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши хужайрадаги оксил таркибини узгаришига олиб келади. Каллусли хужайраларда узига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг узида баргнинг фотосинтез килувчи хужайраларида Оксиллар мивдори пасаяди. Икки паллалли ўсимликларда дидифференциалланган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон утади.

Дедифференциалланган хужайраларни каллус тўқималар ҳосил бўлишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга утиши билан биокимёвий ва ситологик узгаришлар содир бўлади. Захирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган хужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференциалланиш бошланади. Дедифференсияни индукциясидан 6-12 соат утгандан кейин хужайра қобиғи ғоваклашиб шишади, мустақил рибосомалар сони кўпайиб, Голджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу узгаришлар булинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга қуйишдан олдин, експлантлар хужайрасининг метаболизмида узгаришлар содир бўлишини, у еса дедифференсия ёки травматик синтез билан боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб қуйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида експлантларни гормонлар сакламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия етилади.

Каллусли хужайра ўзини ривожланиш циклига ега бўлиб, ҳар қандай хужайрани ривожланишини кдйтаради: булиниш, чузилиш ва дифференсия ва ундан кейин кдриш ва хужайрани улиш даври. Каллусли дифференсияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи хужайраларни иккиламчи дифференсияси билан аралаштириб юбормаслик керак.

Каллус хужайралари нобуд бўлиб қолмаслиги учун уларнинг булинишга бўлган қобилятларини юкотмасликлари учун, експлантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига утказиб турилади. Бу операцияни - пассирлаш деб аталади. Уз вақтида бу жараён утказиб турилса, каллус хужайралари ун йиллаб уз булини хусусиятини юкотмаслиги мумкин.

Каллус хужайраларни ўсиш чизиги 3.2-расмдан куришиб турибдики, С- симон шаклга ега, ўсиши беш фаздан иборат:

- > **1—латент ёки лаг-фаза** даврида хужайра сони ёки оғирлиги узгармайди. Хужайралар бу даврда булинишга тайёргарлик курадилар.
- > **2-фаза логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси** енг кўп митодик фаоллик билан ва каллус културани массасини ошиши билан шунда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан ҳарактерланади.
- > **3-фаза тугри чизикли (линейка)**, бунда хужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.
- > **4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади**, бу босқичда хужайрани митотетик фаоллиги кескин пасаяди.
- > **5-фаза ўсиш чизиги (стационар) бир текис ҳолатга келади**. Бу даврда хужайралар парчаланади, аммо хужайра сонини ошиши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, хужайра массасини кутарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин хужайраларни деградацияси бошланади ва бу даврда тирик хужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.

Каллусли хужайраларни ўзига хослиги

Ин vitro шароитида каллусли хужайралар ўсимликлар организмидagi оддий хужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва биокимёвий хусусиятларни сакдаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилятини юқотмайдилар. Совуқда чидамлилиқ хусусияти каллусли хужайраларда, ўсимликлардагидек қайтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда бўлмайди. Каллусли тўқималарга фотодаврийлик реакцияси ҳам хос, бу фитохрон фаоллигини сакдаб қолinganлиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори ҳароратга чидамлилиқ осмотик фаол моддаларга, шурланишга чидамлилиқ ва ҳ.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик сўсиллар пайдо бўлади ва умумий оксил микдори, хусусан баргга фотосинтез жараёнида қатнашадиган оксиллар камаяди ёки бутунлай юқради. Каллусли хужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронлиқни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли. Каллусли хужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда утади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабиниинг каллусли хужайраси, янги озуқа муҳитига утқазиб туриш ҳисобидан ҳазиргача яшаб келмоқда.

Очиқ тупрокда усувчи ўсимликга нисбатан, каллусли хужайраларни хужайра сикли узунрокдир.

Каллусли хужайра ўзига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини ҳар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш хужайралар (Г- фазадаги), қдри (Г₂) ва С - фазалар иштирок этадилар.

Каллусли хужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ қўзатилади. Улар, нормал хужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик хужайраларда ҳам борлигини қўзатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган хужайралар учун хосдир. Каллус хужайраларни нафас олиш коэффициенти бирдан катта. Масалан нухат каллус хужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижгиш орпасидаги нисбат бижгишни қўчайиш томонига, сурилганлигини яъни Пастер эффектини пасайишини қўрсатади.

Пастер эффекта деганда, бижгишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни қўшунилади.

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффициенти қўпайиши, нафас олиш бижгишни тўхтатаолмаётганлигини ва ҳатто кислородли шароитда ҳам каллусли хужайраларда нафас олиш билан бир қаторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижгиш жараёни содир бўлаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, бўлинадиган хужайраларда этил спиритини қўпланишини қўрсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус хужайраларни митохондриялари, меристем хужайраларга ўхшаб, жуда паст ривожланган уларда кристаллар кам, бу еса аероб нафас олишга таъсир қўрсатмасдан қолмайди. Пастер эффектини бузилиши қўпроқ хайвонларни шиш хужайраларида қўзатилади. Бу ҳодиса Варбург томонидан аниқланган бўлсада ҳазиргача аниқ қўшунтира олинганча емас. Пастер эффектини бузилиши оқибатида қелиб қиқадиган анаероб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли хужайраларни углеводлар истеъмол қилишини қескин (19 маротабага) ошириб юборади.

Каллусли хужайраларни нафас олиш ҳарактерини ўзгариши билан бир қаторда углеводларни кислородсиз парчаланишини қўжайиши юналишида, бўлинадиган хужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон қўлжиш намоён бўлади.

Каллус ҳужайралари генетикаси

Узоқ вақт каллусли ҳужайралар генетик бир хил деб ҳисоблаб келинар еди. Утган асрнинг 60-йилларида каллусли ҳужайралар генетик гетероген (кўпсонли) эканлиги аниқланди. Уларни бир хил емаслиги энг аввало ҳар хил сонли хромосомалар саклаши билан намоё бўлади. *Ин витро* шароитида меристематик тўқималар генетик муътадил булдаилар

Каллусли ва суспензион култураларда дастлабки ўсимликка хос бўлган кдтор диплоид хромосомалар сакловчи ҳужайралар 3, 4, 5 ва ундан ҳам кўпроқ хромосомалар тўплами сакловчи полиплоидли ҳужайралар учрайдилар. Шулар кдтори каллусли тўқималарда тез-тез ануеплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли туқималарни кднчалитк узоқ вақт ўстирилса, ушанчалик улар плодлиги билан фаркданадилар. Тамаки усимлигини каллусли туқимларида турт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли ҳужайралар крлмайди: Барча ҳужайрлар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб крладилар. Бу еса плоидликни узгариши ўстириш шароити таъсирида, энг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқдча тушунтириш ҳам мумкин.

Плоид ҳужайралар қискд лаг фазага ега бўлганлиги сабабли, диплоид ҳужайраларга нисбатан бўлиниши тезроқ утади. Бунинг оқибатида, улар кейинги кучириб утказиш жараёнларда устунликка ега бўлиб крладилар. Хдр хрлда икки сабаб ҳам уринли деб ҳисоблаш мумкин.

Плоидликни узгаришидан ташқдри ўсимлик ҳужайра ва туқималарини ин витро ўстирилиши, ҳужайрада хромосомали абберациялар ҳосил булишини чакиради. Бу еса ўстирилаётган туқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (туқималарни) тайиши куруниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги узгаради.

Ўстирилаётган ҳужайраларда микроскоп остида куринадиган хромосомали мутациялардан ташқари курунмайдиган узгаришлар ҳам содир булиши мумкин. Бундай узгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам булиши мумкин. Генли мутациялар ҳужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини узгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган ҳужайраларни генетик муътадил емаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало - дастлабки материални генетик бир хил булмаганлиги (эксплантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табакдлашган туқималар, ҳар хил плоидли ҳужайраларга ега бўладилар ва фақатгина туқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемалар, камбийлар ва бошқалар еса доимодиплоид ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб - бу тукдша ва ҳужайраларни узоқ муддат ёқилиши, уз навбатида бундай шароитда улардаги генетик узгаришлар, жумладан плоидликни бир хил булмаган узгариши содир бўлади.

Ўсимлик туқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озуқа муҳитига утказишда бир бирига мое алоқдларни бузилиши ҳам ҳужайраларни генетик муътадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ухшаш натижалар озуқа муҳити таркибидаги фитогормонларни ҳужайранинг генетик аппаратида таъсири оқибатида намоён булиши мумкин. Каллус ҳосил булиши учун гормон сифатида албатта озуқа муҳити таркибида ауксинлар ва ситокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти еса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти еса кўпчилик озуқа муҳитлари таркибига кирувчи 2,4-Д препаратида кузатилган.

Ситокининлар хусусан кинетик ҳужайраларда полиплоидия содир булишига ёрдам берадилар.

Каллус хужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни таиши муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли ҳдмда серхреил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селексион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

Каллусли хужайралар фақат озуқа муҳити таркибида гормонлар бўлгандагина булинадилар. Аммо узоқ муддатда ўстирилганда, баъзан улар гормонсиз муҳитда ҳам ўсиш хусусиятига ега бўладилар, яъни ауксин ва ситиокининларга нисбатан автоном бўлиб крладилар. Баъзан «мослашган» хужайралар томонидан яратиган туқималарни кимёвий шишлар ҳам деб юритилади. «Мослашган» туқдшалар, шиш туқдшаларига ухшаб, кўп ҳолатларда нормал регенерация була олмайдилар ва фақат тератомлар ҳосил қиладилар. Илмий адабиётларда жуда кам бўлсада, улар дан нормал регенерантлар ҳосил бўлганлиги ҳақда ахборотлар бор.

Шуни ҳам еслаб қолиш зарурки, барча каллусли туқималарда, ўстириш жараёнида, баъзи бир култураларда 4-екишдан кейинроқ регенерация бўлган хусусият пасайиб боради, баъзи вақтларда еса умуман юқолади. қари кучатларда регенерант -ўсимлик яратиш мумкин емас.

Ҳозрча «мослашув» сабабларини аниқ жавоби юқ. Балки, у хужайраларни табакдсизланмайдиган ёки фаол пролиферация (хужайра ва туқимларни кўпайиши йўли билан янгидан ҳосил булиши) ҳолатида ушлаб турувчи гормонларни хужайрага узоқ муддатда таъсир етиши билан боглиқ булса керак деген тахминлар бор.

«Мослашган» туқималардан ташқдри (кимёвий шишлар), бактериялар ва вируслар чақирадиган ўсимлик шишлари ҳамда ҳар хил ўсимликларда турлараро гибридларда пайдо бўладиган генетик шишлар ҳам маълум. Табиатда кенг тарқдлган ва илмий изланувчиларда катта ктгзикдпп уйғотадиган шишлар - икки паллали ўсимликларда агробактериялар (Агробактериум тумефациенс) томонидан чақириладиган шишлар ҳисобланади. Бундан ташқдри ўсимликларда яна иккита ҳақтций шишлар:- попук илдиз (Агробактериум рхизогенес чақирадиган касаллик) ва пояли галл (А.руби чақиради) учрайди.

Ўсимликларни «мослашган» ва шиш туқдшалрини умумий хусусияти уларни гормонга ехтиёжсизлигидир, бошқдча айтганда ҳар иккала туқима ҳам гормон сақламаган муҳитда уса оладилар. Бу хусусият уларнинг каллули туқималардан фарқли томонидир. Маълумки, каллусли туқимларни табакалашмаганлиги ва пролеферацияси учун озуқа муҳити таркибида гормон сакдаши шарт.

«Мослашган» туқималарда худди шиш туқималарга ухшаб, уз гормонлари синтез бўлади, шунинг учун ҳам улар гормонга муҳтожлик сезмайдилар. Гормонга тобе булмаган туқимлар ташки куринишидан каллусли туқималардан фарқ қилмайдилар, уларни ягона фарқи гормон синтез ктглиши билан намоён бўлади. Бу хусусияти«мослашган» шиш хусусияти учун умумий бўлсада, уларда бу вазифани ечиш йўли ҳар хилдир. «Мослашган» туқималарда гормонга тобе булмаслиқ гормонларни синтез қилишда иштирок етувчи ферментлар молекуласи синтезига жавобгар бўлган генларни фаоллигини узгариши натижасида содир бўлади. Шундай қилиб, ушбу ҳолатда узгариш епигеномли ҳарактерга ега бўлсада, мутация имкониятларини ҳам ётибордан ташқдрида колдирмаслик керак.

«Мослашган» хужайраларда узгаРиш епигеномли ёки генотипик асосга ега еканлигини аниқлаш учун хужайра-ўсимлик-хужайра каторида гормонга муҳқтож булмаслик хусусияти сакданиб қолиши ёки қолмаслигини назоат қилиш керак бунинг учун «мослашган» туктгмада регенерант олиниб, кейин регенерация қилинган ўсимликдан олинган експлант бутунлай гормонсиз ёки гормонларни бирортаси булмаган муҳитда хужайра булинса, яъни гормондан автоном булса, гормонга муҳтожсизлик хусусияти авлоддан-авлодга утади, демак у генетик асосга ега деб айтиш мумкин.

Агар гормонсиз муҳитда хужайра булинмаса ва каллусли туқима пайдо булмаса, яъни гормонга муҳтожсизлик наслдан-наслга утмаса, узгаришни епигеномли ҳарактерга егалиги ҳақида хулоса чиқариш мумкин. Аммо, бу йўл билан фақатгина регенерация хусусиятини юқотган «мослашган» хужайраларни текшириш мумкин халос. Маълумки, кўпчилик

«мослашган» хужайралар регенерацияга бўлган имкониятларини юқотадилар, бу еса юқоридаги усулни гормонга мухтожсизликни табиатини аниқдашни қийинлаштиради.

Шиш туқималарда гормонларни синтези - ўсимлик утказилиши билан боглиқ. Утган асрни 40-йилларида Ф.Уайтнинг укувчиси, Браун корончатогалли шиш туқима култураси агробактерия юқлигида (уларни юқори ҳароратда улдирилгандан кейин ҳам) ҳам ишишлик хусусиятини сақлаб қолишини кузатган еди.

Гормон сақдамаган сунъий озуқа муҳитида, бактерия сақдамаган корнчатли галл туқимаси фаол пролиферацияни давом еттираолган. Бу туқималар, оддий туқимага караганда юқори микдорда ауксинлар ва бирнеча ситокининлар сақлайдилар. Узи утказган тажрибалар асосида Баун, ўсимлик хужайралари Агробактериум тумефациенс таъсиридан кейин кандайдир йўл билан шиш хужайраларга айланадилар деган фикрга келган еди.

Агробактериялар ўсимлик хужайрасига Тип (Тумор индуцинг принципле) киритади, у еса Збсоатда оддий хужайрани шиш хужайрага айлантиради деб тахмин қилинган еди. Кейинчалик Тип ДНК еканлиги ва агробактерияларни катта плазмидасида сақланиши аниқланди ва Ти плазмида деб аталди. Онкоген фаоллик бактерия хужайрасидан Ти плазмидани бутунлай ёки уни маълум бир қисмини ажратиб олинганда юқолиши исботланган.

1977 йилда Чилтон ўзини шогирдлари билан корончатуй галлни шишлари агробактерияларни Ти плазмидасини маълум қисмини ўсимликни ядро ДНК сига киритиш натижасида пайдо бул шпини исботладилар.

Шундай қилиб, Ти плазмидани сигменти (Т-ДНК) хромосомага интеграция қилинади ва ўсимликни трансформацияланган (шиш) хужайрасини ирсий аппаратини бир қисми бўлиб хизмат қилади. Агробактерияларни Ти плазмидани Т-ДНК сини ўсимликлар хромосомасига интерграцияси шиш пайдо булишига ва шиш хужайрасини сунъий озикд муҳитида гормонга мухтожиз равишда ўсишга олиб келади. Бу хдр икки ҳодиса бир бири билан узаро узвий боглиқ чунки ауксин ва ситокининларни синтезини назорат қилиб турувчи генларни экспрессияси оқибатида гормонга мухтожсизлик келиб чиқади ва у хужайраларни табакдсизланишига ва пролиферациясига олиб келади.

Ти плазмида ўсимликлардаги янги генларни табиий вектори (ташувчиси) бўлиб хизмат қилади. Агробактериялар томонидан индуциролат қилинган шиш хужайралар томонидан ауксин ва ситокининларни синтез булиш йўли, нормал ва «мослашган» хужайраларникига Караганда боишчарок. У оддийрок ва киска. Мутагенлар ёрдамида Т-ДНК молекуласида гормонал фаолликни узгаришини назорат қилиб турувчи ксимни (участкани) аниқлаш мумкин булди. Шишни ўсиши учун бирта локус емас, балки бир катор генлар жавобгар еканлиги аниқланди.

Т-ДНК ауксин ва ситокининлардан таишчари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар галли (опинлар) синтезини детерминация қилиши аниқланди. Бу моддалар шиш пайдо булишига сабаб булаолмайдилар; балки улар ҳосил бўлган шиш тўқималарида синтез бўладилар. Шиш тўқималар бир неча кунлик бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайдилар, масалан, коланхоеда опинлар синтези, шиш индуцияси бошланган кундан 7-кунда бошланади.

Каллусни суюқ озуқа муҳитига утказиб, автоматик равишда аралаштириш орқдди хужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида. Масалан пектиназа ферменти ёрдамида тугридан-тугри експлант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва х.к) ҳам хужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, експлант юзасида каллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан хужайра ва хужайра агрегатлари ажралади ва оқибатда хужайра суспензияси олинади.

100 мл хужайра суспензияси олиш учун 2-3 г каллусли тўқима керак бўлади.

Хужайра суспензиясини тайёрлаш учун енг зарур шароит - бу домий равишда аралаштириб ёки чайқдтиб туришдир. Агар хужайра суспензияси кимирламай турса, ундан булиниш натижасида каллусли тўқималар ҳосил бўлади.

Суспензион ҳужайраларни бўлиниши ауксинлар ва ситокининлар, яъни каллус ҳужайраларни ўсиши ва индукцияси учун зарур бўлган гормонлар ёрдамида химоя қилиб турилади. Шундай қилиб, суспензияли ҳужайралар каллус ҳужайраларни узгинаси бўлиб, улар да бундай ҳужайраларга хос бўлган барча хусусиятлар намоён бўлади.

Суспензия 2,4-Д сакдаган муҳитда ҳосил бўладиган пукак ҳужайрадан яхшироқ ҳосил бўлади. Муҳит таркибидан калсий олиб ташланса, суспензия ҳосил бўлиши енгиллашади. Озиқага пектиназа ферменти аралаштирилса (бу фермент озуқа таркибидаги алоҳида ҳужайраларни бир-бирига боғлаб тувчи пекрат калсийни парчалайди) суспензия янада енгилроқ ҳосил бўлади.

Биотехнологияда ҳужайра суспензиясидан иккиламчи метаболитлар олиш мақсадида фойдаланилади. Иккиламчи метаболитларни кўпчилиги доривор моддалар ҳисобланадилар ва ҳужайра биомассасини саноат миқёсида кўпайтириш ва ҳужайра селекциясида кенг ишлатиладилар. Бундан ташқари ҳужайра суспензиясидан алоҳида протопластлар олиш учун ҳам фойдаланилади.

Суспензион култур алардан иккиламчи метаболитлар продуценти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки окдвa усулида очик ёки ёпиқ тизимда ҳужайраларни кўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпиқ тизимда ҳужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити киритилмайди, тизимда домий режимда ўстирилганда еса озуқа муҳити тозасига алмаштириб турилади.

Суспензион ҳужайралар билан ишлаганда уларни ҳарактеристикасини билиш шарт: тириклиги, ҳужайраларни суспензион културада кўп ёки камлиги, агрегация даражаси, ўсиш тезлиги ва х.к.

Ҳужайраларни тирик ёки тирик емаслиги уларни буяш (кук метилен ёки Эванс куки) орқдли аниқланади. Тирик ҳужайрлар, ҳужайра мембранаси буёкни утказмаслиги сабабли буялмайди. Улик ҳужайра қобигидан буёқ тез утади ва шунинг учун ҳам кук рангга буялади. Ҳужайра суспензиясини асосий курсатгичларидан бири, ҳужайра популяциясини қдлинлигидир. Ҳужайра сони Фукс-Розентал ҳисоб камерасида микроскоп остида мацерансиядан кейин (ҳужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация қилувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли еритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, ҳужайраларни бириктириб турувчи уртадаги пластинкани еритиб (гидролиз қилиб) юборади.

Яхши ривожланувчи суспензия, каллусли културага ухшаб, С- симон ўсиш қизигига ега. Одатда, пассажни давомийлиги 14-16 кундан иборат. Бунда суспензиянинг қдлинлиги 5x10 дан 5x10 ҳужайра 1 мл гача ошади. Ҳужайра сонини кўпайиши, уларни курук ва хул массаси- суспензион културани асосий ўсиш критериясини ташкил этади.

Суспензияни сифати, ҳужайраларни агрегация даражасига боғлиқ. Агрегатлар 10-12 ҳужайрадан кўп булмаслиги керак. Шунинг учун ҳам йирикроқ агрегатлардан қутулиш мақсадида суспензияни марля, найлон ёки метал филтрдан утказилади. Бу операция бир вақтни узида експлантлар қолдигидан ёки каллус тўқималарни булакчаларидан қутулиш имқонии беради.

Ҳужайра суспензиясида қимматбаҳо иккиламчи метаболитлардан ташқари янги ажойиб бирикмалар: компототecin, хиррингтонин қабии антикансерогенлар, хдр қил пептидлар (протеаза ферменти ингибитори, фитовируслар ингибиторлари) ва бошқд бирикмалар синтез бўлиши ҳам қузатилган.

Шуни алоҳида таъқидлаш лозимки, ҳужайраларни бўлиниши оқибатида ҳужайра биомассасини кўпайиши ва иккиламчи метаболитларни синтез бўлиши хдр қил вақтга тугри келади. Иккиламчи метаболитлар синтез бўлишини максимуми, ўсишни стационар фазасига тугри келади.

Генетик ва физиологик изланишлар хдмда ҳужайроа селекцияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида ҳужайралар жуда қатта аҳамият қасб этади. Қлонни олиниши ягона ҳужайра авлодини олиниши каллусли ҳужайраларни генетик бир қил емаслигини сабабларини

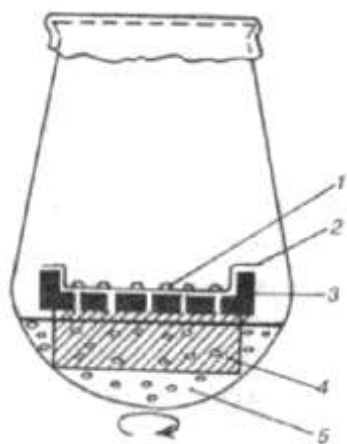
аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген експлат олинган тўқималарда эмас, балки алоҳида олинган ҳужайраларда олиб борилади.

Пропластлардан ажратилган алоҳида (ягона) гибрид ҳужайра кейинги булинишларида гибрид ҳужайрадан ташкил топган клон яратиш имконини беради. Бу еса изланувчиларни ишларини енгиллаштиради, чунки ажратилган пропласт култураларда гибрид булмаган ҳужайралардан пайдо бўладиган янги ҳужайраларни алоҳида ажратиш каби машаққатли ишдан озод қилади. Бундан ташқдри алоҳида ажратиб олинган ҳужайраларни протопластларини урганилганда соматик гибридизация жараёнини ўзини кузатиш ҳам яхшироқ бўлади. Алоҳида (ягона) ҳужайралар ҳужайра суспензияларидан, ўсимлик тўқималаридан, масалан барг мезофиллидан уни ферментлар ёрдамида мацерация қилингандан кейин, алоҳида ажратиб олинган пропластлардан уларда ҳужайра қобиги пайдо бўлганидан кейин ажратиб олинади.

Бир ҳужайрали фраксия олиш учун баъзида суспензион културани колбада 15-30 мин тиндириб қуйиш кифоя бўлади. Бунда йирик агрегатлар чуқмага тушади. қолдиқ устки суюқликда еса фақат бир ҳужайрали култура ёки кичик агрегатлар бўладилар. Агар бу йўл билан бир ҳужайрали фраксия олиш имконияти булмаса, фёрдамида мацерация қилиш, сахароза градиетида центрифуга қилиш ёки хдр хил елаклардан утказиш усулларидан фойдаланилади.

Ягона ҳужайраларни ўстиришда бироз кийинчиликлар сезилади, чунки алоҳида ҳужайра каллусли тўқима усган шароитда яхши булинмайди. Ягона ҳужайраларни бўлинишига мажбур қиладиган махсус усуллар яратилган. 1960 йилда Джонсон «енага» усулини тадбиқ қилган еди. Бу усулда «енага» функциясини бир кием каллусли тўқима бажаради ва уалоҳида ҳужайрани бўлинишига мажбур қилади ва уни алоҳида ҳужайрадан филтр коғози ёрдамида ажратиб олинади. Бундай шароитда («енага» ҳузурида) алоҳида ҳужайра булиниб, ҳужайрани индивидуал колонияси - клон ҳосил қилади.

26-расм.Маккажўхорининг ягона ҳужайралари ва ажратилган протопластларини ўстиришда «енага» сифатида суспензион ҳужайралар културасини ишлатилиши:



- 1-ҳужайра колониялари;
 - 2-филтр =ОФЦО;
 - 3-алюмин елак
 - 4-пенополиуретан;
 - 5-ҳужайра суспензияси
- (З.Б. Шамина,1985).

Ҳужайрани бўлиниши муҳитни кондицирлаш ҳам тезлатади, бунинг учун унга (муҳитга) тез булинадиган ҳужайра културасини Озика муҳити кушилади- Кондиция қилувчи фактор ҳужайра суспензиясини ўсишни экспоненсиал фазасида бактериал филтрдан утказиш даврида пайдо бўлади (олинади). Моҳияти бўйича юкорида зикр етилган барча усуллар ҳам булинадиган ҳужайралардан чиқадиган кондиция қилувчи фактордан фойдаланишга асосланган.

Хрзирча бу факторни таъсир механизми ва уни кимёвий табиати аниқ эмас. Аммо, бу фактор иссиқда чидамли, сувда ерувчан, паст молекулали модда ҳамда фитогормонлар билан алмашиб булмаслигини айтиш мумкин. Шунингдек бу модда тахминан 700 Далтон молекуляр оғирлигига ега бўлган пХ 4-11 да мутадил модда еканлиги ҳам аниқданган. Шундай қилиб, бу модда тоза кимёвий модда булмасдан, ҳужайрадан ажраладиган факторлар йигиндиси булса ҳам ажаб эмас.

Назорат саволлари

1. *Ти-плазмиданинг аҳамияти?*
2. *Ўсимлик ген муҳандислигида қўлланиладиган маркерлар генлар ҳақида маълумот беринг?*
3. *Трансген хужайраларини саралаб олиш қандай амалига оширилади?*
4. *Трансген ўсимликларининг истиқболларини қайси соҳаларда кўриш мумкин?*

7- МАЪРУЗА

ҲАЙВОН ГЕН МУХАНДИСЛИГИ (2С)

Режа:

- 1 Хайвон ген муҳандислиги.
- 2 Хайвон хужайраларнинг ўзига хос маркерлари
- 3 Вирусларни вектор сифатида қўллаш
- 4 Трансген хайвон хужайраларини яратиш.
- 5 Одам геноми
- 6 Ген хариталари
- 7 Хайвон организмга янги генлар киритиш
- 8 Ирсий касалликларни даволаш

Таянч сўзлар: микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, регенерация, ретровируслар, хайвон хужайралари. Трансген хайвон хужайралари, одам геноми, ген хариталари, микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, регенерация, ретровируслар, хайвон хужайралари.

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3, Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалларнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имконини беради. Олимлар қўлида ДНК нинг керакли бир қисмини бактерия хужайрасига кўчириб ўтқазадиган система-плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи ҳалқли молекулалар-плазмидалар ва мўътадил вируслар вектор деб аталади. Уларни табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлди. Шундай экан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оқсилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан?

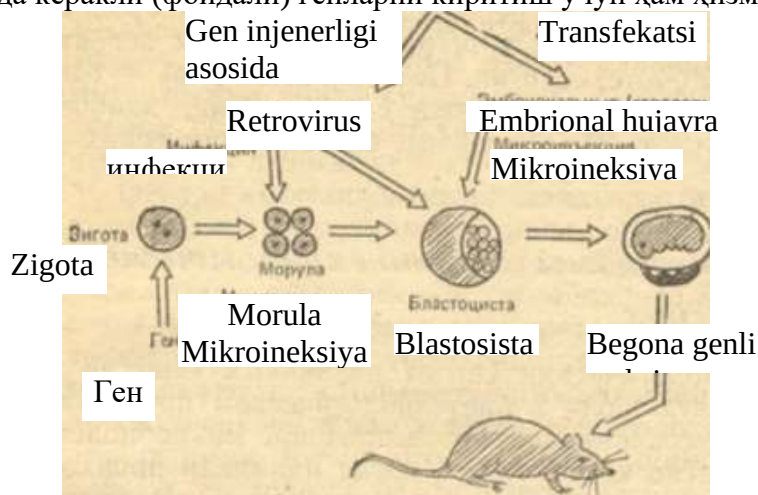
Бу ғояларни амалда юзага чиқиши ген инженерлиги ёки генетик инженерлик деб аталган ва катта истиқболга ега бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисимларига ега бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб, керак бўлган қисимларини бошқа генлардан ёки синтез ёли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофик организмга киритиб зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳоказо технологиянинг йиғиндисидир.

Ҳайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни ҳужайра ядросига жойлаб қўйишнинг икки усули: пронуклеусга генни пуркаш ва вирус трансфекцияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ёл билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон ҳужайрасига киритишди. Сичқон ҳужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон ҳужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфекцияси (трансфекцияси) ҳайвонлар ҳужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар ҳужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам хизмат қилади.



Transgenli sichqon

27-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппарати га кучириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипсия қилувчи РНК сақловчи вируслар оиласи) системаси векторлари яратилган бўлиб, улар қушлар ва сутемизувчилар организмга ташқаридан ген киритиш хусусиятига ега.

Генлар организмга киритишда вируслардан ташқари мобил элементлар ҳам мавжуд бўлиб бу 1983 йилда дрозофила геномидан ажратилган. Энг кўп қўлланиладиган усуллардан бири генларни зиготанинг пронуклеусига инъекция қилишдир. Қишлоқ хўжалик ҳайвонлари зиготасида пронуклеусни ажратиш қийин бўлгани учун инъекцияни аниқ қилишни қийинлаштиради. Шунга қарамай Ҳаммер ва бошқалар 1985 йилда биринчи бўлиб трансген чўчқа олдилар. Лекин тажрибалар маҳсули жуда паст еди. Масалан, битта трансген кўзи олиш учун 1032 зиготага инъекция қилиш, 20 та трансген чўчқа боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъекция қилишга тўғри келади.

Зооинженерлар учун генларни ҳайвон ҳужайрасига киритиш ва геномига тартиб билан жойлаштириш усуллари муҳим ҳисобланади. Ҳозирги вақтда шу соҳада бир неча хил методлар ишлатилади. Жумладан вирус билан киритиш, химиявий, физиковий ёл билан, ҳужайраларни қўшиш ва янги усул-ретровирусни ишлатиш.

Биринчи усулда ДНК сақлайдиган вируслар генларни кўчириб ўтказишда вектор

сифатида фойдаланилади. Лекин кўпчилик ҳозиргача ўрганилган вируслар киритилган хужайрани емирилиши ва ёқ қилиниши (литик вектор) мумкин. Бундан ташқари улар трансформация қилишда ретровирусларга нисбатан кам самара беради. Шунинг учун ҳам уларни ҳайвонларда кенг миқёсда ишлатиш мумкин эмас. Лекин бундай векторлар вакциналарни ишлаб чиқаришда самара бериши мумкин.

Иккинчи усул генларни тартиб билан жойлаштиришда кенг қўлланилади ва бунда ДНК фосфот калсий билан қўшиб хужайрага киритилади. Бу усулнинг ва бошқа химик усулларнинг ижобий томони шундаки улар нисбатан оддий ва алоҳида асбоб-ускуна талаб қилмайди, ҳамда инфекция чақирмайди. Шунинг учун ҳам бу усул мутлоқ хавфли эмас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам ўзлаштирилишида.

Физикавий усул икки асосий классда-микроинъекция ва электропорация ёли билан олиб борилади. Электропорация нисбатан янги усул бўлиб, ДНК молекуласини электр токи ёрдамида хужайра мембранасидан олиб ўтишга ёрдам беради. Лекин бу усул ёли билан генларнинг геномга ўтказилиши хусусияти номаълум.

Микроинъекция усули-самарали ҳисобланиб, кенг қўлланилди. Гордоннинг аниқлашчи плазмидли ДНК насилга берилади. Бундай ҳайвонлар, яъни ўзининг геномида экзоген гени бор организмлар трансген ҳайвонлар дейилади.

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг кўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар кўпайишда айрим гармонларнинг таъсир кучи аниқланган. Масалан, ФСГ (фолликулаларнинг етилиши назорат қилади) ва ЛГ (лютинлаштирувчи гармон). Ген инженерияси олдида мана шу гармонларни биотехнологик усул билан ишлаб чиқиш ва шу билан уларнинг кўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлилиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селекция қилиш ёли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чатиштириш натижасида ва уларни танлаш, саралаш ишлари олиб борилганда қўйларнинг серпушлилигини 40-60%га ошириш мумкин. Лекин шу даражага етказиш учун камида 30 йил керак бўлади. Серпуштлик хусусияти генларнинг полиген таъсирига боғлиқ. Мана шу жиҳатлардан фойдаланиб, ген инженерлик усули билан бурула-ген деб аталмиш генни бошқа қўйлар геномига жойлаб қўйиш туфайли уларнинг пушторлигини ошириш мумкин.

Тиббиёт соҳасида эмбрионларни кўчириб ўтказиш бефарзандлик муаммосини ҳал қилишда муҳим аҳамиятга эга. Аммо бу усулнинг уй ҳайвонларини урчитишда қўлланилиши кўпчиликка қоронги бўлса керак. Шунинг учун эмбрионларни кўчириб ўтказишнинг ўзи нима ва бу усулда қандай муаммолар мавжудлиги шу мақсадда кўрсатиб ўтишни ўз олдимизга мақсад қилиб қўйдик.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш - оталанган қиз хужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қўйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ёллар билан бажарилмоқда. Масалан: қуй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида эмбрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ёли билан амалга оширилса, қорамолларда ҳамда йилқиларда бу усул махсус асбоблар ёрдамида танага зиён етказмасдан бажарилади. Албатта бу ишларни амалга оширишда мутахассисдан юқори даражада билим ва уқув талаб етилади. Бунда ҳар бир ҳайвон турининг тана тузилиши ва физиологиясининг ўзига хослигини унитмаслик керак. Негаки, эмбрионни бир турдаги ҳайвондан олиб иккинчисига қўйиб бўлмайди.

Уй ҳайвонлари ичида эмбрионларни кўчириб ўтказиш қорамолларда яхши ўрганилган бўлиб, бунинг учун эмбрион олинадиган сигир (донор) танасига махсус гормонлар юборилади, натижада улар тухумдонидида кўплаб қиз хужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ёли билан ана шу қиз хужайралар оталантирилади ва 6-12 кун ўтгандан

кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган эмбрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ё'ли билан идишларга тушириб олинади. Суюқлик ичидаги ебрионлар махсус микроблар ёрдамида топилиб сифати аниқланади. Шундан кейин кўчириб ўтказишга ярайдиган эмбрионлар бошқа сигирлар (реципиентлар) бачадонига махсус катетерлар ёрдамида жойлаб қўйилади. Кўчириб ўтказилган эмбрион "Янги" она қорнида ривожланиб кетиши учун, реципиент сигир куйга келгандан кейинги вақт эмбрион ёшига тўғри келиши керак. Сабаби, донор ва реципиент сигирлар бачадонидаги суюқлик таркиби ана шундагина бир-бирига мос бўлади. Одатда ҳар бир донор учун 5 тадан реципиент тайёрланади.

Мана шу барча техник жараёнлар хатосиз амалга оширилган тақдирда кўчириб ўтказилган эмбрион "янги" она қорнида ўсиш ва ривожланишни давом еттириб 285 кундан кейин тўлақонли бузоқ бўлиб туғилади.

Агар биз шу соҳада қилинган ишлар тарихига назар ташлайдиган бўлсак, эмбрион шаклини тасвирлаш ХВИИИ асрга бориб тақалади. ХИХ асрнинг охирларида биринчи маротаба Валтер Хип томонидан эмбрионни кўчириб ўтказишга уриниб қўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан 1950 йили биринчи маротаба эмбрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили эмбрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотига қараганда жаҳонда эмбрионни кўчириб ўтказиш усули билан 1981 йили 35 минг бузоқ олинган бўлса, 1995 йилга келиб 1 миллиондан зиёдроқ бузоқ олинди. Бу усул айниқса АҚШ, Франция, Англия, Олмония, Голландия, Исроил каби чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда кенг ё'лга қўйилган. Хуш, бу соҳага шунчалик қизиқишнинг сабаби нимада? Биринчидан ушбу усул билан ҳайвонлар урчишидаги табиий тўсиқ бузилиб улар кўпайишдаги имкониятлар кенгайтирилади. Маълумки, урғочи уй ҳайвонлари бутун умри давомида 5-10 тадан зиёд насл қолдирмайди. Ваҳоланки уларнинг тухумдониди юз минглаб пишиб етилмаган қиз хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ё'л билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишидаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айниқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан эмбрионни кўчириб ўтказиш ё'ли билан йилига 10 ва ундан ортиқ бузоқ олиш мумкин. Бундай бузоқлар ирсий жихатдан бир-бирига яқинлиги билан табиий шароитда олинган бузоқлардан фарқ қилади. Бу еса уларни парваришлашда ва кейинчалик сут маҳсулоти ишлаб чиқишда қўл келади. Бу усулнинг яна бир устунлик томони шундаки, қариллиги туфайли табиий шароитда насл қолдириш имкониятига ега бўлмаган юқори маҳсулдор сигирлардан ҳам кўплаб эмбрионлар олиб реципиент-сигирларга ўтказиш мумкин. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини танлаш ва саралаш туфайли ҳозирги пайтда янги технологияга ҳамда жўғрофий иқлимга мос янги зотлар яратилган. Бундан 100 йил олдин сигирларнинг ўрта сут маҳсулдорлиги йилига 100-200 литрни ташкил қилган бўлса, ҳозирги пайтда бу кўрсаткич айрим мамлакатларда 5 минг литрдан ошиб кетади. Лекин Ўзбекистон шароитида бу кўрсаткич ҳали ҳам паст бўлиб ўртача 2300 литрни ташкил етди.

Эмбрионлар кўчириб ўтказишда донор сигирлар сут маҳсулдорлиги поданикидан 3 минг кг юқори бўлганда яхши самара бериб 5 минг кг дан кам бўлмаслиги керак. Сигирларнинг сут маҳсулдорлигини ошириш учун юқорида айтилган усулни қўллаш яхши натижа беради.

Айниқса ҳозирги пайтда муаммо бўлиб турган масала ҳайвонларни ҳар хил касалликларга чидамлилигини ошириш борасида бунда ҳам эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Бунинг учун юқори маҳсулдор ҳайвонлардан олинган эмбрионлар, шароитга мослашган, касалликка чидамли реципиентларга қўйилади. Ҳозирги пайтда эмбрионларни музлатиш ва ҳоҳлаган пайта еритиб реципиент ҳайвонларга қўйиш

амалиётида - кенг қўлланилмоқда. Махсус музлатгичларда музлатилган эмбрионлар дунёнинг ҳоҳлаган бурчагига олиб борилиш ва шартнома асосида юқори маҳсулдор подалар яратилиши мумкин. Энг муҳими шу пул билан эмбрионларни бир мамлакатдан иккинчисига олиб ўтилганда касаллик тарқалиши еҳтимоли ёқолади.

Бу усулнинг қимматли томони яна шундаки ёқолиб бораётган ҳайвонлар эмбрионлари узоқ, муддатга музлатилиб улар генофонди яратилади. Эмбрионларнинг кўчириб ўтказишнинг яна бир муҳим томони шундаки, уларни бўлакларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун эмбрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлакларга бўлинади ва ҳар қайсиси биттадан реципиентга ўтказилади. Натижада бир хил ирсиятга ега бўлган ҳайвонлар олинади.

Ҳозирги пайтда чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда ҳайвонларнинг кунлик ўсишдаги биологик потенциали егалланди. Аммо сигирлар орасида йилига 25 минг ва ундан ортиқ сут берадиган ҳайвонлар мавжуд. Ўртача сут маҳсулотини юқори даражага етказиш учун олимлар томонидан эмбрионлар пронеуклеусига юқори даражада сут беришни назорат қиладиган генларни ўрнатиш устида иш олиб борилмоқда.

Юқорида биз урғочи ҳайвонлар тухумдонидида юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчиликл лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олиниб, махсус суюқликларда парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишлаяпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири эмбрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % эмбрионларни жинси тўғри аниқланяпти. Ана шу муаммолар босқичма-босқич амалга оширилса эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳайвонларни урчитишда асосий усул бўлиб қолади.

Маълумки амалий селекция иккита муҳим ёндошишга боғлиқ, биринчидан ирсий хилма-хиллик ва иккинчидан генотиплар селекциясига. Ҳужайра технологияси ирсий хилма-хилликни яратишда мутлоқ бошқача ёл тутди. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индукциялашган мутант олиш, ҳужайра селекцияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар киради: сигирлар, айниқса юқори маҳсулдор сигирдан насл олиш паст даражада бўлганлиги учун генетик прогресс чекланган бўлади. Мана шу табиий тўсиқни олиб ташлаш усули эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳисобланади. Эмбрионларни кўчириб ўтказиш еса ўз навбатида қуйидаги 4 омилга боғлиқ: 1) кўплаб тухум ҳужайраларни чиқариш ва уларни оталантириш; 2) эмбрионни йиғиш; 3) эмбрионни кўчириб ўтказиш; 4) эмбрионни музлатиш ва сақлаш. Мана шу омиллар ичида биринчиси, яъни кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун, донор сигирлар суперовуляция қилинади. Шунини айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонлар қанча ва қандай сифатда эмбрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармонини юборишдан олдин улар тухумдонидидаги сарик таначанинг ҳажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши еътироф етилган. Агар тухумдонлардан бирида ҳажми 10 мм ва ундан каттароқ фолликула борлиги аниқланса, унда ҳайвонларни гармонлар билан ишлов бергандан қатъий назар яхши натижалар бермаслиги олимлар томонидан исботланган. Бундан хулоса шуки, урғочи ҳайвонларни гармонлар билан ишлов беришдан олдин, уларни тухумдонларининг физиологик ҳолати яхшилаб текширилиши керак. Таҷрибалар шунини кўрсатдики ҳайвонларнинг ҳаммаси ҳам гонадотропин гармонига бир хил реакция беравермайди.

Гонадотропин гармонларини ҳайвон танасига юбориш улар жинсий даврининг 10-12 кунларни яхши натижалар беради. Бундан ташқари сифатли эмбрионлар олиш йил фаслларида ва озика тўйим-лилигига боғлиқлиги таҷрибаларда исботланди. Сунъий ёл билан овуляция чақариш қўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврининг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган

хайвонлар гуруҳига кириб, улардан эмбрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамасдан гармонлар билан ишлов берилганда 33-38 % кўпроқ эмбрионлар олиш мумкин. Отларда гармонлар билан ишлов берилиб, эмбрионлар олиш тўлиғича ишлаб чиқилмаган. Шундай қилиб, юқоридаги маълумотлардан аён бўладики, хайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, эмбрионлар олиш кўп таъсирга боғлиқ. Шунинг учун ҳам хайвонлардан сунъий ёл билан эмбрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган хайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли миқдорда эмбрион олишда муҳим аҳамият касб этади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сариқ таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум хужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган эмбрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум хужайраларни ташкил қилади.

Ҳозирги пайтда эмбрионларнинг сифатини аниқлаш уч ёналишда олиб борилмоқда; 1) эмбрионларнинг ташқи кўринишидаги бир-бирига боғлиқлик, уларнинг ёшига мувофиқлиги ва улар кўчириб ўтказилгандан кейин яшаб кетиши; 2) эмбрионлари модда алмашинувини ўрганиб, улар ҳаётчанлигини аниқлаш; 3) эмбрионлар қобиғи ва бластомерлар ситоплазмасининг ҳар хил бўёқларга нисбатан адсорбсион қобилятини ўрганиш. Бу усулларни барчаси ҳам камчиликлардан ҳоли емас. Шунга қарамасдан ҳозир амалиётда эмбрионлар фақат уларнинг морфологик кўриниши билан баҳоланиб, сифати аниқланмоқда.

Маълумки, эмбрионларни кўчириб ўтказишда баҳоси юқори бўлган оталанган тухум хужайралардан фойдаланиш яхши самара беради.

Реципиент сигирларга эмбрионларни кўчириб ўтказиш жараёни донор-сигирлардан эмбрионларни ювиб жойлаштирилган асбоб (катетер) тухумдонидида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.

Отларда эмбрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ёли билан амалга оширилиши мумкин. Куй ва чучкаларда бу жараён фақат жарроҳлик усули билан амалга оширилади. кўчириб ўтказиладиган эмбрионлар сони чучкаларда 4 тадан кам бўлмаслиги керак. Бундан кам бўлган ҳолда эмбрионлар бачадон деворига ёпишмайди (инплантация) ва уларда кейинги ривожланиш бўлмайди.

Эмбрионларни кўчириб ўтказишда уларни донор-сигирдан ювиб олингандан кейин реципиент-сигирга жойланганига қадар бўлган вақтда қандай сақлаш муҳим аҳамиятга ега. Бу давр 37 градусли ҳароратда, кўпчилик олимларнинг фикрича, 2 соатдан ошмаслиги керак. Лекин бу даврни узайтириш учун эмбрионларни махсус асбобларда музлатиш ва керак бўлганда еритиб фойдаланиш мумкин.

Эмбрионларни музлатиш махсус автомат асбобларда амалга оширилиб, белгиланган дастурда ишлайди, у 3 қисмидан иборат бўлиб: электрон блоки, музлатиш камераси ва суюқ азот сақланадиган идишдан иборат. Музлатгич вазифасини азот пар бажаради. Ҳозирги пайтда эмбрионларни музлатиш ва еритиб реципиент хайвонларга кўчириб ўтказиш натижасида кўплаб бузук, кўзи ва чўчка болалари олинмоқда.

Эмбрионлар донор хайвонлардан ювиб олингандан кейин, ёки сунъий шароитда тухум хужайралар ўстирилиб, ин витро шароитида оталантирилгандан сўнг ҳар хил микроманитуляция ишлари олиб борилиши мумкин, Масалан, эмбрионлар ядросини бошқа ядросизлаштирилган тухум хужайрага кўчириш кўплаб бир хил насл олишни клонлашни беради. Бу усул айниқса сигирларни хирургиясиз ёл билан ювиш ишлатила бошлангандан кейин кенг қулоч ёйди. Агар юқори махсулдор донор-сигиридан бешта 32 хужайрали эмбрион ювиб олинса ва ҳар бир хужайра ядроси алоҳида тухум хужайрага кўчирилса, бир донордан 160 эмбрион олинган бўлади. Бригц ва Кинг (1952) аниқлашича эмбрионлар ёш пайтида улар ядроси кўчирилса хужайранинг ривожланиши яхши бўлади. Ядроси кўчириб

ўтказиладиган эмбрион кечки стадияда бўлса, ҳужайра ривожланиши бўлмайди. Чунки эмбрионлар бу даврда узларини РНК синтезини амалга ошира бошлайди. Олдинги даврда еса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб қўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш эмбрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум ҳужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир эмбриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

Ген муҳандислиги методларининг яратилишига қадар, 2 та соматик ҳужайраларни қўшиш йўли билан генлар кўчирилган. Агар ҳужайраларнинг 2 та линиясини биргаликда полиэтиленгликол ёки инактивланган Сендай вируси иштирокида инкубация қилинса, бу 2 та ҳужайра линияларининг ядролари қўшилади. Ҳосил бўлган гибрид ҳужайраларни селектив муҳитда ажратиб олиш мумкин. Бунда маълум бир белгилар ва маълум бир хромосомалар ўртасидаги мувофиқликни аниқлаб янгидан-янги генлар харитасини тузиш мумкин бўлади. Гибрид ҳужайра кўпайиши давомида битта ёки иккала она ҳужайраларни хромосомаларини йўқотиши, ҳамда йиллар давомида репрессияланган генлар экспрессияланиши мумкин. Баъзи ҳолларда она ҳужайра линиясида «ишламаган» ген, гибрид ҳужайраларда «ишлаши» мумкин.

Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш

1976 йили Ениш сичқон ҳужайраларига бегона генларни киритиш ва бу белгиларни наслдан-наслга ўтишини амалга оширган. Лекин рекомбинация ва клонлаш методи ўша вақтда унчалик ривожланмаганлиги сабабли генларни киритишда вируслардан вектор сифатидагина фойдаланилган.

Сичқон лейкози вируси кирадиган синф вирусларига олимлар томонидан генларни кўчириш учун самарали вектор сифатида қараганлар. Ушбу ретровирусларнинг генлари яқка ипли РНКнинг 2 та молекуласидан тузилган: ҳужайра бу вирус билан зарарланганда қайтар транскриптаза ДНК молекуласини, комплементар РНКни синтезлайди. Ҳосил бўлган ДНК-нусха ҳужайра ДНКсига «провирус» кўринишида жойлашади. Провирус барқарор ҳолда қолиши ёки ҳужайра ДНКсидан ажралиб янги вирус заррачалари ўсишига манба бўлади.

Биотехнология саноатида продусент сифатида прокариотлар – (бир ҳужайрали, ядроси мукамал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномисетлар, риккецийлар ва тубан еукариотлар (бир ва кўп ҳужайрали, ядроси мукамал, хромосомалари махсус липопротеид табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитқи ва миселиал замбуруғлар, енг содда жониворлар ва сув ўтлари ҳамда уларни ҳар хил усуллар (селекция, мутагенез, ҳужайра ва ген муҳандислиги) орқали олинган мутантларидан фойдаланилади.

Бугунги кунда биотехнологик жараёнларда табиатда тарқалган 100 мингдан ортиқ туркумга мансуб бўлган микроорганизмлардан фақатгина бир неча юзтаси ишлатилади холос.

Микробиология саноатида ишлатиш учун тавсия етиладиган продусентларга катта талаблар қўяди, уларнинг умумийлари қуйидагилардан иборат:

- ✓ **ўсиш тезлигининг баландлиги,**
- ✓ **арзон озиқа муҳитида ўсиши,**
- ✓ **бошқа микрофлорага ва фагга чидамлилиги,**
- ✓ **юқори ҳосилдорлиги.**

Вируслар билан прокариот ҳужайралар орасидаги материалларнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имконини беради. Олимлар қўлида ДНК нинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтқазадиган система-плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи ҳалқли молекулалар-плазмидалар ва мўътадил вируслар вектор деб аталади. Уларни табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлди. Шундай екан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оқсилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан?

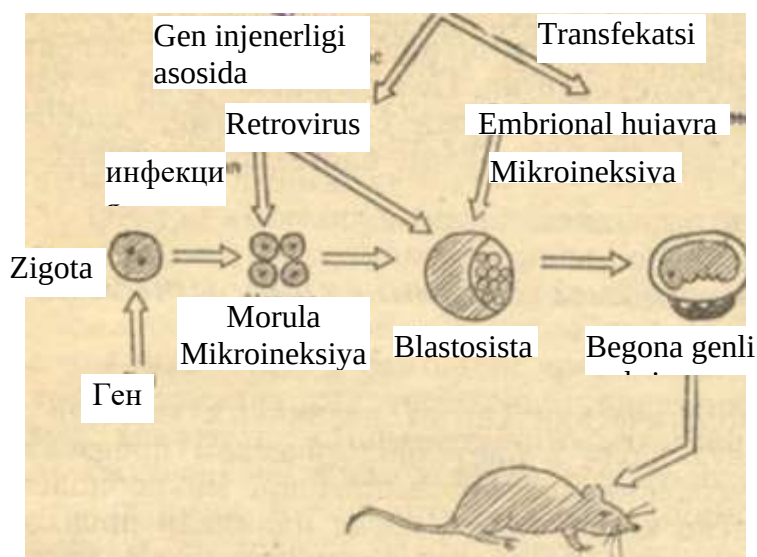
Бу ғояларни амалда юзага чиқиши ген инженерлиги ёки генетик инженерлик деб аталган ва катта истиқболга ега бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисимларига ега бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб, керак бўлган қисимларини бошқа генлардан ёки синтез ёли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофик организмга киритиб зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳоказо технологиянинг йиғиндисидир.

Ҳайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни ҳужайра ядросига жойлаб қўйишнинг икки усули: пронуклеусга генни пуркаш ва вирус трансфекцияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ёл билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон ҳужайрасига киритишди. Сичқон ҳужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон ҳужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфекцияси (трансфекцияси) ҳайвонлар ҳужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар ҳужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам хизмат қилади.



Transgenli sichqon

27-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппарати а кучириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипсия қилувчи РНК сақловчи вируслар оиласи) системаси векторлари яратилган бўлиб, улар қушлар ва сутемизувчилар организмга ташқаридан ген киритиш хусусиятига ега.

Генлар организмга киритишда вируслардан ташқари мобил элементлар ҳам мавжуд бўлиб бу 1983 йилда дрозифила геномидан ажратилган. Энг кўп қўлланиладиган усуллардан бири генларни зиготанинг пронуклеусига инъекция қилишдир. Қишлоқ хўжалик ҳайвонлари зиготасида пронуклеусни ажратиш қийин бўлгани учун инъекцияни аниқ қилишни қийинлаштиради. Шунга қарамай Ҳаммер ва бошқалар 1985 йилда биринчи бўлиб трансген чўчка олдилар. Лекин тажрибалар маҳсули жуда паст еди. Масалан, битта трансген кўзи олиш учун 1032 зиготага инъекция қилиш, 20 та трансген чўчка боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъекция қилишга тўғри келади.

Зооинженерлар учун генларни ҳайвон ҳужайрасига киритиш ва геномига тартиб

билан жойлаштириш усуллари муҳим ҳисобланади. Ҳозирги вақтда шу соҳада бир неча хил методлар ишлатилади. Жумладан вирус билан киритиш, химиявий, физиковий ёл билан, ҳужайраларни қўшиш ва янги усул-ретровирусни ишлатиш.

Биринчи усулда ДНК сақлайдиган вируслар генларни кўчириб ўтказишда вектор сифатида фойдаланилади. Лекин кўпчилик ҳозиргача ўрганилган вируслар киритилган ҳужайрани емирилиши ва ёқ қилиниши (литик вектор) мумкин. Бундан ташқари улар трансформация қилишда ретровирусларга нисбатан кам самара беради. Шунинг учун ҳам уларни ҳайвонларда кенг миқёсда ишлатиш мумкин эмас. Лекин бундай векторлар вакциналарни ишлаб чиқаришда самара бериши мумкин.

Иккинчи усул генларни тартиб билан жойлаштиришда кенг қўлланилади ва бунда ДНК фосфот калсий билан қўшиб ҳужайрага киритилади. Бу усулнинг ва бошқа химик усулларнинг ижобий томони шундаки улар нисбатан оддий ва алоҳида асбоб-ускуна талаб қилмайди, ҳамда инфекция чақирмайди. Шунинг учун ҳам бу усул мутлоқ ҳавфли эмас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам ўзлаштирилишида.

Физикавий усул икки асосий классда-микроинъексия ва электропорация ёли билан олиб борилади. Электропорация нисбатан янги усул бўлиб, ДНК молекуласини электр токи ёрдамида ҳужайра мембранасидан олиб ўтишга ёрдам беради. Лекин бу усул ёли билан генларнинг геномга ўтказилиши хусусияти номаълум.

Микроинъексия усули-самарали ҳисобланиб, кенг қўлланилди. Гордоннинг аниқлашича плазмидли ДНК насилга берилади. Бундай ҳайвонлар, яъни ўзининг геномида экзоген гени бор организмлар трансген ҳайвонлар дейилади.

Қишлоқ ҳўжалиги ҳайвонларининг кўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар кўпайишда айрим гармонларнинг таъсир кучи аниқланган. Масалан, ФСГ (фолликулаларнинг етилиши назорат қилади) ва ЛГ (лютинлаштирувчи гармон). Ген инженерияси олдида мана шу гармонларни биотехнологик усул билан ишлаб чиқиш ва шу билан уларнинг кўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлилиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селекция қилиш ёли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чатиштириш натижасида ва уларни танлаш, саралаш ишлари олиб борилганда қўйларнинг серпушлилигини 40-60%га ошириш мумкин. Лекин шу даражага етказиш учун камида 30 йил керак бўлади. Серпуштлик хусусияти генларнинг полиген таъсирига боғлиқ. Мана шу жиҳатлардан фойдаланиб, ген инженерлик усули билан бурула-ген деб аталмиш генни бошқа қўйлар геномига жойлаб қўйиш туфайли уларнинг пуштдорлигини ошириш мумкин.

Тиббиёт соҳасида эмбрионларни кўчириб ўтказиш бефарзандлик муаммосини ҳал қилишда муҳим аҳамиятга ега. Аммо бу усулнинг уй ҳайвонларини урчитишда қўлланилиши кўпчиликка қоронги бўлса керак. Шунинг учун эмбрионларни кўчириб ўтказишнинг ўзи нима ва бу усулда қандай муаммолар мавжудлиги шу мақсадда кўрсатиб ўтишни ўз олдимизга мақсад қилиб қуйдик.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш - оталанган қиз ҳужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қўйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ёлар билан бажарилмоқда. Масалан: қуй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида эмбрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ёли билан амалга оширилса, қорамолларда ҳамда йилқиларда бу усул махсус асбоблар ёрдамида танага зиён етказмасдан бажарилади. Албатта бу ишларни амалга оширишда мутахассисдан юқори даражада билим ва укув талаб етилади. Бунда ҳар бир ҳайвон турининг тана тузилиши ва физиологиясининг ўзига хослигини унитмаслик керак. Негаки, эмбрионни бир турдаги ҳайвондан олиб иккинчисига қўйиб бўлмайди.

Уй ҳайвонлари ичида эмбрионларни кўчириб ўтказиш қорамолларда яхши ўрганилган бўлиб, бунинг учун эмбрион олинадиган сигир (донор) танасига махсус гормонлар юборилади, натижада улар тухумдонида кўплаб киз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ё'ли билан ана шу киз ҳужайралар оталантирилади ва 6-12 кун ўтгандан кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган эмбрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ё'ли билан идишларга тушириб олинади. Суюқлик ичидаги ебрионлар махсус микроблар ёрдамида топилиб сифати аниқланади. Шундан кейин кўчириб ўтказишга ярайдиган эмбрионлар бошқа сигирлар (реципиентлар) бачадонига махсус катетерлар ёрдамида жойлаб қўйилади. Кўчириб ўтказилган эмбрион "Янги" она қорнида ривожланиб кетиши учун, реципиент сигир куйга келгандан кейинги вақт эмбрион ёшига тўғри келиши керак. Сабаби, донор ва реципиент сигирлар бачадонидаги суюқлик таркиби ана шундагина бир-бирига мос бўлади. Одатда ҳар бир донор учун 5 тадан реципиент тайёрланади.

Мана шу барча техник жараёнлар хатосиз амалга оширилган тақдирда кўчириб ўтказилган эмбрион "янги" она қорнида ўсиш ва ривожланишни давом еттириб 285 кундан кейин тўлақонли бузоқ бўлиб туғилади.

Агар биз шу соҳада қилинган ишлар тарихига назар ташлайдиган бўлсак, эмбрион шаклини тасвирлаш ХВИИИ асрга бориб тақалади. XIX асрнинг охирларида биринчи маротаба Валтер Хип томонидан эмбрионни кўчириб ўтказишга уриниб кўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан 1950 йили биринчи маротаба эмбрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили эмбрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотига қараганда жаҳонда эмбрионни кўчириб ўтказиш усули билан 1981 йили 35 минг бузоқ олинган бўлса, 1995 йилга келиб 1 миллиондан зиёдроқ бузоқ олинди. Бу усул айниқса АҚШ, Франция, Англия, Олмония, Голландия, Исроил каби чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда кенг ё'лга қўйилган. Хуш, бу соҳага шунчалик қизиқишнинг сабаби нимада? Биринчидан ушбу усул билан ҳайвонлар урчишидаги табиий тўсиқ бузилиб улар кўпайишдаги имкониятлар кенгайтирилади. Маълумки, урғочи уй ҳайвонлари бутун умри давомида 5-10 тадан зиёд насл қолдирмайди. Ваҳоланки уларнинг тухумдонида юз минглаб пишиб етилмаган қиз ҳужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ё'л билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишидаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айниқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан эмбрионни кўчириб ўтказиш ё'ли билан йилига 10 ва ундан ортиқ бузоқ олиш мумкин. Бундай бузоқлар ирсий жихатдан бир-бирига яқинлиги билан табиий шароитда олинган бузоқлардан фарқ қилади. Бу еса уларни парваришlashда ва кейинчалик сут маҳсулоти ишлаб чиқишда қўл келади. Бу усулнинг яна бир устунлик томони шундаки, қарилиги туфайли табиий шароитда насл қолдириш имкониятига ега бўлмаган юқори маҳсулдор сигирлардан ҳам кўплаб эмбрионлар олиб реципиент-сигирларга ўтказиш мумкин. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини танлаш ва саралаш туфайли ҳозирги пайтда янги технологияга ҳамда жўғрофий иқлимга мос янги зотлар яратилган. Бундан 100 йил олдин сигирларнинг ўрта сут маҳсулдорлиги йилига 100-200 литрни ташкил қилган бўлса, ҳозирги пайтда бу кўрсаткич айрим мамлакатларда 5 минг литрдан ошиб кетади. Лекин Ўзбекистон шароитида бу кўрсаткич ҳали ҳам паст бўлиб ўртача 2300 литрни ташкил етди.

Эмбрионлар кўчириб ўтказишда донор сигирлар сут маҳсулдорлиги поданикидан 3 минг кг юқори бўлганда яхши самара бериб 5 минг кг дан кам бўлмаслиги керак. Сигирларнинг сут маҳсулдорлигини ошириш учун юқорида айтилган усулни қўллаш яхши натижа беради.

Айниқса ҳозирги пайтда муаммо бўлиб турган масала ҳайвонларни ҳар хил

касалликларга чидамлилигини ошириш борасида бунда ҳам эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Бунинг учун юқори маҳсулдор ҳайвонлардан олинган эмбрионлар, шароитга мослашган, касалликка чидамли реципиентларга қўйилади. Ҳозирги пайтда эмбрионларни музлатиш ва ҳоҳлаган пайта еритиб реципиент ҳайвонларга қўйиш амалиётида - кенг қўлланилмоқда. Махсус музлатгичларда музлатилган эмбрионлар дунёнинг ҳоҳлаган бурчагига олиб борилиш ва шартнома асосида юқори маҳсулдор подалар яратилиши мумкин. Энг муҳими шу пул билан эмбрионларни бир мамлакатдан иккинчисига олиб ўтилганда касаллик тарқалиши еҳтимоли ёқолади.

Бу усулнинг қимматли томони яна шундаки ёқолиб бораётган ҳайвонлар эмбрионлари узок, муддатга музлатилиб улар генофонди яратилади. Эмбрионларнинг кўчириб ўтказишнинг яна бир муҳим томони шундаки, уларни бўлакларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун эмбрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлакларга бўлинади ва ҳар қайсиси биттадан реципиентга ўтказилади. Натижада бир хил ирсиятга ега бўлган ҳайвонлар олинади.

Ҳозирги пайтда чорвачилиги юқори даражада ривожланган мамлакатларда ҳайвонларнинг кунлик ўсишдаги биологик потенциали егалланди. Аммо сигирлар орасида йилига 25 минг ва ундан ортиқ сут берадиган ҳайвонлар мавжуд. Ўртача сут маҳсулотини юқори даражага етказиш учун олимлар томонидан эмбрионлар пронеуклеусига юқори даражада сут беришни назорат қиладиган генларни ўрнатиш устида иш олиб борилмоқда.

Юқорида биз урғочи ҳайвонлар тухумдонидида юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчилик лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олиниб, махсус суюқликларда парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишлаяпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири эмбрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % эмбрионларни жинси тўғри аниқланаяпти. Ана шу муаммолар босқичма-босқич амалга оширилса эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳайвонларни урчитишда асосий усул бўлиб қолади.

Маълумки амалий селекция иккита муҳим ёндошишга боғлиқ, биринчидан ирсий хилма-хиллик ва иккинчидан генотиплар селекциясига. Ҳужайра технологияси ирсий хилма-хилликни яратишда мутлоқ бошқача ёл тутди. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индукциялашган мутант олиш, ҳужайра селекцияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар киради: сигирлар, айниқса юқори маҳсулдор сигирдан насл олиш паст даражада бўлганлиги учун генетик прогресс чекланган бўлади. Мана шу табиий тўсиқни олиб ташлаш усули эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули ҳисобланади. Эмбрионларни кўчириб ўтказиш еса ўз навбатида қуйидаги 4 омилга боғлиқ: 1) кўплаб тухум ҳужайраларни чиқариш ва уларни оталантириш; 2) эмбрионни йиғиш; 3) эмбрионни кўчириб ўтказиш; 4) эмбрионни музлатиш ва сақлаш. Мана шу омиллар ичида биринчиси, яъни кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун, донор сигирлар суперовуляция қилинади. Шуни айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонлар қанча ва қандай сифатда эмбрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум ҳужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармони юборишдан олдин улар тухумдонидидаги сарик таначанинг ҳажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши еътироф етилган. Агар тухумдонлардан бирида ҳажми 10 мм ва ундан каттароқ фолликула борлиги аниқланса, унда ҳайвонларни гармонлар билан ишлов бергандан қатъий назар яхши натижалар бермаслиги олимлар томонидан исботланган. Бундан хулоса шуки, урғочи ҳайвонларни гармонлар билан ишлов беришдан олдин, уларни тухумдонларининг физиологик ҳолати яхшилаб текширилиши керак. Тажрибалар шуни кўрсатдики ҳайвонларнинг ҳаммаси ҳам гонадотропин гармонига бир хил реакция беравермайди.

Гонадотропин гармонларини ҳайвон танасига юбориш улар жинсий даврнинг 10-12 кунларни яхши натижалар беради. Бундан ташқари сифатли эмбрионлар олиш йил

фасллариға ва озиқа тўйим-лилигиға боғлиқлиги тажрибаларда исботланди. Сунъий ёл билан овуляция чақириш кўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврининг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчкалар кўп насл берадиган ҳайвонлар гуруҳиға кириб, улардан эмбрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамасдан гармонлар билан ишлов берилганда 33-38 % кўпроқ эмбрионлар олиш мумкин. Отларда гармонлар билан ишлов берилиб, эмбрионлар олиш тўлиғича ишлаб чиқилмаган. Шундай қилиб, юқоридаги маълумотлардан аён бўладики, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, эмбрионлар олиш кўп таъсирға боғлиқ. Шунинг учун ҳам ҳайвонлардан сунъий ёл билан эмбрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли миқдорда эмбрион олишда муҳим аҳамият касб этади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сариқ таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум хужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган эмбрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум хужайраларни ташкил қилади.

Ҳозирги пайтда эмбрионларнинг сифатини аниқлаш уч ёналишда олиб борилмоқда; 1) эмбрионларнинг ташқи кўринишидаги бир-бирига боғлиқлик, уларнинг ёшига мувофиқлиги ва улар кўчириб ўтказилгандан кейин яшаб кетиши; 2) эмбрионлари модда алмашинувини ўрганиб, улар ҳаётчанлигини аниқлаш; 3) эмбрионлар қобиғи ва бластомерлар ситоплазмасининг ҳар хил бўёқларга нисбатан адсорбсион қобилятини ўрганиш. Бу усулларни барчаси ҳам камчиликлардан ҳоли емас. Шунга қарамасдан ҳозир амалиётда эмбрионлар фақат уларнинг морфологик кўриниши билан баҳоланиб, сифати аниқланмоқда.

Маълумки, эмбрионларни кўчириб ўтказишда баҳоси юқори бўлган оталанган тухум хужайралардан фойдаланиш яхши самара беради.

Реципиент сигирларга эмбрионларни кўчириб ўтказиш жараёни донор-сигирлардан эмбрионларни ювиб жойлаштирилган асбоб (катетер) тухумдонидида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.

Отларда эмбрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ёли билан амалга оширилиши мумкин. Куй ва чучкаларда бу жараён фақат жарроҳлик усули билан амалга оширилади. кўчириб ўтказиладиган эмбрионлар сони чучкаларда 4 тадан кам бўлмаслиги керак. Бундан кам бўлган ҳолда эмбрионлар бачадон деворига ёпишмайди (инплантация) ва уларда кейинги ривожланиш бўлмайди.

Эмбрионларни кўчириб ўтказишда уларни донор-сигирдан ювиб олингандан кейин реципиент-сигирга жойланганига қадар бўлган вақтда қандай сақлаш муҳим аҳамиятга ега. Бу давр 37 градусли ҳароратда, кўпчилик олимларнинг фикрича, 2 соатдан ошмаслиги керак. Лекин бу даврни узайтириш учун эмбрионларни махсус асбобларда музлатиш ва керак бўлганда еритиб фойдаланиш мумкин.

Эмбрионларни музлатиш махсус автомат асбобларда амалга оширилиб, белгиланган дастурда ишлайди, у 3 қисмидан иборат бўлиб: электрон блоки, музлатиш камераси ва суюқ азот сақланадиган идишдан иборат. Музлатгич вазифасини азот пар бажаради. Ҳозирги пайтда эмбрионларни музлатиш ва еритиб реципиент ҳайвонларга кўчириб ўтказиш натижасида кўплаб бузоқ, кўзи ва чўчка болалари олинмоқда.

Эмбрионлар донор ҳайвонлардан ювиб олингандан кейин, ёки сунъий шароитда тухум хужайралар ўстирилиб, ин витро шароитида оталантирилгандан сўнг ҳар хил микроманитуляция ишлари олиб борилиши мумкин, Масалан, эмбрионлар ядросини бошқа ядросизлаштирилган тухум хужайрага кўчириш кўплаб бир хил насл олишни клонлашни беради. Бу усул айниқса сигирларни хирургиясиз ёл билан ювиш ишлатила бошлангандан

кейин кенг қулоч ёйди. Агар юқори маҳсулдор донор-сигиридан бешта 32 хужайрали эмбрион ювиб олинса ва ҳар бир хужайра ядроси алоҳида тухум хужайрага кўчирилса, бир донордан 160 эмбрион олинган бўлади. Бригц ва Кинг (1952) аниқлашича эмбрионлар ёш пайтида улар ядроси кўчирилса хужайранинг ривожланиши яхши бўлади. Ядроси кўчириб ўтказиладиган эмбрион кечки стадияда бўлса, хужайра ривожланиши бўлмайди. Чунки эмбрионлар бу даврда узларини РНК синтезини амалга ошира бошлайди. Олдинги даврда еса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб қўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш эмбрионлар ядросини қайтадан программлаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум хужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир эмбриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

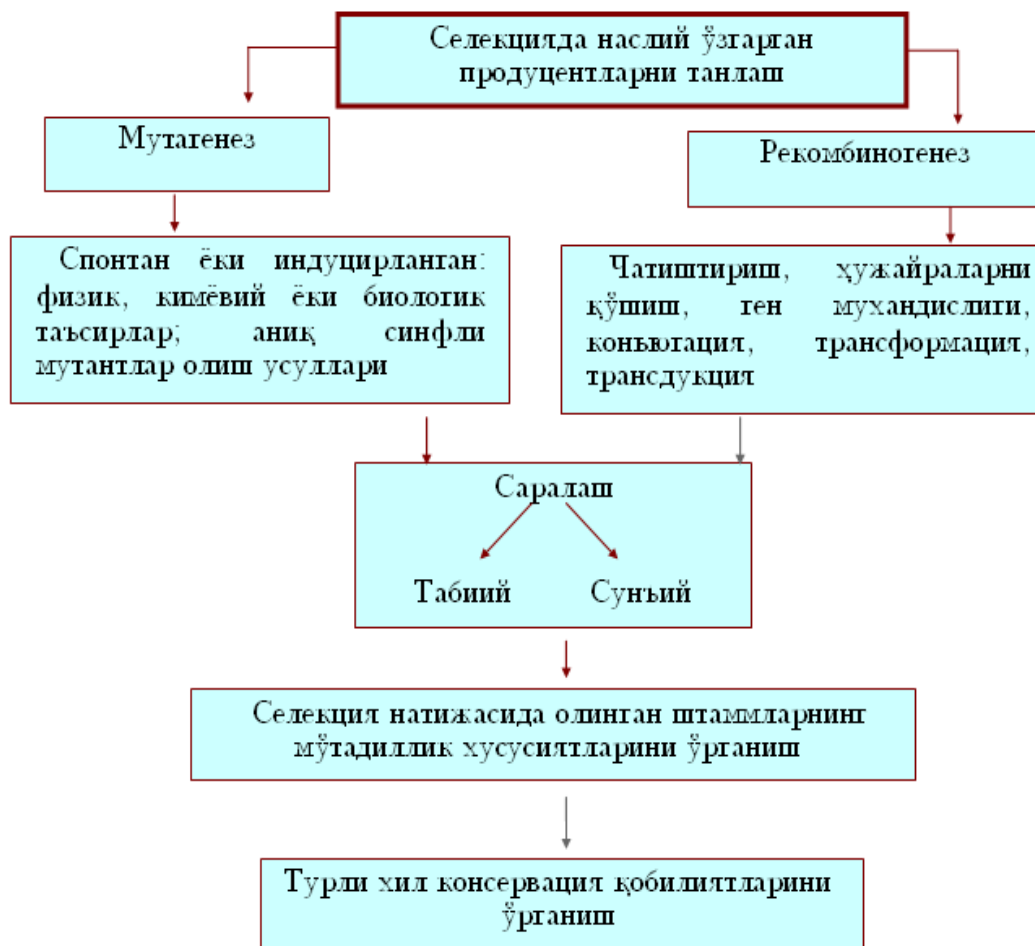
Продусентларни яратиш усуллари

Микроорганизмларнинг табиий штаммларини ҳосилдорлиги кўпинча талаб даражасидан паст бўлади.

Ҳосилдор штаммлар яратиш учун йўналтирилган селекция - усулидан фойдаланилади (1-чизма).

Бунинг учун кимёвий мутагенлар ёки радиацион нурлардан фойдаланилади. Селекция ва танлов ишлари баъзида йиллаб вақт егаллайди ва натижада микроб ҳосилдорлигини 100 ва ундан ҳам кўпроқ маротабалаб ошириш мумкин бўлади. Масалан, ҳозирги даврда саноат усулида ишлатиб келинаётган пенициллин антибиотики синтез қиладиган продусентнинг фаоллиги дастлабки штаммларга қараганда 10 минг маротабадан ошиб кетган.

Юқори фаолликга ёки ҳосилдорликга ега бўлган штамм яратиш учун селекционер, табиий штаммни генетик материалларини ўрганиш борасида ўта мураккаб, ўта нафис ишларни амалга ошириши лозим бўлади. Бунда, генларни рекомбинацияси билан боғлиқ бўлган барча усуллардан, хусусан: конъюгация, трансдукция, трансформация ва бошқа генетик жараёнлардан фойдаланишга тўғри келади (28-расм).

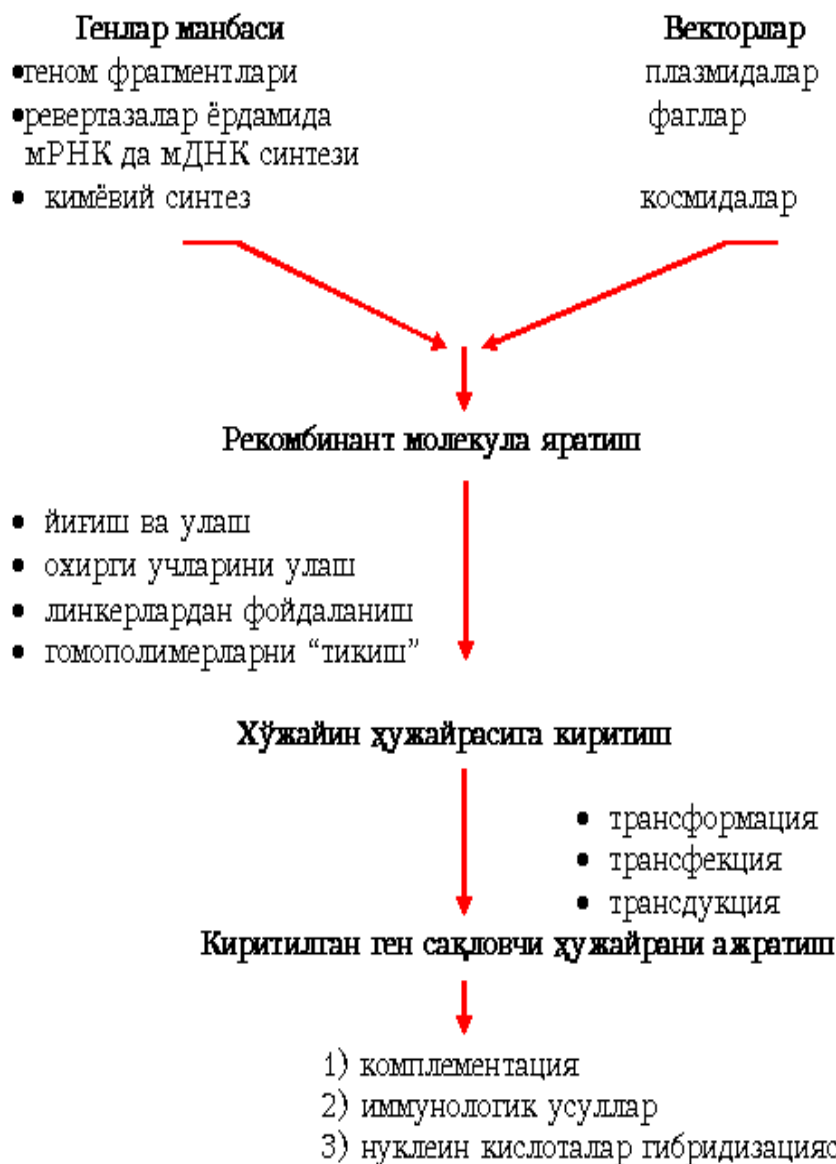


28-расм. Микроорганизмлар селекцияси

Масалан, конъюгация усули (бактериялар орасида генетик материаллар билан алмашиш), нефт қолдиқларини фаол парчаловчи Псевдомонас путида штаммини яратишда самарали фойдаланилган еди.

Кўпинча трансдукция (бактерия вируслари-бактериофаглар ёрдамида бир бактериядан бошқа бактерияга генлар ўтказиш) ва амплификация (керакли генларни нусха сонини кўпайтириш) усулларида кенг фойдаланиш орқали ҳар хил физиологик фаол моддалар синтез қилувчи ҳосилдор штаммлар яратилган. Кўпгина микроорганизмларда антибиотик синтез қилувчи генлар ва уларни бошқарувчилари хромосомаларда эмас, балки плазмидаларда (хромосомадан ташқаридаги ДНК) жойлашган бўлади. Бундай пайтда амплификация орқали ҳужайрадаги плазмидалар сонини кўпайтириш орқали штаммларни ҳосилдорлигини ошириш мумкин.

Селекция ишларини яна бир йўли бу ҳар-хил бактериялар протопластларини бир-бирига бирлаштириш натижасида генетик рекомбинантлар олиш йўлидир (29-расм).



29-расм. Генларни клонлаш стратегияси

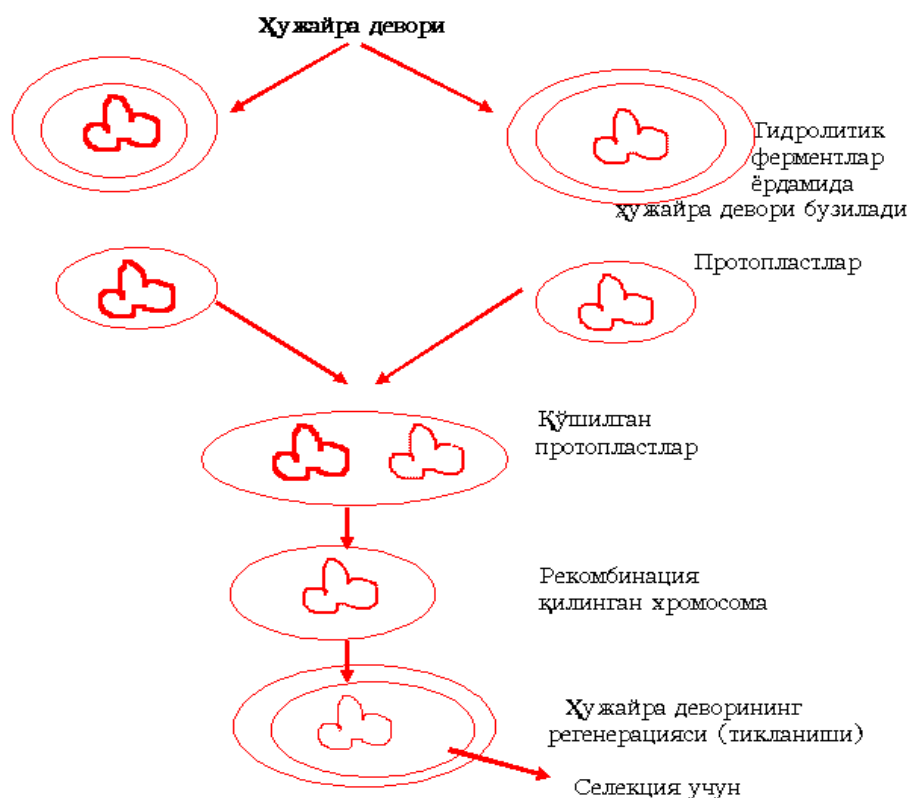
Масалан: Стрептомйцес рептомйцес бактериясининг икки хил штаммларидан олинган протопластларни бир-бирларига бирлаштириш оқибатида С-рифамисин синтез қилувчи ҳосилдор штамм яратилган. Рифамписин синтез қилмайдиган Ноцардиа медитерранеи штаммлари протопластларини бир-бирларига қўшиш оқибатида рифамписинни 3 янги ҳосиласини синтез қилувчи штамм яратилган.

Протопластларни қўшилиши орқали табиий шароитда бир-бирлари билан қўшилмайдиган микроорганизмларни генетик материалларини бирлаштириш ҳам мумкин.

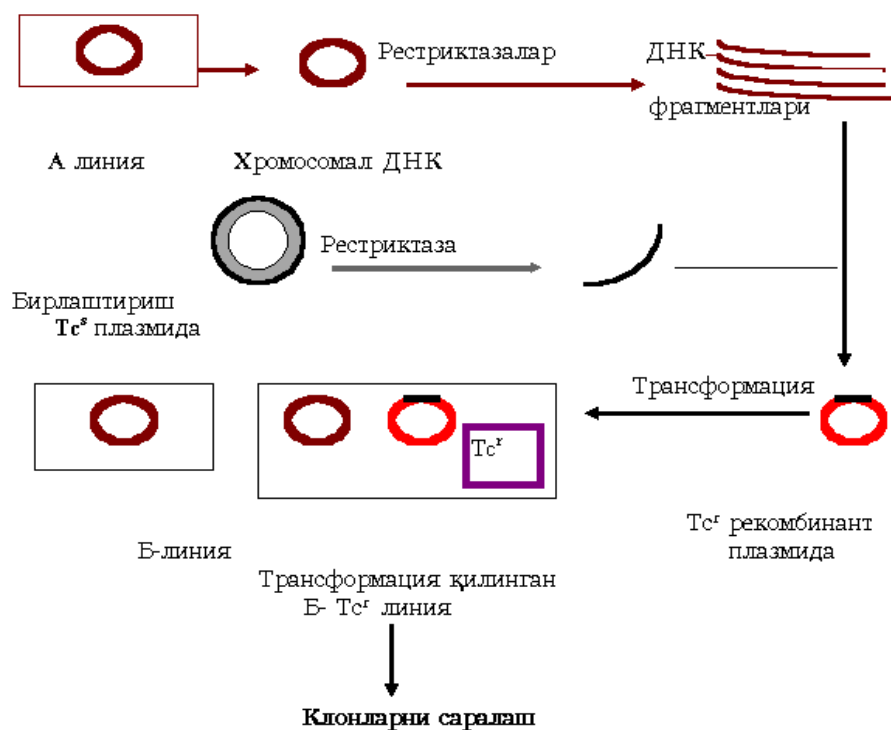
Микроорганизм – продуцентларни ген муҳандислиги усуллари ёрдамида яратиш

Ўтган асрнинг 70 – йилларида биотехнологияда янги тажриба технологияси – генетик (ген) муҳандислик яратилди. Бу усулнинг асосида ҳужайрадан ташқарида рекомбинант

ДНК яратиш ётади. Бу технологиядан фойдаланиш оқибатида генларни соф ҳолда ажратиш, уларни модификация қилиш, бирини иккинчисига улаш, “генлар мажмуаси” яратиш, оқибатида бутунлай янги хусусиятига ега бўлган оқсил синтез қилиш имконияти яратилди ва уни оқсиллар муҳандислиги деб аталади (4–чизма).



30-расм. Протопластларнинг қўшилиши орқали махсусдор мутант штаммлар олиш механизми



31-расм. Плазмида ДНК си ва бактерия хужайрасидан фойдаланиб, генини клонлаш чизмаси

Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Кейин, бу бирикма (вектор ген) микроорганизм ҳужайрасига юборилади (трансформасия) ва у ерда амплификасия (кўпайиш) амалга ошади.

Натижада бир геннинг бир неча нусхаси – клон пайдо бўлади. Шунинг учун ҳам бу йўлни клонлаш деб аталади.

Агар клонлаш мақсадида ҳамма генлар сақловчи одам ДНК си ишлатилса, одамнинг ген кутубхонаси (клонотека) ҳосил бўлади.

Бу усулда бактерияларга клонлаштирилган инсон, ҳайвон ёки ўсимликлар генлари тўғридан-тўғри бактерияда фаолият кўрсата олмайди.

Ишлаш учун еса, уларни бактериядан ажратиш, бактерия генини бошқарувчиси (регулятори) билан жиҳозлаш ва қайтадан бактерияга киритиш зарур.

Бугунги кунда ҳар хил генлар сақловчи ва керакли маҳсулот синтез қилувчи бир қатор трансген бактериялар яратилган ва муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда.

Шу сабабли ҳам табиий штаммлар ёрдамида олинадиган маҳсулотлар (биринчи авлод маҳсулотлари) билан бир қаторда трансген штаммлар ёрдамида рекомбинант оксиллар (иккинчи авлод маҳсулотлари)ни саноат миқёсида ишлаб чиқариш йўлга қўйилган. Биологик маҳсулотларни учунчи авлоди – табиий оксилларнинг вазифаларини тўлиқ бажара оладиган, аммо табиий бўлмаган маҳсулотларни синтез қилиш натижасида пайдо бўлади.

Ген–мухандислиги усуллари (рекомбинант ДНК технологияси) тиббиёт учун зарур бўлган, қимматбаҳо оксил моддалари ишлаб чиқариш ёки кўп тонналик оксил моддалари ишлаб чиқариш жараёнларида кенг қўлланиб келинмоқда. Энг аввало инсон организмида синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган оксил ва пептидларни синтез қилишни йўлга қўйиш катта аҳамият касб етади.

Ген мухандислиги муаммолари билан шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараёни асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ емас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оксил моддаларини керакли меъёрга ушлаб туриш, уларни модификасияга учраб, микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир.

Ҳужайра биотехнологияси - ҳужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Ҳужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир узгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмдан ташқирда яшаши ва кўпайиши учун шароит тугдириб бериш лозим. Ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда (*ин vitro*) ўстириш, усули ажратилган тўқималар култураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли, катта аҳамият касб етди.

Биотехнология узок - узоклардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида утган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният энг аввало узи учун ута зарур бўлган яъни озик-овқат, энергетика, захира (ресурс), атроф - муҳитни муҳофазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон тўқималари, ҳужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида еътибор берилмоқда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқд технологияларга нисбатан бир қатор устунликка егалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к. Шунинг билан бир қаторда, биотехнология стандарт жиҳрзлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иклим шароитига карамасдан ҳамда кўп майдон егалламаган ҳолда жараёнларни йил бўйи утказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва ҳайвонларни ҳужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги ролини уч юналишда куриш мумкин:

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соҳалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, эфир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боғлиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар каттиқ (агарли) ёки суюқ озуца муҳитида ўстирилган каллус туқималардан олинади. Ҳужайра технологияси асосида диосгенин - диоскоре уужайрасидан; аймолин - илон рацвольфи уужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар - женьшен хужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг билан керакки, ўстириладиган ҳужайраларни ҳосилдорлиги, бутун ўсимликни ҳосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти бўлмаган шароитда (совуқ ёки иссиқ иқлимли минтакаларда), уларни ҳужайраларини бутун йил мабойинида устриш мумкин.

Иккинчи йўналиш - ажаратиб олинган ҳужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва ту орсали тез ривожланувчи, хор хил таъсири муҳит таъсирига

Назорат учун саволлар

- 1 *Хайвон ген муҳандислиги ўзига хос томонларини сананг?*
- 2 *Хайвон ҳужайраларнинг ўзига хос маркерлари қандай тузилган?*
- 3 *Вирусларни вектор сифатида қўллашнинг аҳамиятли томонлари?*
- 4 *Ўсимлик ҳужайраларига генларни киритиш ҳақида тушунча беринг?*
- 5 *Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси ҳақида тушунча беринг?*
- 6 *Трансген ўсимликларнинг яратилиши ва аҳамияти?*
- 7 *Хайвонлар ген муҳандислиги ҳақида тушунча беринг?*
- 8 *Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш ҳақида тушунча беринг?*

8-МАЪРУЗА.

ҲУЖАЙРА МУҲАНДИСЛИГИ.(4 с)

8.1 Ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш. Ҳужайра культуралари. 2с)

8.2 Биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш. (2с)

Режа:

1. Ҳужайраларни ўстириш ва сақлаш
2. Ҳужайраларни культуралари
3. Ўсимлик ҳужайрасини ўстиришдаги фарқлар
4. Биотехнологияда одам ва ҳайвон ҳужайра культураларини қўллаш
4. Протопластларни қўшилиши
5. Соматик ҳужайралар гибридазацияси
6. Ҳужайра культураларини ҳосил қилиш.
7. Ўсимлик ҳужайраларини ўстириш
8. Ҳайвон ҳужайраларини ўстириш

Таянч сўзлар: Хужайра, ўстириш, сақлаш, каллус, каллусогенез, хужайра ва тўқима культуралари, протопластлар, гибридомалар, озуқа муҳити, хужайра, ўстириш, сақлаш, каллус, каллусогенез, хужайра ва тўқима культуралари, протопластлар, гибридомалар, озуқа муҳити

Адабиётлар: А- 1, А-3, А-3, Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Биотехнологиянинг янги босқичи ноанъанавий объектлар – кўп хужайрали юқори организмларнинг тўқима ва хужайралари культураси, ҳамда микроорганизмларнинг культурасини олиш имконини берди. Микроорганизмлар культурасига нисбатан юқори организмлар культуралари биотехнологиянинг **янги объекти** ҳисобланади. Ўсимликлар культурасини олиш методи XX асрнинг 70-йилларида яратилган.

Ўсимлик хужайраларини культурасини олишнинг асосий типи каллус тўқимасини, баъзида эса ўсимликларнинг ўсма хужайралари культураси олишдир. Ўсма хужайралари культураси чуқур ва юзаки экилганда кўринишидан ва морфологик жиҳатдан деярли фарқ қилмайди. Уларнинг асосий фарқи шундаки, ўсма хужайралари гормонга боғлиқ эмас, шунинг учун уларнинг озуқа муҳитига фитогормонлар қўшиш керак эмас. Ундан ташқари ўсма хужайралардан органогенез жараёнида илдиз ёки куртаклар унмайди. Каллус хужайралари культураси эса тўсатдан гормонга боғлиқ бўлмай қолиш хусусиятига эга. Каллус хужайралари бўлиниши натижасида (юқори ўсимликларга хос бўлган хужайра дифференциациясининг бир типи) **каллус тўқималари** ёки каллус ҳосил бўлади.

Каллус хужайралари культурасини олиш учун юқори ўсимликларнинг турли органлари (эксплантлар)дан бир қисм (фрагмент) олиб стериллик қоидаларини сақлаган ҳолда уни пробирка, колба ёки Петри чашкасидаги сунъий озуқа муҳитига экилади.

Эксплант хужайраларининг дедифференцияланиши ва **каллусогенез** жараёнининг хусусиятлари олинган тўқиманинг хусусиятларига боғлиқдир. Ўсимликларнинг махсус тўқималари (паренхима, илдиз ва поя, барг мезофили ва б.) нинг хужайралари озуқа муҳитида ўзига хос функцияларининг йўқотиб дедифференциялашиши ва фаол бўлинадиган хужайра ҳолатига келиши керак.

Ўсимлик хужайра ва тўқималари культуралари ўстириладиган **озуқа муҳит таркибида** минерал тузлар (макро ва микроэлементлар), углевод манбаи (сахароза ёки глюкоза), витаминлар ва ўсиш регуляторлари бўлиши керак. Зарур ҳолларда озуқа муҳитига турли комплекс бирикмалар (казеин гидролизати, аминокислоталар аралашмаси, ачитқи экстракти, турли ўсимлик экстрактлари) қўшилади. Янги объект билан ишлаётганда озуқа муҳитларининг оптимал таркибини танлай билиш керак.

Юза усулда экилган каллус тўқималари ранги оқ, сарғиш, яшил, қизил, аниқ бир анатомик структурага эга бўлмаган аморф массага эга бўлиб, консистенцияси жиҳатидан ҳам фарқланади.

Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик хужайралари культуралари **суспензион культуралар** дейилади. Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик хужайралари культуралари каллус культураларининг юза экиш усулидан афзалликка эга. Суюқ муҳитда метаболизм ва хужайра популяцияси ўсишига турли экзоген омиллар билан таъсир этиш мумкин. Суспензион культуралар биокимёвий ва молекуляр-биологик тажрибалар – ферментлар индукцияси, генларни экспрессияси, мутантларни яратиш ва уларни тавсифлаш учун қулай.

Суспензион культуралар учун хужайралар каллус тўқималаридан олинади. Сўнг улар доим аралаштириб турган ҳолда суюқ озуқа муҳитига ўтказилади. Суспензион культураларни ўсимлик тўқималаридан ҳам олиш мумкин, фақат бу усул кўп вақт талаб қилади. Бунинг учун эксплант хужайраси аввал бирламчи ҳосил қилиши керак, сўнгра эса

озуқа муҳитида кўпайиб, суспензия кўринишида ўсадиган ҳужайра линиялари учун манба бўлиб ҳисобланади.

Ҳужайра культураларида ўсимликлар учун хос бўлган бирикмалар: алкалоидлар, гликозидлар, полисахаридлар, эфир мойлари, пигментлар ва б. мавжуддир. Ўсимлик ҳужайраларидан фермент препаратларини ишлаб чиқариш мақсадида фойдаланиш табиий ёки сунъий манбардан қимматли маҳсулотларни олиш имконини беради.

Мутант, гибрид ёки трансформацияланган ҳужайраларни клонал селекциясида изолирланган ҳужайралар ва регенерацияланган протопластларни ўстириш методи орқали амалга оширилади.

Ўсимлик протопластлари – мембрана билан чегараланган, ички ҳужайравий органеллалари таркиби сақланган структуравий тузилмадир.

Протопластлар 2 усулда ажратиб олинади:

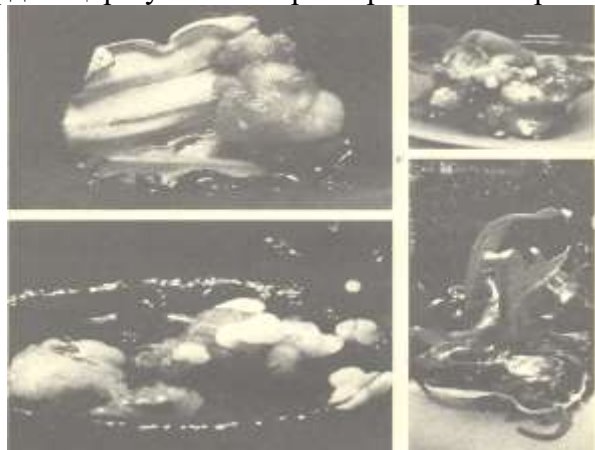
1. Механик усул. Биринчи бор ўсимлик ҳужайраси протопластлари 1892 йили телорез сув ўсимлиги ҳужайрасида плазмоллиз ҳодисасини ўрганиш жараёнида ажратиб олинган. Бунинг учун ўсимлик тўқимасидан кесма олинади ва 0,1 М ли сахароза эритмасига солинади. Протопластлар “бужмайиб” ҳужайра деворидан ажралади, сўнг скапель ёрдамида кесма кесилади ва протопластлар муҳитга ажралади.

2. Ферментатив усулда ҳужайра девори ферментлар ёрдамида йўқотилади. Бунда 3 хил тип ферментлар - целлюлаза, гемицеллюлаза ва пектиназадан фойдаланилади.

Протопластлар культурасини олиш учун 2 хил ёндошилади: суяқ муҳит томчиларида инкубация қилинади ва агарли қатламга ўтказилади.

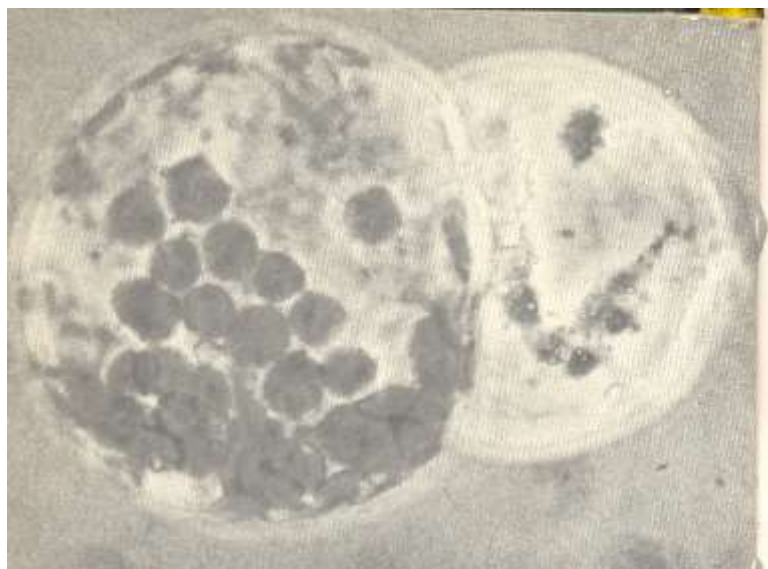
Изолирланган протопластлар ҳужайра деворини тиклагунга қадар қисқа вақт ичида бир-бири билан қўшилиши мумкин. Бу жараён нафақат бир типдаги ўсимлик протопластлариаро, балки гетеролик протопластлараро бўлиши ҳам мумкин. Шу усул билан 2 турдаги тамаки ўсимлигини протопластларини қўшиб регенерацияланган ўсимлик олинган. 1978 йили эса картофель ва тоmat ўсимликларининг протопластлари қўшилган. Бунинг натижасида томатнинг касалликларга чидамли факторлари картофелга кўчирилган.

Соматик гибридизация – ўсимликларни гибридини яратишнинг янги методи бўлиб, бунда гибридланаётган ҳужайралар сифатида гаметалар (репродуктив ҳужайралар) эмас, балки протопластлар олинадиган ўсимлик танасининг ҳужайралари (соматик) қатнашади. Протопластларни қўшиш билан ҳужайра геномидан ташқари 2 та турли цитоплазмалар ҳам қўшилади. Кўпгина ҳолларда юқори ўсимликларни протопластларини қўшиш



32-Расм.

ин витро тажрибаларида пальмани (Элаеис гуинеенсис) клонлаш. *Пальманинг ёш барглари бўлақларидан каллуслар оlinиб эмага эқилади. Иккинчи муҳитда улар кўпаяди ва учинчи муҳитда каллуслар эмбрионидлар ҳосил қилади. Бундай соматик эмбрионегенездан сўнг эмбрионидлар ривожланиб, улардан аввал кластер, кейинроқ ёш ниҳоллар унади.*



33-расм

Протопластларни қўшилиши.

Картофель баргидан олинган альбюбинос протопласт ва томат баргининг соғлом протопласти қўшилган. Бундан мақсад томат генларининг касалликларга чидамли геномларини картофел геномига киритишидир.

натижасида ёки гибрид ёки цибрид ҳосил бўлади. Цибрид ўсимликда иккала ўсимликнинг цитоплазмаси, ядро эса фақат биттасиники бўлади.

Гетерологик протопластларни қўшаётганда мос келадиган маркерни танлаш керак. Бундай маркер сифатида пластидалар ёки хлоропластлар бўлиши мумкин. Пластидалардан ташқари биокимёвий ёки генетик маркерлар: масалан, изоэнзимли таркиб, нуклеин кислоталарнинг хусусиятлари, маълум бир моддаларга чидамлилиқ ва хромосомалар ёки ҳужайра кариотиплари сони ҳам бўлиши мумкин.

Протопластлар лабиль тузилмалар бўлгани учун соматик гибридизациялаш йўли билан ҳужайрага бегона материалларни, ҳамда уларга изолирланган ДНК ёки бошқа ҳужайраларнинг органелларини киритиш мумкин. Ҳозирда ядро, хлоропластлар трансплантация қилинган.



34-Расм. Барг протопластидан (1) олинган каллусдан (2) картофелнинг регенерацияланиши (3-5)

Ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраси культураларини ўстириш технологиялари. Биотехнологик мақсадлар учун организмларнинг ёппасига культурасини олиш технологиялари бактериялар, ачитқилар ва мицелиал замбуруғлар учун ишлаб чиқилгандир. Яқин вақтларга келиб ўсимлик ва ҳайвон ҳужайралари культурасини яратиш бўйича ишлар бошланди. Ўсимлик ҳужайраларини культураси олиш техникаси ёрдамида кўплаб мамлакатларда маълум бир ўсимликларни учун экиш материали бўлиб келмоқда.

Ушбу методлар органогенез ва ниҳолларни амплификациялаш, сўнгра уларни тупроққа экиш бўйича қилинган ишлар натижасида такомиллаштирилмоқда. Лекин, кўплаб ўсимликлар ҳужайраларининг суспензион культураларини яхлит ўсимликка хос бўлган маҳсулотларни олиш (никотин, алкалоид, женьшень) мақсадида экиш кенг миқёсда ишлаб чиқилган ва у қўлланиб келинмоқда. Дигиталис, ясмин, ялпиз, кодеин каби қимматбаҳо препаратларни ишлаб чиқариш самарали ҳисобланади. Ўсимлик ҳужайралари суяқ доимо аралаштирилган муҳитда культурасини олишда ишлатиладиган ферментацион методлар микробиология технологиясига хосдир. Ўсимлик ҳужайралари бактерияларга нисбатан секин ўсишига қарамай, уларнинг ҳарактеристикаси бир-бирига яқиндир.

Шунга қарамай, муҳим органик бирикмаларни фақат ўсимлик ёки ҳайвон ҳужайралари синтезлайди. Бу эса ўз навбатида янги технологияларни яратишни талаб қилади.

Ҳайвон ҳужайралари ё суспензия кўринишида ёки қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўстирилади. Бундай ҳужайралар, масалан, ХеЛа (инсон ўсмаси ҳужайраси) иккала ҳолатда ҳам ўсиши мумкин; лимфобластом ҳужайралар суспензион культурада, нормал диплоид ҳужайралар эса қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўсади.

Охириги пайтларда ҳужайра ўсишини назорат қилувчи системалар «бухта» кўринишида ўралган, газни ўтказувчан тефлон трубкаларга асосланган. Бундай шароитларда кўплаб ҳужайраларни культурасини олиш мумкин. Яна бир самарали метод, бу ҳужайраларнинг унча катта бўлмаган маржонлар (шарчалар, микроташувчилар)га бириктирилишига асосланган усулдир. Шарчалар сефадекдан ясаиб, юзаси $7 \text{ см}^2/\text{мг}$ бўлиши мумкин. Шарчалар суспензион ҳолатда суза олади ва уларда турли типдаги ҳужайралар ўсиши мумкин. Бу усул ёрдамида инсон интерферони олинмоқда.

Микроорганизм ҳужайраларини имобиллаш

Микроорганизмларнинг имобилланган ҳужайралари ҳақидаги илк мақолалар XX асрнинг 70-йилларида пайдо бўлди, саноатда эса улар 1974 йили Японияда қўлланила бошланди. Микроорганизмларнинг имобилланган ҳужайраларидан аспарагин кислотаси олинган.

Имобилланган ҳужайралар имобилланган ферментлар, ҳамда эркин ҳужайралардан ҳам бир қатор афзалликларга эгадир. Булар қуйидагилардир:

- ферментларни ажратиш ва тозалашга кетадиган ҳаражат сарфланмайди;
- реакция маҳсулотларини ажратиш ва тозалашга кетадиган сарф- ҳаражатларни камайтиради;
- нисбатан юқори фаоллик ва барқарорликка эга;
- узлуксиз ва ярим узлуксиз автоматлаштирилган жараёнларни яратиш имкони туғилади;
- экзоген кофакторларсиз полифермент системалар узок фаолият кўрсатиш хусусиятига эга бўлади.

Имобилизациялаш учун турли ҳолатдаги, яъни тирик ва турли даражада зарарланган ҳужайралар ишлатилиши мумкин. Бир босқичли реакцияларни иккала ҳолатдаги ҳужайралар амалга ошира оладилар. Полиферментли реакцияларни эса тирик ҳужайраларни қўллаш билан амалга оширилади, бундай ҳужайралар узок вақт давомида АТФ ва коферментларни (НАДФ, НАД) ренегенерациялай олиши керак.

Имобилланган микроорганизмларнинг ферментатив фаоллигидан фойдаланиш узок вақтларга бориб тақалади. Бундан 150 йил аввал сиркани тез олиш усули ёғоч қипиғига адсорбцияланган микроорганизмларга асосланган эди. Ҳужайраларни имобиллаш ферментларни имобиллаш методи билан жуда яқин.

Кимёвий имобиллаш методи фаоллаштирилган ташувчи билан ковалент боғлар ҳосил қилишга асосланган.

Физикавий методлардан адсорбция ва агрегациядир.

Хужайраларни турли геллар, мембраналар, толаларга киритиш йўли билан иммобиллаш кимёвий ва физикавий ўзаро таъсирлашишларга асосланган. Кимёвий методлар бошқа методларга нисбатан кам ишлатилади. Хужайралар кўпроқ геллар, мембраналар ва толаларга киритилади. Бундай иммобилланганда хужайралар узоқ вақт ҳаёт фаолиятини сақлаб қолади ва озуқа муҳитида кўпая олади. Иммобилланган хужайраларнинг биокаталитик фаоллиги ҳозирги вақтда фан ва техниканинг турли тармоқларида ишлатилади:

- аминокислотлар, органик кислоталар, антибиотиклар, стероидлар, углеводлар, углеводородлар, нуклеотидлар ва нуклеозидлар каби бирикмаларнинг биосинтези ва трансформацияда;
- пиво ва вино ишлаб чиқаришда;
- оқава ва табиий сув ҳавзаларини тозалашда;
- оқава сувларни металллардан тозалашда;
- қуёш энергиясининг ассимиляциясида;
- водородли қуёш элементларини тайёрлашда;
- азотфиксацияда;
- аналитик мақсадларда электродларни тайёрлашда.

Микроорганизм хужайраларини иммобиллаш, айниқса, аминокислоталар, органик кислоталар ва антибиотикларни синтезлаш бўйича япон олимлари томонидан кўплаб ишлар қилинган. Москва давлат университетиде аспарагин кислотасини олиш методи яратилган. Полиакриламид гелга киритилган *Э. coli* хужайралари аспарагин кислотасини олиш учун жуда қулайдир.

Микроорганизмлардан ташқари, физиологик фаол бирикмаларни синтезлаш мақсадида ўсимлик ва ҳайвон хужайраларини ҳам иммобиллаш мумкин.

Хужайра органелларини ҳам иммобиллаш билан ҳозирда катта имкониятлар очилмоқда. Бу эса, биотехнологиянинг иммобилланган хужайраларни қўллаш билан боғлиқ йўналишининг истиқболли эканлигини исботлайди.

Ўсимлик хужайраларини иммобиллаш. Ўсимликларнинг тўқима ва хужайра культуралари иккиламчи метаболитларни олиш учун асосий манба ҳисобланади. Иккиламчи метаболитларни кўплаб миқдорда олиш учун ўсимлик тўқима ва хужайраларини иммобиллаш методи ишлаб чиқилган. 1966 йилда Мосбах *Умбилицариа пустилата* лишайнигининг хужайраларини полиакриламидли гелга киритган. Бир йилдан сўнг ван Вецель ДЭАЭ микрошарчаларида ҳайвон эмбриони хужайраларини иммобиллаган. Кейинчалик хужайралар, асосан микроорганизм хужайралари турли субстратларда иммобиллана бошланди. Хужайраларни иммобиллашнинг 4 хил методи бор:

1. Хужайра ёки хужайра органелларини инерт субстратда (Сатҳарантхус росеус хужайралари, Дигит ДЭАЭ, агарозали шарчалар, желатин ва б.) иммобиллаш.

2. Хужайраларни инерт субстратларда адсорбциялаш. Хужайралар альгинат, полистирол ва полиакриламид билан зарядланган шарчаларга ёпиштирилади. Бу метод билан ҳайвон хужайралари ва *Сацчаромйцес уварум*, *С. цевевисиае*, *Сандида тропицалис*, *Э. Соли* хужайралари иммобилланган.

3. Хужайраларни биологик макромолекулалар (масалан, лектин) ёрдамида инерт субстратда адсорбциялаш. Кам ишлатиладиган методдир.

4. КМЦ типигаги бошқа инерт ташувчи билан ковалент боғлаш. Бу метод ҳам кам ишлатилади.

Кейинги пайтларда ўсимлик хужайраларини иммобиллашга қизиқиш ортган. Бунинг сабаби, суспензион ёки каллус культураларига нисбатан иммобилланган хужайралар ёрдамида иккиламчи метаболитлар кўплаб олинади.

Иммобилланган хужайралар бир қанча афзалликка эга:

1. Инерт субстратларда иммобилланган хужайралар суюқ суспензион культурада ўсувчи хужайраларга нисбатан биомассани секинроқ ҳосил қилади. Бу ердаги ўсиш ва

метаболизм ўртасидаги боғлиқлик 2 типдаги механизм орқали амалга ошади. 1-механизм бўйича ўсиш иккиламчи метаболитлар синтезига билвосита таъсир этиб хужайранинг агрегацияланиш даражасини белгилаб беришига асосланган. 2-механизм эса ўсиш тезлигининг кинетикаси билан боғлиқдир. Бунда метаболизмнинг биринчи ва иккинчи йўллари турлича рақобатлашади. Муҳит шароити тез ўсиш учун қулай бўлса, биринчи навбатда иккиламчи метаболитлар синтезлана бошлайди. Тез ўсиш блокланган ҳолда эса биринчи навбатда бирламчи метаболитлар синтезланади. Шундай қилиб, иммобилланган хужайраларнинг ўсиш тезлигининг паст бўлиши метаболитларни ҳосил бўлишини орттиради.

2. Иммобилланган хужайралар секин ўсишидан ташқари бир-бири билан физик контактда ўсади ва бу кимёвий контактларда ўз аксини топади.

3. Атроф-муҳитнинг кимёвий таркибини ўзгартириш билан иккиламчи метаболитларни ҳосил бўлишини бошқариш мумкин.

4. Каллус ва суспензион культуралар ўстириляётган муҳитни ўзгартиришда уларни зарарлаш ёки культурани ифлослантириш мумкин. Бу қийинчиликларни физик жиҳатдан ҳаракатсиз хужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

5. Айрим ҳолларда идиолитларни ажратиш билан боғлиқ муаммолар келиб чиқади.

Иммобилланган хужайралардан фойдаланганда керакли маҳсулотларни ажратувчи кимёвий моддалар билан ишлаш мумкин. Айрим ўсимликларнинг, масалан *Сансицум фрутесценс* ўсимлиги хужайрасининг культураси иккиламчи метаболитларни атроф-муҳитга ажратади. Иммобилланган хужайралар системаси эса культурани зарарламасдан маҳсулотни олиш имконини беради. Демак, хужайраларни иммобиллаш идиолитларни осон изоляциялаш имконини беради.

Иммобилланган хужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

3. Ясси асосли культура системасида хужайралар идишга горизонтал идишда ўстирилади.
4. Колонкали культура системасида хужайралар вертикал идишда ўстирилади.

Иккала системада ҳам суюқ муҳит ҳаракатсиз хужайралар атрофини циркуляциялайди.

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашни асосий шарти – стерилликга қатъий риоя қилишдир. Таркиби бой бўлган озуқа муҳити микроорганизмларни ривожланиши учун ҳам жуда яхши субстрат ҳисобланади, ўсимликлардан ажратиб олинган фрагментлар (эксплантлар) озуқа муҳити билан аралаштирилганда микроорганизмлар таъсирига тез учрайдилар. Шунинг учун ҳам экплантни ҳам, озуқа муҳитини ҳам стерилизация қилиш керак. Ажратилган хужайралар ва тўқималар билан қилинадиган барча нозик ишлар (манипуляция) асептик шароитда (ламинар-боксларда) стерилланган ускуналар ёрдамида бажарилади. Ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақлаш керак, айниқса харорат ва намлик ўзгарганда, чунки пробиркаларни пахта-бинтдан тайёрланган тикинчалари намланади ва ундан микроорганизмлар осон ўтишади.

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек уруғлар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи эритмада ушлаб туриш, кейин эса стерил сув билан ювиб ташлаш орқали амалга оширилади. Стерилизация даври эксплантни характериға ҳамда эритмани стерилизация қилиш хусусиятиға боғлиқ. Одатда уруғ 10-20 мин, вегетатив қисмлар эса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи эритмаларға мисоллар 3.1- жадвалда кўрсатилган.

Эксплант олинмоқчи бўлган ўсимлик органи, дастлаб совунли сув билан шеткалар ёрдамида яхшилаб ювилади ва дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин эса бир неча секунд давомида 70 % ли этанолға ботириб олинади. Уруғлар спиртда 1-2 мин. ушлаб

турилади. Тўқималарга спирт билан ишлов бериш, уни стерилизация қилиш хоссасидан ташқари, асосий стерилизация қилувчи эритмани таъсирини кучайтириши билан ҳам боғлиқ.

10-жадвал.

**Дастлабки ўсимлик материалларини стерилизация қилиш
(Р.Г.Бутенка, 1990 йил)**

Манба	Стерилизация вақти, мин			
	0,1% ли диацид	0,1% ли кумуш хлорид (AgCl ₂)	5-9 % ли гипохлоритлар (Na, Ca)	10-12% ли водород пероксида (H ₂ O ₂)
Уруғлар				
куруқ	15-2	10-15	15-20	12-15
намланган	6-10	6-8	10-15	6-8
Тўқималар				
сутли илдиз, илдизмева	20-3	15-25	15-20	-
дарахтланган поя	20-4	20-25	20-25	-
барглар	1-3	1-3	3-6	3-5
апекслар	1-10	1-7	3-15	2-7

Стерилизация кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб ювиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация эксплантни фақат ташқи инфекциядан озод қилади. Агар эксплант тўқималари ички инфекцияга эга бўлсалар, уларга антибиотиклар билан ишлов беришга тўғри келади. Айниқса ички инфекцияга йирик томирли тропик ва субтропик ўсимликлар бой бўлишади. Культураларни замбуруғлар ёки бактериялар билан ифлосланиши экилгандан 1-14 кун ўтганда кўзга ташланади. Ёруғлик хонасидаги ҳавони ифлосланишдан сақлаш учун, ифлосланган культурани дарҳол йўқотиш керак.

Озуқа муҳитларини автоклавда, 120⁰С да 0.75 – 1,0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация қилинади. Агар озуқа муҳити таркибига юқори ҳароратда парчаланадиган моддалар кирса, уларни алоҳида совуқ стерилизация қилинди. Уларни тешиқлар диаметри 0,22 – 0,45 мкм, бўлган бактериал филтрлардан ўтказилади ва автоклавдан чиққан озуқа муҳитини 40⁰ С гача совутиб, кейин уларни аралаштирилади. Олдиндан фольгача ёки ўрайдиган қоғозга ўралган идишларни куруқ иссиқ билан, қуритгич шкафларида 160⁰С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Озуқа муҳити

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган озуқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроэлементлар (азот, фосфор, калий, кальций, магний, олтингугурт ва бошқалар) ва микроэлементлар (бор, марганец, рух, мис, молибден ва бошқалар) ҳамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини сақлаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казсин гидролизоти, ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни ҳужайра киришига ёрдам беради) ва бошқа керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озиқа муҳитига кокос ёнғоғини (какос сути), каштан дарахтини эндоспермасини қўшилади. Карбон сувлар озуқа учун энг керакли компонентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни автотроф озикланишга қурблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпроқ 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза эритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар хужайраларни табақаланиши (дедифференцировки) ва хужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (хужайра бўлинишини кучайтирувчи) бўлиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар миқдорини камайитириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сақламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «ўрганган» тўқималар ўсади. Ҳар икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик, бу хужайраларни ўзларини гормон синтезқилиш хусусияти билан боғлиқ.

Ауксин манбаи сифатида озуқа муҳитига 2,4-дихлорфенокси сирка кислота (2,4-Д), индолил-3-сирка кислота (ИУК), Л-нафтил сирка кислота (НУК) қўшилади. Яхши ўсувчи каллус олиш учун кўпроқ 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки ИУК, 2,4-Д га нисбатан 30 мартаба кучсиздир.

Сунъий озуқа муҳитига қўшиш учун, цитокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажратилган тўқималарни ўсишига оргоногенезни индукциясига кинетинга нисбатан фаолроқ таъсир кўрсатади. Баъзи бир озуқа муҳитлар таркибига аденин ҳам қўшилади.

Ҳозирги пайтда жуда кўп сонли озуқа муҳитларни таркиби аниқ бўлсада, ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини *ин vitro* шароитида ўстириш учун Т.Мурасига ва Ф.Скуга муҳитлари ишлатилади. Бу муҳитни таркиби биринчи марорта 1962 йилда эълон қилинган ва у жуда яхши балансланган озуқа моддалари таркибига эга ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ қилади (3.2-жадвал).

11-жадвал.

Ўсимликларни ажратиб олинган тўқималарини ўстириш учун ишлатиладиган озуқа муҳитларини таркиби

Озуқа муҳити компонентлари	миқдори, мг/л			
	Мурасига-Скуга	Гамборга	Шенка - Хильдебрандта	Грессхофф-Доу
$\text{H}_2\text{X}_4\text{NO}_3$	1650	2500	2500	-
$\text{H}_2\text{X}_4\text{X}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-
KNO_3	1900	-	-	1000
$\text{CaCl}_2 + 2\text{X}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{Mg CO}_4 \times 7\text{X}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{H}_2\text{X}_4)_2\text{CO}_4$	-	130	-	-
KX_2PO_4	170	-	-	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeCO}_4 \times 7\text{X}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaX}_2\text{PO}_4 \times \text{X}_2\text{O}$	-	150	-	90,0
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnCO}_4 \times 4\text{X}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$3\text{HCO}_4 \times 7\text{X}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0

Кл	0,83	0,75	1,0	0,75
Na ₂ MoO ₄ ×2X ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25
CuCO ₄ ×5X ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,25
CoY ₂ ×6X ₂ O	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-ХСл	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин ХСл	1,0	10,0	5,0	-
2,4–	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

Каттиқ озуқа муҳит тайёрлаш учун агар–ағар ишлатилади. Агар–ағар денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, макро- ва микроэлементлар эритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар қуёқроқ қилиб тайёрланади ва совуқ шароитда сақланади ҳамда керак бўлганда суюлтирилиб ишлатилади.

Ўстириш шароити

Ўсимликлардан ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни яхши ўстириш учун, ўстиришни маълум шартларига роия қилиш керак. Кўпчилик каллус тўқималари ёруғликга эҳтиёжи йўқ, чунки уларни хлоропластлари бўлмасдан, гетеротроф озиқланадилар. Баъзи – бир яшил рангдаги каллус тўқималар бундан мустасно. Баъзи бир ҳолатларда каллус тўқималар автотроф озиқланишига қобилиятли эмас, буларни доимий ёруғлик шароитида ўстирилади, бу эса мувоффақиятли морфогенез учун мажбурий шароитдир кўпроқ каллус тўқималар қоронғиликка олинади.

Морфогенезга аниқланган (детерминированье) тўқималар ёруғликга ўтказилиб, кейин 1000-4000 лк ёруғликда ўстирилади. Ажратиб олинган меристемлар ва уларни микрокўпайтириш ҳам ёруғликда ўтади. Ёруғ уйчани ёруғлиги 1000 – 10000 лк бўлиши керак ва ёруғликни кучи ўсимликни хусусиятларига боғлиқ. Ўстриладиган объектни фото даврини ҳам ҳисобга олиш керак.

Ўстириладиган хонада намлик 60-70 % бўлиши керак. Ундан курукроқ хаво озиқа мухитини куришиб юборади, агар пробирка пахтали тикин билан бектилган бўлса, озуқа моддаларни концентрацияси ўзгариб, ўстириш шароити бузилади.

Кўпчилик тўқималарни ўстириш учун оптимал харорат 25-26⁰С. Агар тропик ўсимликларни тўқималари бўлса 29-30⁰С да ўстирилади. Морфогенез индукция қилинганда харорат 18-20⁰С гача туширилади. Одатда климатик камералардан фойдаланилади.

3. КАЛЛУС ТЎҚИМАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Умумий ҳолати

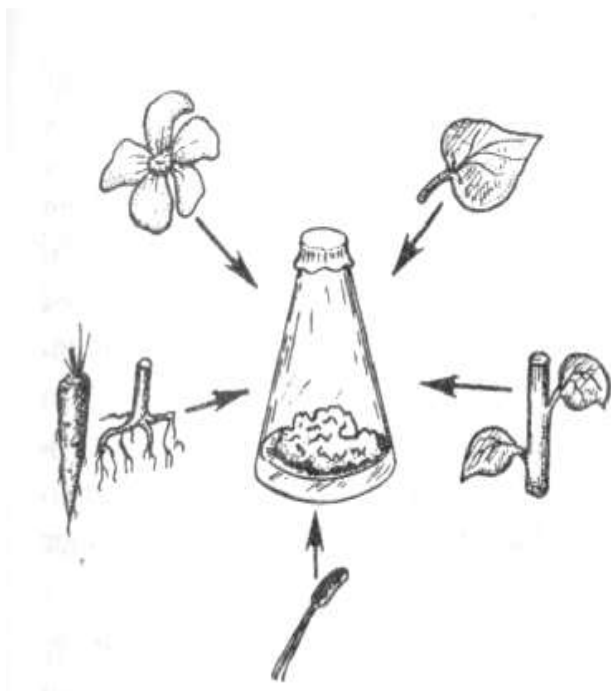
Ажратилган тўқималар культураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированнўй) ҳужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. Каллус дегани қадок (қотиб қолган) деган маънони англатиб, ин витро шароитида алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо бўлиши мумкин.

Ин витро шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сариқроғ жуда ҳам кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус ҳужайралар қариганда, тўқ қўнғир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тўпланиши билан боғлиқ. Вақт ўтиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан қутулиш мақсидида озуқа мухитига антиоксидантлар қўшилади.

Каллус тўқималар аморф бўлиб, маълум бир анатомик тузилишга эга эамслар, аммо келиб – чиқиши ва ўстириш шароитига қараб, ҳар хил консистенцияга (суяқ - қуюқ ва х.) эга бўлади:

- **Биринчи** – уваланиб кетадиган пўк ҳолатда кичик агрегатларга енгил майдаланиб кетадиган, кучли сувланган ҳужайралар;
- **Иккинчи** – ўрта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемали ўчоқлар;
- **Учинчи** – зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик пўтлоғи тагидаги бўлинувчан ҳужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табақалашган (дифференциация) ҳолатда учрайди.

Ўсимлик ҳужайрасини табасизланиши ва уни каллусга айланиши учун шарт бўлган шароит-бу озуқа мухити таркибида икки фитогормонларни яъни ауксинлар ва цитокининларни бўлишидир. Ауксинлар ҳужайраларни табақасизланишини (дедифференцировка) чақирса уларни бўлинишига тайёрлайди, цитокининлар табақасизланган ҳужайраларни бўлинишига (тролифорция) олиб келади. Агар таркибида гормон сақламаган озуқа мухитига поя, барг ёки илдизни бир қисмини тикиб қўйилса, ҳужайраларни бўлиниши амалга ошмайди ва каллус тўқима ҳосил бўлмайди. Бу табақалашган ҳужайраларни бўлинаолмаслиги билан боғлиқдир (3.1-расм).



35-расм.

Турли хил эксплантлардан
каллус тўқимаси культура-
ларини олиш:

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч босқичда ўтади:

- бўлиниш;
- чўзилиш;
- табақаланиши (дифференцировка).

Охирги босқични (фазани) характерли томони ҳужайрани иккиламчи қобиғини қалинлашуви ва ҳужайрани бўлинишга бўлган қобилятини йўқотишидир. Дифференциацияга учраган ҳужайралар яна қайтадан бўлиниш қобилятига эга бўлиши учун, уларни дедифференцировка бўлиши шарт, яъни ҳужайра худди меристема ҳолатига қайтиши керак. Табақаланган ҳужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва оқибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай қилиб, ихтисослашган ҳужайраларни каллус тўқималарга айланиши ҳужайра бўлинишини кучайтириш билан боғлиқ бўлиб, табақалаш жараёнида, ҳужайра бўлиниш қобилятини йўқотади.

Озуқа муҳити таркибида цитокининларни бўлмаслиги тамаки ўсимлигини ўзак қатлами паренхимасида ҳужайра циклини тўсиб қўяди. Шунинг учун ҳам агар озуқа муҳити таркибида фақатгина ауксин бўлса, ҳужайра бўлинмайди ва тўрт кунлик даврдан кейин чўзилиб, ўсишга ўтади.

Ауксинларсиз, фақат цитокининларни ўзлари ҳам гормон сақламаган озуқа муҳитига ўхшаб, ўсимликни қаришига олиб келади. Тамаки ўсимлиги мисолида келтирилган далиллар бирта гормон сақлаган озуқа муҳитида каллусли тўқима ҳосил бўлишини барчасини тушунтира олмайди. Бунга зид бўлган мисоллар ҳам бор.

Масалан, буғдойни етилмаган куртакларида цитокининсиз 2,4-Д сақлаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ёки кунгабоқарни уруғ палласида цитокинин сақлаган ауксин сақламаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ва х.к. Кузатиладиган натижалар кўпроқ эндоген гормонларга, аниқроғи у ёки бу эксплантни ҳужайрасида сақланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статуси билан боғлиқ эканлиги исботланган.

Баъзи бир олимларни фикрларича, ҳужайрани бўлинишини ауксин ёки цитокинин эмас, балки полисахаридлар ва бошқа қандайдир индукторлар чақириши ва каллус ҳосил бўлишига олиб келиши мумкин.

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга ўтиш жараёни ҳужайра бўлинишини тўхташи билан бошланади. Лаг – фаза 24-28 соат давом этади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез бўлиниб, каллус тўқима ҳосил қилади. Шундай қилиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференциацияси фитогармонлар таъсирида бўлинишни кучайиши (индукцияси) билан боғлиқ бўлса, бўлинадиган меристемали ҳужайраларни дедифференциацияси бўлинишини тўхташ билан ҳужайрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил бўлишига олиб келувчи бўлинишни кучайиши билан боғлиқ.

Бир фитогормонни таъсир самараси, нишон тўқимани физиологик тавсифига қараб ҳар хил бўлиши мумкин.

Ҳужайрани *ин vitro* шароитида дифференциалланган ҳолатдан дидифференциалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол бўлинишга ўтиши, генларни фаоллигини ўзгариши билан бошланади. (Эпигеномни ўзгарувчанлик). Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши ҳужайрадаги оксил таркибини ўзгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда ўзига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргнинг фотосинтез қилувчи ҳужайраларида оксиллар миқдори пасаяди. Икки паллани ўсимликларда дидифференциалланган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон ўтади.

Дедифференциалланган ҳужайраларни каллус тўқималар ҳосил бўлишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга ўтиши билан биокимёвий ва цитологик ўзгаришлар содир бўлади. Захирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференциалланиш бошланади. Дедифференцияни индукциясидан 6-12 соат ўтгандан кейин ҳужайра қобиғи ғоваклашиб шишади, мустақил рибосомалар сони кўпайиб, Гольджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу ўзгаришлар бўлинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга қўйишдан олдин, эксплантлар ҳужайрасининг метаболизмида ўзгаришлар содир бўлишини, у эса дедифференция ёки травматик синтез билан боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб қўйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида эксплантларни гормонлар сақламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия этилади.

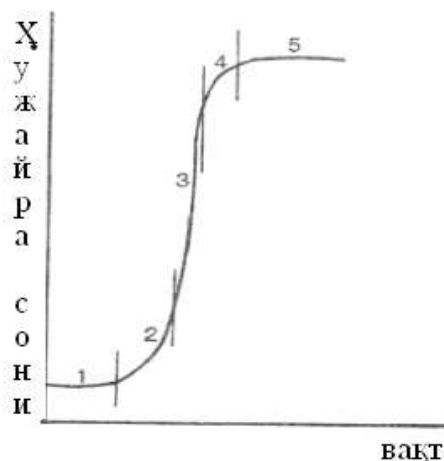
Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференция ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференцияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференцияси билан аралаштириб юбормаслик керак.

Каллус ҳужайралари нобуд бўлиб қолмаслиги учун уларнинг бўлинишга бўлган қобилятларини йўқотмасликлари учун, эксплантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига ўтказиб турилади. Бу операцияни – пассирлаш деб аталади. Ўз вақтида бу жараён ўтказиб турилса, каллус ҳужайралари ўн йиллаб ўз бўлини хусусиятини йўқотмаслиги мумкин.

Каллус ҳужайраларни ўсиш чизиғи 3.2-расмдан кўриниб турибдики, С- симон шаклга эга, ўсиши беш фаздан иборат:

- **1–латент ёки лаг-фаза** даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Ҳужайралар бу даврда бўлинишга тайёргарлик кўрадилар.
- **2-фаза логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси** энг кўп митодик фаоллик билан ва каллус культуранинг массасини ошириши билан ҳамда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан характерланади.
- **3-фаза тўғри чизиқли (линейка),** бунда ҳужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.

- **4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади, бу босқичда ҳужайрани миотетик фаоллиги кескин пасаяди.**
- **5-фаза ўсиш чизиги (стационар) бир текис ҳолатга келади. Бу даврда ҳужайралар парчаланади, аммо ҳужайра сонини ошириши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кўтарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин ҳужайраларни деградацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.**



36-расм. Каллус ҳужайраларнинг ўсиш чизиғи

Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги

Ин витро шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлар организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва биокимёвий хусусиятларни сақлаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилиятини йўқотмайдилар. Совуққа чидамлилик хусусияти каллусли ҳужайраларда, ўсимликлардагидек қайтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда бўлмайди. Каллусли тўқималарга фотодавррийлик реакцияси ҳам хос, бу фитохрон фаоллигини сақлаб қолингалиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори хароратга чидамлилик, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлилик ва х.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик оксиллар пайдо бўлади ва умумий оксил миқдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қатнашадиган оксиллар камаяди ёки бутунлай йўқолади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронлиқни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли. Каллусли ҳужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда ўтади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа муҳитига ўтказиб туриш ҳисобидан ҳозиргача яшаб келмоқда.

Очиқ тупроқда ўсувчи ўсимликга нисбатан, каллусли ҳужайраларни ҳужайра цикли узунроқдир.

Каллусли ҳужайра ўзига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини хар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш ҳужайралар (Г- фазадаги), қари (Г₂) ва С – фазалар иштирок этадилар.

Каллусли ҳужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал ҳужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик ҳужайраларда ҳам борлигини кузатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган ҳужайралар учун хосдир. Каллус ҳужайраларни нафас олиш

коэффициенти бирдан катта. Масалан нўхат каллус ҳужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижғиш орпасидаги нисбат бижғишни кучайиш томонига, сурилганлигини яъни Пастер эффектини пасайишини кўрсатади.

Пастер эффекти деганда, бижғишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффициентини кўпайиши, нафас олиш бижғишни тўхтатаолмаётганлигини ва ҳатто кислородли шароитида ҳам каллусли ҳужайраларда нафас олиш билан бир қаторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижғиш жараёни содир бўлаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, бўлинадиган ҳужайраларда этил спиритини тўпланишини кўрсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус ҳужайраларни митохондриялари, меристем ҳужайраларга ўхшаб, жуда паст ривожланган уларда кристаллар кам, бу эса аэроб нафас олишга таъсир кўрсатмасдан қолмайди. Пастер эффектини бузилиши кўпроқ хайвонларни шиш ҳужайраларида кузатилади. Бу ходиса Варбург томонидан аниқланган бўлсада ҳозиргача аниқ тушунтира олинганча эмас. Пастер эффектини бузилиши оқибатида келиб чиқадиган анаэроб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли ҳужайраларни углеводлар истеъмол қилишини кескин (19 маротабага) ошириб юборади.

Каллусли ҳужайраларни нафас олиш характериини ўзгариши билан бир қаторда углеводларни кислородсиз парчаланишини кучайиши йўналишида, бўлинадиган ҳужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш намоён бўлади.

Каллус ҳужайралари генетикаси

Узоқ вақт каллусли ҳужайралар генетик бир хил деб ҳисоблаб келинар эди. Ўтган асрнинг 60-йилларида каллусли ҳужайралар генетик гетероген (кўпсонли) эканлиги аниқланди. Уларни бир хил эмаслиги энг аввало ҳар хил сонли хромосомалар сақлаши билан намоён бўлади. *Ин витро* шароитида меристематик тўқимлар генетик мўътадил бўлди.

Каллусли ва суспензион культураларда дастлабки ўсимликка хос бўлган қатор диплоид хромосомалар сақловчи ҳужайралар 3, 4, 5 ва ундан ҳам кўпроқ хромосомалар тўплами сақловчи полиплоидли ҳужайралар учрайдилар. Шулар қатори каллусли тўқималарда тез-тез анеуплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли тўқималарни қанчалитк узоқ вақт ўстирилса, ўшанчалик улар плоидлиги билан фаркланадилар. Тамаки ўсимлигини каллусли тўқимларида тўрт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли ҳужайралар қолмайди: Барча ҳужайралар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб қоладилар. Бу эса плоидликни ўзгариши ўстириш шароити таъсирида, энг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқача тушунтириш ҳам мумкин.

Плоид ҳужайралар қисқа лаг фазага эга бўлганлиги сабабли, диплоид ҳужайраларга нисбатан бўлиниши тезроқ ўтади. Бунинг оқибатида, улар кейинги кўчириб ўтказиш жараёнларида устунликка эга бўлиб қоладилар. Ҳар ҳолда икки сабаб ҳам ўринли деб ҳисоблаш мумкин.

Плоидликни ўзгаришидан ташқари ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини *ин витро* ўстирилиши, ҳужайрада хромосомали абберациялар ҳосил бўлишини чакиради. Бу эса ўстириладиган тўқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (тўқималарни) ташқи кўриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги ўзгаради.

Ўстирилаётган хужайраларда микроскоп остида кўринадиган хромосомали мутациялардан ташқари кўринмайдиган ўзгаришлар ҳам содир бўлиши мумкин. Бундай ўзгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам бўлиши мумкин. Генли мутациялар хужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини ўзгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган хужайраларни генетик мўтадил эмаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало – дастлабки материални генетик бир хил бўлмаганлиги (эксплантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табақалашган тўқималар, ҳар хил пloidли хужайраларга эга бўладилар ва фақатгина тўқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемалар, камбийлар ва бошқалар эса доимодипloid ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб – бу тўқима ва хужайраларни узоқ муддат экилиши, ўз навбатида бундай шароитда улардаги генетик ўзгаришлар, жумладан ploidликни бир хил бўлмаган ўзгариши содир бўлади.

Ўсимлик тўқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озуқа муҳитига ўтказишда бир бирига мос алоқаларни бузилиши ҳам хужайраларни генетик мўтадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ўхшаш натижалар озуқа муҳити таркибидаги фитогормонларни хужайранинг генетик аппаратида таъсири оқибатида намоён бўлиши мумкин. Каллус ҳосил бўлиши учун гормон сифатида албатта озуқа муҳити таркибида ауксинлар ва цитокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти эса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти эса кўпчилик озуқа муҳитлари таркибига кирувчи 2,4-Д препаратида кузатилган.

Цитокининлар хусусан кинетик хужайраларда полиploidия содир бўлишига ёрдам берадилар.

Каллус хужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни ташқи муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли ҳамда серҳосил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селекцион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

Назорат учун саволлар

- 1. Каллус хужайралар культураларини олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 2. Протопластларни ажратиб олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 3. Протопластлар культурасини олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 4. Протопластларни қўшилиши ҳақида тушунча беринг?*
- 5. Соматик хужайралар гибридизацияси ҳақида тушунча беринг?*
- 6. Хужайра культураларини қандай ҳосил қилинади?*
- 7. Ўсимлик хужайраларини ўстиришда қўлланиладиган озиқ муҳитлар?*
- 8. Хайвон хужайраларини ўстиришда ўзига хос томонларини сананг?*
- 9. Хужайраларни ўстиришда стериллаш ишлари қандай олиб борилади?*

9- МАЪРУЗА

ТАБИЙ ОРГАНИК БИРИКМАЛАР БИОТРАНСФОРМАЦИЯСИ. БИОЭТАНОЛ ИШЛАБ ЧИҚАРИШ. БИОЁҚИЛҒИЛАР. (2 с)

9.3. Чиқиндилар ва уларни қайта ишлаш. Биоёқилғилар ишлаб чиқариш. (2с)

Режа:

1. Чиқиндиларнинг табиати ва миқдори
2. Микробли деградация ва биоконверсия
3. Саноат микробиологияси ва генетика
4. Сувни биологик тозалаш
5. Микроорганизмлар ёрдамида биомассадан энергия олиш: Биоэнергия
6. Биоэтанол ишлаб чиқариш
7. Биоёқилғилар ишлаб чиқариш

Таянч сўзлар: биомасса, чиқиндилар, биоконверсия, микробли деградация, амплификация.

Адабиётлар: А- 1,А-2,А-3, Қ-4дан 26 гача бўлган адабиётлар

Қишлоқ хўжалиги, ўрмон ва озиқ-овқат саноати чиқиндиларидан турли мақсадларда, хусусан, биомассани ошириш, ҳамда ундан энергия олиш ва шу йўл билан атроф-муҳит ифлосланишини камайтиришда ишлатилади. Уларни микроорганизмлар ёрдамида бижғидиган бирикмаларгача парчалаш ёки уларни оксилларга айлантириш мумкин. Оқава сувларда сув ўтларини культурасини кўпайтириб, нафақат сувларни тозалаш, балки оксил ва микроэлементларга бой биомасса олиш мумкин.

Кўплаб чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни қайта ишлаш мумкин. Маълумотларга кўра турли бошоқли ўсимликлардан тахминан 1700 млн. т. сомон чиқади ва буларнинг кўп қисми ишлатилмайди. Ёки ананасни консервациялашда унинг 20%игина ишлатилади, асосий қисми эса чиқиндига чиқади. Унинг меваси, пўсти ва бошқа чиқиндилари шарбат олиш учун эзилади, қуритилган қолдиқлари эса молларга ем сифатида берилади. Спиртли бижғитиш билан ушбу заводлардан оқизиладиган чиқиндиларни камайтириш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашилиши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик жиҳатдан ифлослантиради. 1970 йилларнинг бошларида ўтказилган тадқиқотларга кўра фармацевтикада ишлатиладиган ферментация – бу **ифлосланишнинг асосий манбаидир**. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментациянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли хужайралари ва озуқа муҳитининг ишлатилмаган компонентлари ҳисобланади.

Таркибида углевод бўлган чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни анъанавий микробли бижғиш ёки биотехнологик жараёнлар йўли билан қайта ишлаш мумкин. Масалан, сахарозани кристаллаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик циклдан чиқариб ташланадиган **меласса** – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сульфитлар, карбонатлар ва кальций, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофель ва маниокнинг қуруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўхори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декстрин ва глбкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Целлюлоза ва гемицеллюлозани микробли деградация ва конверсияга учратиб этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. *Слостридиум тҳермоселлум* таркибидаги целлюлаза ва гемицеллюлаза генларини *лостридиум* нинг бошқа турларига

ўтказиб целлюлоза ва гемицеллюлозани этил спирти, ацетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб хужайралари ёрдамида ўзига яқин бўлган бирикмаларга айланишидир. Шу билан бирга микроорганизмлар кимёвий синтезнинг муҳим ва мураккаб жараёнларнинг маълум бир босқичига таъсир қилади.

Биоконверсиянинг қадимги тури – сирка олиш жараёнида этил спиртини сирка кислотага айланишидир.

Биоконверсия бир типдаги реакция ва маълум бир структура (стереоспецификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига хосдир. Биоконверсияда изопропанол ацетонга, глицерин дигидроацетонга, Л-тирозин Л-диоксифенилаланинга, глюкоза глюкон кислотага ва охирида 2-кетоглюкон ёки 5-кетоглюкон кислотага ва сорбит Л-сорбозага айланади. Сорбитнинг сорбозага биоконверсияси кимёвий саноатдаги ягона биологик реакциядир.

Биоконверсияга асосланган методлар ёрдамида стероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак ости безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиб олишган. Кортизон синтезининг биринчи оралиқ маҳсулоти прогестерондир. Биоконверсия 37⁰С ҳароратда сувли муҳитда ва атмосфера босимида олиб борилади. Ҳозирги кунга келиб стероид ядросининг углерод атомини маълум бир микроорганизмлар ёрдамида гидроксиллаш ва керакли стероидни олиш мумкин.

Микроорганизмлар стероидларни олиш учун хомашёни (масалан, стеринлар) ишлаб чиқаришда ҳам ишлатилади.

Баъзи ҳолларда биоконверсияни амалга ошириш учун аралаш культуралар ёки микроб штаммларини кетма-кет қўшиш керак бўлади. Буларнинг ҳар бири биоконверсиянинг ўзига хос босқичини амалга оширади. Имобилланган хужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражати камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиб олишда юзага келадиган қийинчиликларни бартараф этиш учун ДНКнинг махсус участкаларида **мутацияларни индукциялаш**; ген инженерияси ва табиий жинсий жараёни кенгайтириш учун **протопластларни қўшилиши**; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни реконструкция қилиш учун **рекомбинант ДНКни қўллаш**.

Микроб хужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш **генларни амплификациялаш** орқали амалга оширилади ва натижада ушбу геном кодлайдиган маҳсулот ишлаб чиқариш кескин ортади. Бундай техник ёндашув хужайрада плазмидалар сонини кўпайтириш билан боғлиқдир. Одатда битта хужайрага 1-30 та нусха тўғри келади ва 2-250 ген мавжуд. Шу билан бирга хужайрада плазида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификациялаш *Э.коли*нинг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб исталган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазмидага ўтказиш, сўнгра плазмидани амплификациялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир хужайрадан бошқасига полиэтиленгликол иштирокида трансформациялаш йўли билан *Бацилус* плазмидаси ўтказилган. *Псевдомонас* плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Шу йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

СУВНИ БИОЛОГИК ТОЗАЛАШ

Аэроб ва анаэроб микроорганизмлар оқова сувларда учрайдиган органик материаллардан тозалаш хусусиятига эга. Ачитқи, нефтни қайта ишлаш заводи, сут ва пишлоқ ишлаб чиқарувчи корхоналар, картофель ва крахмални қайта ишловчи заводлардан чиқадиган чиқиндиларни анаэроб жараён ёрдамида тозалаш бўйича катта муваффақиятларга эришилган. Бу жараёнда фаол биологик компонентлар қайта ишлатилади, қолдиқ маҳсулотлар камаяди, сезиларли даражада нохуш ҳидлар тарқалиши камайтирилади. Энг муҳими метан ҳосил бўлади.

Булардан ташқари кимёвий зарарланиш (биоцидларнинг деструкцияланиши каби)нинг назорат қилиш учун микроб штаммларидан фойдаланилади.

Псевдомонас турига мансуб бактерияларда оксиредуктаза ёки гидроксилазалар бўлиб, улар юқори токсик, углеводородлар ва ароматик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эгадир. *Псевдомонас* нинг айрим штаммлари таркибида ушбу ферментларни кодловчи генлар плазмида таркибида учрайди. Бундай плазмидаларнинг 4 хили мавжуд: ОСТ (октан ва ва деканни парчаланиши), ХЙЛ (ксилол ва толуолни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАХ (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАХ плазмидалари бактериал хужайраларни чатиштириб ўзининг ўтказувчанлигини таъминлайди, қолган плазмидалар эса бактерияга бошқа плазмидалар киритилгандагина ўтказилиши мумкин.

Кейинчалик бу штаммларнинг гибрид плазмидалари олинган бўлиб, улар тозаланмаган нефтда бошқа штаммларга нисбатан углеводородларни метаболитлаш хусусиятига эгадир. Улар ёрдамида ҳарорат ва бошқа омилларни назорат қилган ҳолда оқар сувларни тозалаш мумкин.

Айрим микроблар молекулаларни шундай ўзгартириш хоссасига эгаки, уларнинг ўзи бошқа микроблар таъсирида парчаланadi. Бундай «кометаболизм»ни Дафтон ва Хси (Калифорния университети) кучли токсик паратион инсектицидини *Псевдомонас*нинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификациядир: фосфорилланиш, метилланиш, ацетилланиш ва б.лардир. Детоксификацияни катализловчи ферментлар плазмида таркибидаги генлар билан кодланади. Олимлар кучли ва кўп ишлатилadиган гербицид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб культурасини олишга эришганлар. Улар тозалаш станцияларидан бир нечта микроорганизмларни ажратиб олиб уларни органик бирикмаларни плазмидаси таркибида парчаловчи ферментларни кодлайдиган гени бўлган бошқа бактериал штаммлар билан аралаштирганлар. Сўнг аралашма фақатгина 2,4,4-Тда хемотратда ўстирилган. 10 ойдан сўнг бактерияларнинг ўсиш суръати 2,4,5-Тнинг бактерияларнинг ўсиши учун ишлатилиши ҳисобига тезлашган.

Ген муҳандислиги методлари асосида бундай натижаларга эришиш кўзда тутилмоқда. Бу кўплаб бирикмаларни (кимёвий саноатда ажраладиган ва биопарчаланмайдиган) бузиш хусусияти ва ассимиляция қилувчи микроб штаммларини конструкциялаш муаммосини ечишга хизмат қилади.

МИКРООРГАНИЗМЛАР ЁРДАМИДА БИОМАССАДАН ЭНЕРГИЯ ОЛИШ: БИОЭНЕРГИЯ

Ер шарининг ўсимлик қатлами 1800 млрд.т. куруқ моддани (энергетик жиҳатдан 30×10^{21} Дж га эквивалент) ташкил қилади. Бу кўрсаткич фойдали қазилмаларнинг энергия захираларига мос келади. Маълумки, биомассанинг энергетик потенциалининг аксарият қисми инсон томонидан ишлатилади.

Куруқ модда учун биомассанинг энергияга айланишининг энг оддий усули ёниш бўлиб, бунинг натижасида у иссиқлик билан таъминлайди, у ўз навбатида механик ёки электрик энергияга айланади. Нам моддага келсак, унинг қадимги ва самарали усули биогаз (метан) олинишидир.

Булардан ташқари энергияни махсус ўстирилган қишлоқ хўжалиги ўсимликларидан ҳам олиш мумкин. Булар тез ўсувчи дарахтлар плантацияси ҳамда углеводга бой ўсимликлардир. Бундай ўсимликлар таркибидаги углеводлар гидролизланиб гексозага, бу ўз навбатида спиртли бижғишга учрайди.

Этил спиртини олиниши. Этил спиртини бундай ўсимлик биомассасидан олиш учун аввал улар экстракция қилинади ва микробли бижғиш йўли билан унинг захирасидаги углеводлар микроорганизмлар ёрдамида гидролизланади.

Этил спирти 2 усул билан, яъни **кимёвий синтезлаш** ва **ферментатив** усулда олинади.

Кимёвий синтезда этилен (нефть ёки табиий газдан олинади) юқори температурада сув ва катализаторлар иштирокида конвертацияланади. XX аср бошларида этанол бижғиш йўли билан олинар эди.

Этил спирти олинadиган ўсимликлар қаторига маниок, бошоқли ўсимликлар, айниқса жўхори (углевод захираси крахмал) ва ернок (углевод захираси инулин) киради. Булардан ташқари шакар қамиш, ананас, қанд лавлаги ва сорго (углевод захираси сахароза) ишлатилади. Бу ўсимликларнинг культураси ҳозирда кенг миқёсда ўстирилмоқда.

Этанол ишлаб чиқаришни мукаммаллаштириш тўхтовсиз бижғиш технологиясини яратишга қаратилгандир.

Метанли “бижғиш” ёки **биометаногенез** 1776 й. Вольт томонидан очилган бўлиб, у биринчи марта ботқоқ газ таркибида метан борлигини аниқлаган. Ушбу жараён давомида олинadиган биогаз таркибида 65% метан, 30% CO₂, 1% H₂C ва кам миқдорда азот, кислород, водород мавжуд. У кўк рангда ёнади ва ҳидсиз. 28 м³ биогазда йиғилган биогаз 16,8 м³ табиий газ, 20,8 л нефть ёки 18,4 л дизель ёқилғисига эквивалентдир.

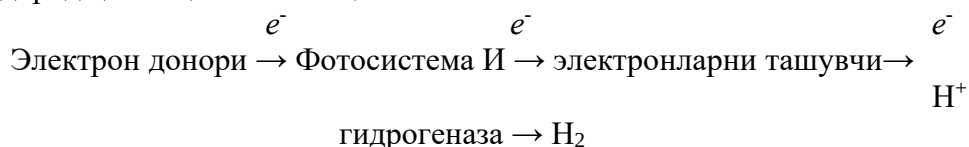
Биометаногенез 3 босқичда амалга оширилади: органик бирикмаларни эритиш ва гидролизлаш, ацидогенез ва метаногенез. Бу жараёнда 3 та гуруҳ бактериялар иштирок этади. 1 гуруҳ бактериялар мураккаб органик субстратларни мой, пропион ва сут кислотасига айлантиради; иккинчилари, бу органик кислоталарни сирка кислота, водород ва CO₂, сўнг метан ҳосил қилувчи бактериялар водородни ютиб CO₂ ни метанга айлантирадилар.

Биокимёвий нуктаи назардан биометаногенез анаэроб нафас олишнинг ўзидир. Бу жараёнда ҳам электронлар органик моддалардан CO₂га берилади, сўнг у метанга айланади.

Биометаногенез сув ўтказмайдиган цилиндрик цистерналар (дайджестерлар)да олиб борилади. Бундай йўл билан биогаз олинishi Хиндистон, Хитой каби мамлакатларда кенг қўлланилади.

Ўзбекистонда кенг майдонни ғўза, каноп, тамаки, кунгабоқар ўсимликлари эгаллайди. Ғўза поясидан ҳозиргача спирт, қоғоз олинган бўлса, бошқа ўсимликлар шунчаки ёкиб юборилган. Ўзбекистон олимлари Ушбу чиқиндилардан экологик иссиқликни яхши сақлаш хусусиятига эга бўлган тоза қурилиш материалларини олиш технологияларини ишлаб чиқилган.

Қуёш нурининг энергияга айланиши. 1960-йиларнинг бошларида исмалоқ баргидан ажратиб олинган хлоропластлар электронларнинг сунъий донори ва бактериал экстракт иштирокида водород ҳосил қилиши аниқланган.



Кейинчалик эса исмалоқ экстракти ва таркибида гидрогеназа бўлган бактериал экстрактлар кўринадиган нур билан нурлантирилганда водород ажратиши мумкинлиги аниқланган. Бундай ҳолда хлоропластнинг И ва ИИ фотохимик системалари иштирок этади. *Слотридиум* дан ажратиб олинган гидрогеназа кислородга нисбатан сезгирдир ва сув фотолизи натижасида ажраладиган кислородни йўқотиш учун реакция азотга реоксидловчилари қўшилган атмосферада олиб борилади.

Бу йўл билан энергия олиш бир қанча афзалликларга эга:

- Фотолиз субстрат кўп миқдорда эканлиги;
- Энергия манбаи чекланмаган (қуёш энергияси);
- Маҳсулот (водород)ни атмосферани ифлослантормасдан сақлаш мумкин;
- Жараёни тиклаш мумкин;

- Оралиқ токсик маҳсулотлар ҳосил бўлмайди ва номал температурада олиб борилади.

Кислородни кўп миқдорда олиш учун кислородга нисбатан кам сезгир бўлган гидрогеназани танлаб олиш керак. *Алцалигенес* бактериясидан олинган гидрогеназалар аралашмадан водороднинг секин ҳосил бўлишини катализлайди.

Назорат саволлари

- 1.Биомасса ва энергия ҳосил бўлишида микроорганизмларнинг аҳамияти?
- 2.Этил спиртининг олинishi тушинтириб беринг?
- 3.Биометаногенез жараёнини тушинтиринг?
- 4.Биоэнергия нима, у қандай олинади?
- 5.Чиқиндиларнинг табиати ва миқдори?
- 6.Микробли деградация ва биоконверсия?
- 7.Саноат микробиологияси ва генетика ҳақида маълумот беринг?
- 8.Микроорганизмлар атроф-муҳит ифлосланишининг назоратчиси сифатида аҳамиятини тушинтиринг?
- 9.Ген муҳандислиги ёрдамида микроб штамmlарини яратиш ва уни сувни биологик тозалашдаги аҳамияти?

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

**ТАЖРИБА
МАШҒУЛОТЛАРИ**

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2019

1-лаборатория машғулоти

Мавзу: Чиқиндисиз технология яратиш. (4 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ишлаб чиқаришда чиқиндисиз технологияларини кенг жорий қилиш учун қишлоқ хўжалигида ҳосил бўлаётган чиқиндиларни микроорганизмлар ёрдамида қайта ишлаш усулларини ўргатиш

Мазкур лаборатория машғулотида чиқиндидиз технологиялар билан ишлаш қонун-қоидаларини ўрганишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ишлаб чиқаришда чиқиндисиз технологияларни кенг жорий қилиш ва ҳосил бўлаётган чиқиндиларни микроорганизмлар ёрдамида қайта ишлаш усуллари ўргатилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уалрга куйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага қишлоқ хўжалик чиқиндиларини аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага саноат чиқиндиларини аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага хонадонлардан чиқадиган чиқиндиларни аниқлаш, уларни ўзларининг билими доирасида қайта ишлаш усуллари ва иқтисодий кўрсаткичларини аниқлаш топширилади.

Назарий қисм: Аероб ва анаероб микроорганизмлар оқова сувларда учрайдиган органик материаллардан тозалаш хусусиятига эга. Ачитқи, нефтни қайта ишлаш заводи, сут ва пишлоқ ишлаб чиқарувчи корхоналар, картофел ва крахмални қайта ишловчи заводлардан чиқадиган чиқиндиларни анаероб жараён ёрдамида тозалаш бўйича катта муваффақиятларга эришилган. Бу жараёнда фаол биологик компонентлар қайта ишлатилади, қолдиқ маҳсулотлар камаяди, сезиларли даражада нохуш ҳидлар тарқалиши камайтирилади. Энг муҳими метан ҳосил бўлади.

Булардан ташқари кимёвий зарарланиш (биотсидларнинг дечруксияланиши каби)нинг назорат қилиш учун микроб штаммларидан фойдаланилади.

Псеудомонас турига мансуб бактерияларда оксиредуктаза ёки гидроксилазалар бўлиб, улар юқори токсик углеводородлар ва ароматик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эгадир. Псеудомонас нинг айрим штаммлари таркибида ушбу ферментларни кодловчи генлар плазмида таркибида учрайди. Бундай плазмидаларнинг 4 хили мавжуд: ОСТ (октан ва ва деканни парчаланиши), ХЙЛ (ксилол ва толуолни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАХ (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАХ плазмидалари бактериал хужайраларни чатиштириб ўзининг

ўтказувчанлигини таъминлайди, қолган плазмидалар эса бактерияга бошқа плазмидалар киритилгандагина ўтказилиши мумкин.

Кейинчалик бу штаммларнинг гибрид плазмидалари олинган бўлиб, улар тозаланмаган нефтда бошқа штаммларга нисбатан углеводородларни метаболитлаш хусусиятига эгадир. Улар ёрдамида ҳарорат ва бошқа омилларни назорат қилган ҳолда оқар сувларни тозалаш мумкин.

Айрим микроблар молекулаларни шундай ўзгартириш хоссасига эгаки, уларнинг ўзи бошқа микроблар таъсирида парчаланади. Бундай «кометаболизм»ни Дафтон ва Хси (Калифорния университети) кучли токсик паратион инсектитсидини Псевдомонаснинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификациядир: фосфорилланиш, метилланиш, атсетилланиш ва б.лардир. Детоксификацияни катализловчи ферментлар плазмида таркибидаги генлар билан кодланади. Олимлар кучли ва кўп ишлатиладиган гербитсид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб културасини олишга эришганлар. Улар тозалаш чансияларидан бир нечта микроорганизмларни ажратиб олиб уларни органик бирикмаларни плазмидаси таркибида парчаловчи ферментларни кодлайдиган гени бўлган бошқа бактериал штаммлар билан аралаштирганлар. Сўнг аралашма фақатгина 2,4,4-Тда хемочатда ўчирилган. 10 ойдан сўнг бактерияларнинг ўсиш суръати 2,4,5-Тнинг бактерияларнинг ўсиши учун ишлатилиши ҳисобига тезлашган.

Ген инженерлиги методлари асосида бундай натижаларга эришиш кўзда тутилмоқда. Бу кўплаб бирикмаларни (кимёвий саноатда ажраладиган ва биопарчаланмайдиган) бузиш хусусияти ва ассимилятсия қилувчи микроб штаммларини кончруксиялаш муаммосини ечишга хизмат қилади.

қишлоқ хўжалиги, ўрмон ва озиқ-овқат саноати чиқиндиларидан турли мақсадларда, хусусан, биомассани ошириш, ҳамда ундан энергия олиш ва шу йўл билан атроф-муҳит ифлосланишини камайитишда ишлатилади. Уларни микроорганизмлар ёрдамида бижғийдиган бирикмаларгача парчалаш ёки уларни оксилларга айлантириш мумкин. Оқава сувларда сув ўтларини културасини кўпайтириб, нафақат сувларни тозалаш, балки оксил ва микроэлементларга бой биомасса олиш мумкин.

Кўплаб чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни қайта ишлаш мумкин. Маълумотларга кўра турли бошоқли ўсимликлардан тахминан 1700 млн. т. сомон чиқади ва буларнинг кўп қисми ишлатилмайди. Ёки ананасни консерватсиялашда унинг 20% игина ишлатилади, асосий қисми эса чиқиндига чиқади. Унинг меваси, пўчи ва бошқа чиқиндилари шарбат олиш учун эзилади, қуритилган қолдиқлари эса молларга ем сифатида берилади. Спиртли бижғитиш билан ушбу заводлардан оқизиландиган чиқиндиларни камайитиш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашиниши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик

жиҳатдан ифлослантиради. 1970 йилларнинг бошларида ўтказилган тадқиқотларга кўра фарматсевтикада ишлатиладиган ферментатсия – бу ифлосланишнинг асосий манбаидир. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментатсиянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли ҳужайралари ва озуқа муҳитининг ишлатилмаган компонентлари ҳисобланади.

Таркибида углевод бўлган чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни анъанавий микробли бижғиш ёки биотехнологик жараёнлар йўли билан қайта ишлаш мумкин. Масалан, сахарозани кристаллаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик сиклдан чиқариб ташланадиган меласса – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сулфитлар, карбонатлар ва калсий, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофел ва маниокнинг куруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўҳори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декстрин ва глүкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Селлюлоза ва гемитселлюлозани микробли деградация ва конверсияга учратиш этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. Слочридиум тхермоселлум таркибидаги селлюлоза ва гемитселлюлоза генларини лочридиум нинг бошқа турларига ўтказиб селлюлоза ва гемитселлюлозани этил спирти, ацетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб ҳужайралари ёрдамида ўзига яқин бўлган бирикмаларга айланишидир. Сху билан бирга микроорганизмлар кимёвий синтезнинг муҳим ва мураккаб жараёнларнинг маълум бир босқичига таъсир қилади.

Биоконверсиянинг қадимги тури – сирка олиш жараёнида этил спиртини сирка кислотага айланишидир.

Биоконверсия бир типдаги реакция ва маълум бир ҳукурат (череоспетсификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига хосдир. Биоконверсияда изопропанол ацетонга, глицерин дигидроацетонга, Л-тирозин Л-диоксифенилаланинга, глүкоза глүкон кислотага ва охирида 2-кетоглүкон ёки 5-кетоглүкон кислотага ва сорбит Л-сорбозага айланади. Сорбитнинг сорбозага биоконверсияси кимёвий саноатдаги ягона биологик реакциядир.

Биоконверсияга асосланган методлар ёрдамида чероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак очи безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиш олишган. Кортизон синтезининг биринчи оралик маҳсулоти прогечорондир. Биоконверсия 370С ҳароратда сувли муҳитда ва атмосфера босимида олиб борилади. Ҳозирги кунга келиб чероид ядросининг углерод атомини маълум бир микроорганизмлар ёрдамида гидроқсиллаш ва керакли чероидни олиш мумкин.

Микроорганизмлар чероидларни олиш учун хомашёни (масалан, черинлар) ишлаб чиқаришда ҳам ишлатилади.

Баъзи ҳолларда биоконверсияни амалга ошириш учун аралаш културалар ёки микроб штаммларини кетма-кет қўшиш керак бўлади. Буларнинг ҳар бири биоконверсиянинг ўзига хос босқичини амалга оширади. Имобилланган ҳужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражатини камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиб олишда юзага келадиган қийинчиликларни бартараф этиш учун ДНКнинг махсус учачкаларида мутатсияларни индукциялаш; ген инженерияси ва табиий жинсий жараёни кенгайтириш учун протоплачларни қўшилиши; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни реконструкция қилиш учун рекомбинант ДНКни қўллаш.

Микроб ҳужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш генларни амплификациялаш орқали амалга оширилади ва натижада ушбу геном кодлайдиган маҳсулот ишлаб чиқариш кескин ортади. Бундай техник ёндашув ҳужайрада плазмидалар сонини кўпайтириш билан боғлиқдир. Одатда битта ҳужайрага 1-30 та нусха тўғри келади ва 2-250 ген мавжуд. Сху билан бирга ҳужайрада плазмида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификациялаш Э.цолининг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб ичалган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазмидага ўтказиш, сўнгра плазмидани амплификациялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир ҳужайрадан бошқасига полиетиленгликол иштирокида трансформациялаш йўли билан Басиллус плазмидаси ўтказилган. Псеудомонас плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Сху йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш саволлари.

1. Чиқиндисиз технологиялар деганда нимани тушунасиш?
2. қишлоқ хўжалиги чиқиндиларини қайта ишлашда қайси микроорганизмлар иштирок этади?
3. Саноат чиқиндиларини қайта ишлашда қайси микроорганизмлар иштирок этади?
4. Чиқиндиларни қайта ишлашнинг иқтисодий афзалликларини аниқланг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш буйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎЗМУ. 2007. 56б.
3. Давронов . Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б

2-лаборатория машғулоти

Мавзу: Фермент (амилолитик) фаоллигини аниқлаш (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга амилаolitik фермент фаоллигини аниқлаш усуллари ўргатилади.

Мазкур лаборатория машғулоти амилаolitik фермент фаоллигини аниқлаш усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад амилаolitik фермент фаоллигини аниқлаш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага амилаolitik ферментлар қайси ферментлар гуруҳига киришини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага амилаolitik ферментларнинг ишлаш механизмини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага амилаolitik ферментлар фаоллигини аниқлашда қайси методлардан фойдаланишни аниқлаш топширилади

Назарий қисм: Хужайраларда биокимёвий реакцияларни каталитик ферментларни тезлигини ошириш йўли билан активлаштириш асосан 2 хил усулда олиб борилади:

Ферментлар молекуласига секунд ва минутлар мобайнида индивидуал таъсир этиши.

Жараёнларни синтези ва парчаланишини тезлигини идора этадиган бир қанча муҳитларнинг минутлари ва соатлар мобайнида таъсир этиши.

Хар иккала механизмнинг муҳим принципи қайтма алоқа принципини бошқаришдан иборат.

Хар бир метаболитик жараённи бошқаришни оддий усули муҳитга кофакторларни таъсир эттиришга асосланган. Агар муҳит концентратсияси камайтирилса муҳит реакцияси тезлашади, акс ҳолда метаболитик юл тезлашади.

Генетик манипуляциядаги селекция ишлари концентратсияни оширишга асосланган. Метаболизм жараёнларини бошқаришнинг энг қулай усули ферментлар активлигини қайта боғланиш принципини бошқаришга асосланган. Бирок, биосинтез жараёнида концентратсиясини ва активлигини пасайтиради ва охириги маҳсулотни синтез булишини тухтатади. Схундай қилиб, биосинтез жараёнининг тезлиги охириги маҳсулотнинг талаб қилинишига боғлиқ.

Агарда триптофанни биосинтез жараёнида муҳитга қушилса жараён тухтайди.

Ферментларнинг актив ва пассив формаси, оксиллар билан кимёвий группаларнинг ковалент боғланишига ҳам боғлиқ.

Ишни бажариш тартиби:

Спектрофотометрнинг кюветаси 0,4 мл субстрат аралашмаси (Д-глюкоза, $MgCl_2$ ва АТФ) 0,1 мл НАДФ эритмаси, 0,01-0,04 мл глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа бўлган эритма, трис-ХСл буферининг 50 мМ ли эритмасидан қўшиб, умумий ҳажми 3 мл га етказилади ва яхшилаб аралаштирилгандан кейин унга 0,01-0,02 мл амилолитик эритмасини қўшиш орқали реакция бошлаб юборилади. Реакциянинг бошланиши секундларда қайд қилинади ва 340 нм да, ҳар секунд оралиғида оптик зичликнинг ошиб бориши кузатилади. Ажратиб олинган фермент препаратини солиштирма фаоллиги сарҳисоб қилинади.

Оксил миқдорини спектрофотометрик йўл билан 280 нм да концентратсияси 1,0 мг/мл бўлганда кўрсаткичи 0,9 га тенглигига қараб аниқланади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Амилолитик ферментларнинг ўзига хос хусусиятларини аниқланг?
2. Фермент фаоллигига салбий таъсир этувчи омилларни сананг?
3. Фермент фаоллигини аниқлаш усуларини сананг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎЗМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

3-лаборатория машғулоти

Ферментнинг меъёрий кўрсаткичларини аниқлаш (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:

Ушбу машғулотда ферментларнинг қуйидаги меъёрий кўрсаткичларини аниқланади.

1. Табиатда оддий ва мураккаб ферментлар мавжуд.

Дастлабки полипептид занжиридан ташиқил топган ҳолда гидролизланганда фақат аминокислоталар ҳосил бўлади.

Бундай ферментлар одатда гидролитик ферментлар ҳисобланиб, уларга пепсин, трипсин, папаин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза ва бошқалар киради.

Иккинчи ҳолатда фермент таркибида оқсил табиатли бўлмаган қўшимча группа бўлади.

2. Мураккаб ферментлар (холоферментлар) таркибида аминокислотадан тузилган оқсил қисми – апофермент, ва оқсил бўлмаган қисми – коферментдан (простетик группа) ташиқил топган.



Агар оқсил бўлмаган қисм апофермент билан ковалент боғлар иштирокида боғланса - кофермент дейилади, агар ковалент бўлмаган (ион, водород) боғлар ёрдамида боғланса – кофактор дейилади.

Простетик группанинг вазифалари қуйидагилар: катализда қатнашиш, фермент ва субстрат орасида контакт ўрнатиш, муҳитда фермент молекуласини фазовий стабиллигини таъминлаш.

Коферментларни хусусияти шундаки, оқсил қисми ҳам, қўшимча қисми ҳам алоҳида оланганда сезиларли каталитик активликни бермайди. Фақат уларнинг комплекси ферментатив хусусиятга эга.

Апоферментда кофермент билан боғланишни таъминлайдиган, специфик структурали қисм мавжуд.

Бу қисм кофермент боғловчи домен дейилади, бир хил коферментни боғловчи қисм структураси турли апоферментларда жуда ўхшаш.

Иккикомпонентли ферментларда кофермент сифатида аксарият витами́нлар (E, K, Q, B1, B2, B6, B12, C, H ва б.) ёки витаминлар иштирокида тузилган бирикмалар (коэнзим A, НАД+ ва б.) иштирок этади.

Бундан ташқари коферментлар функциясини НС-глутатион каби бирикмалар, турли нуклеотидлар ва уларни ҳосилалари, айрим

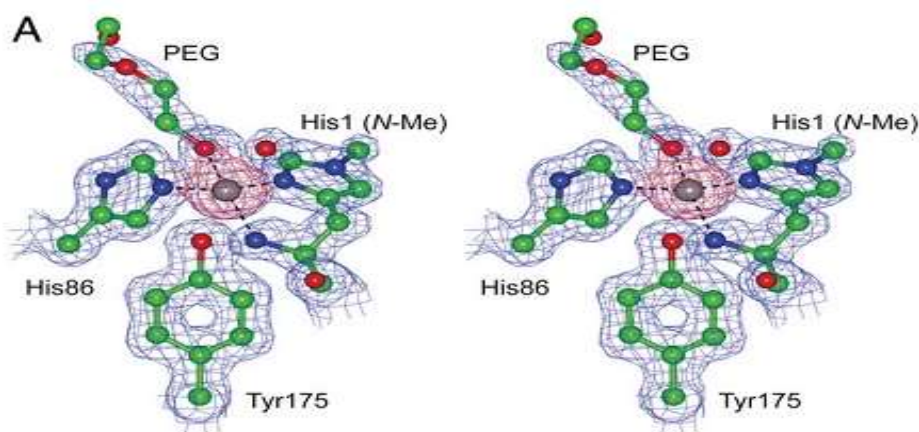
моносахаридларни фосфорли эфирлар ва бошқа моддалар гурухлари ҳам бажаради.

Таркибида субстрат билан бевосита контактга киришиши мумкин бўлган қўшимча группа тутмайдиган биркомпонентли ферментларда жараён бошқача кечади.

Бу функцияни фермент молекуласининг актив марказ деб номланувчи қисми бажаради.

Актив марказ — бу бевосита катализда иштирок этувчи фермент молекуласининг ичкарасида жойлашган ингичка гидрофоб чуқурлик қисмидир.

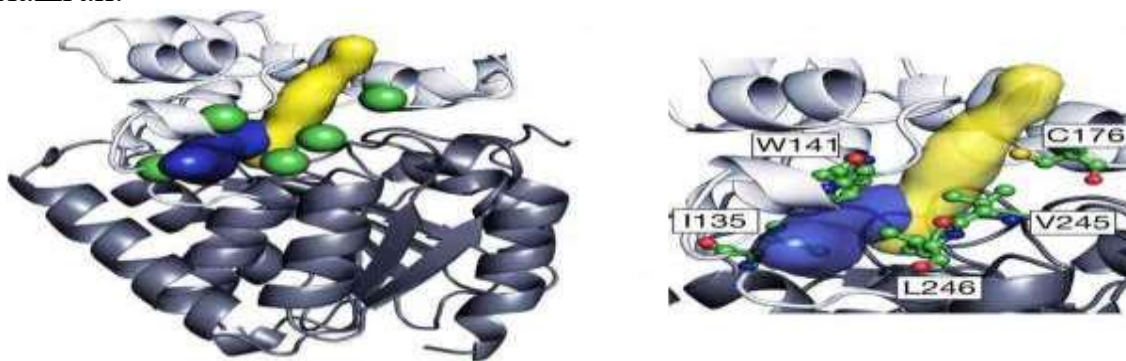
Ферментнинг актив марказида одатда 3-12 аминокислота қолдиғи жойлашган бўлиб, у молекуланинг катта бўлмаган қисмини ташкил этади.



Фермент структурасини ташкил этувчи қолган аминокислоталарнинг роли молекуланинг тўғри глобуляр шаклини таъминлашдир. Бу эса фермент актив марказини эффектив ишлаши учун муҳим аҳамиятга эга.

Биркомпонентли ферментлар каталитик марказида одатда Сер, Гис, Три, Арг, Цис, Асп, Глу, Тир каби аминокислоталарни радикаллари учрайди.

Биркомпонентли фермент актив марказини шакллантирувчи аминокислота қолдиқлари полипептид занжирнинг турли қисмларида жойлашган.

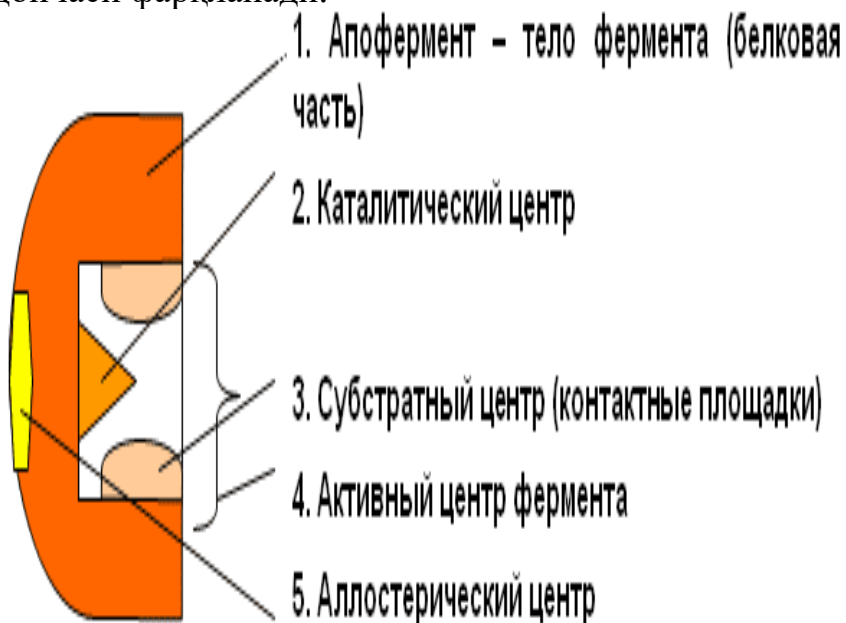


Шунинг учун актив марказ оксил молекуласининг ўзига хос учламчи структураси шаклланаётган пайтда юзага келади.

Демак, у ёки бу факторлар таъсирида фермент учламчи структурасининг ўзгариши каталитик марказ деформациясига ва ферментатив активликнинг ўзгаришига олиб келади.

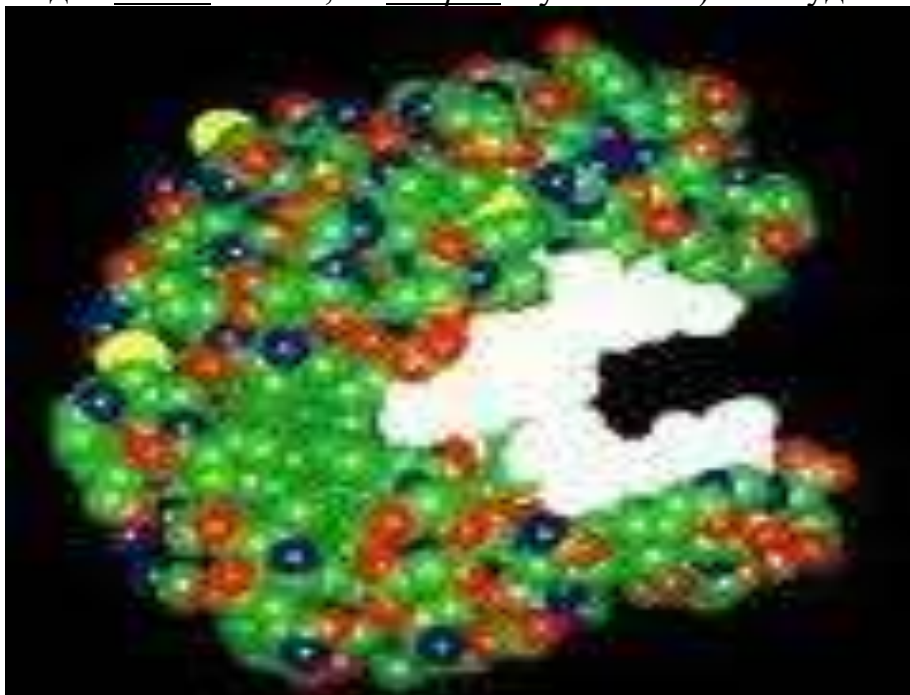
Актив марказда шартли равишда: субстратга бевосита кимёвий таъсир қилувчи каталитик марказ ва

субстратга специфик мос келувчи ва уни фермент билан комплексни шаклланишини таъминловчи субстрат маркази ёки контакт («лангар») майдончаси фарқланади.



Ўз навбатида субстрат молекуласида фермент билан танлаб боғланувчи бир ёки бир неча қисм ва катализга бевосита учрайдиган битта боғ (ёки атомлар гуруҳи) мавжуд бўлади.

Шунингдек фермент молекуласида аллостерик марказ (ёки марказлар) (грекчадан аллос -бошқа, ва стерос -тузилишли)-мавжуд.



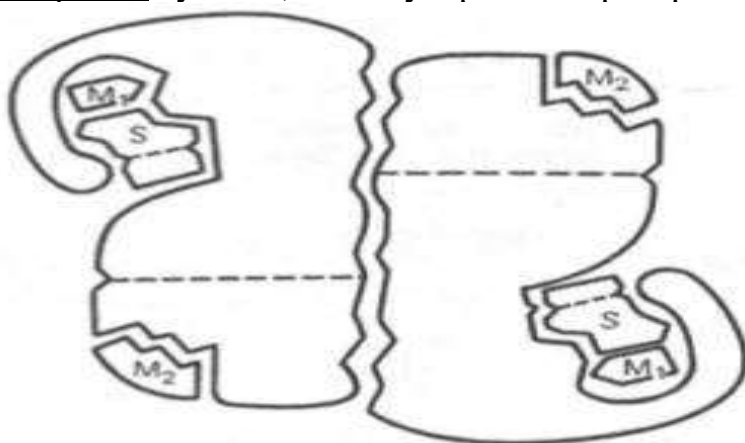
У тузилишига кўра субстратдан фарқ қилувчи паст молекуляр моддаларни (эффекторлар, ёки модификаторларни) боғлаш хусусиятига эга.

Эффлекторни аллостерик марказга боғланиши ферментнинг учламчи ва тўртламчи структурасини ўзгартиради ва актив маркази конфигурацияни ўзгаришига сабабчи бўлади.

Бу ўз навбатида энзиматик активликни ошиши ёки пасайишига олиб келади.

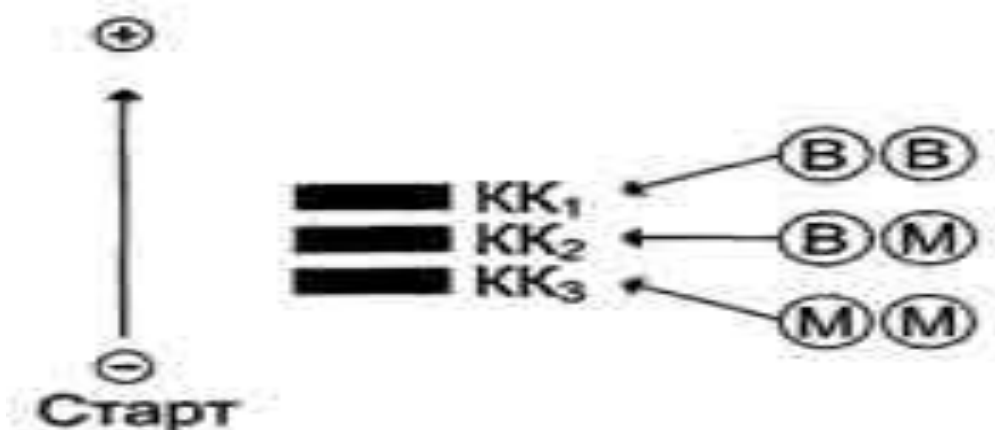
Аллостерик марказ билан эффлекторлар боғланиши оқибатида каталитик марказ фаоллигини ўзгартиш хусусиятига эга ферментлар, аллостерик ферментлар дейилади.

Аллостерик ферментларнинг ўзига ҳослиги олигоферментлар молекуласида бир нечта актив марказ ва бир нечта аллостерик регулятор марказларнинг бўлиши, ҳамда уларнинг бир-биридан узоқда жойлашувидадир.



ИЗОФЕРМЕНТЛАР

Изоферментлар ёки изоэнзимлар -бир хил реакцияларни катализловчи, бир биридан тузилиши, физик кимёвий хоссалари: субстратга мослиги, реакцияни максимал катализлаш тезлиги, электрофоретик ҳаракатчанлиги, реакцияларни бошқарув хусусиятлари билан фарқланувчи ферментларни турлича шакларидир.

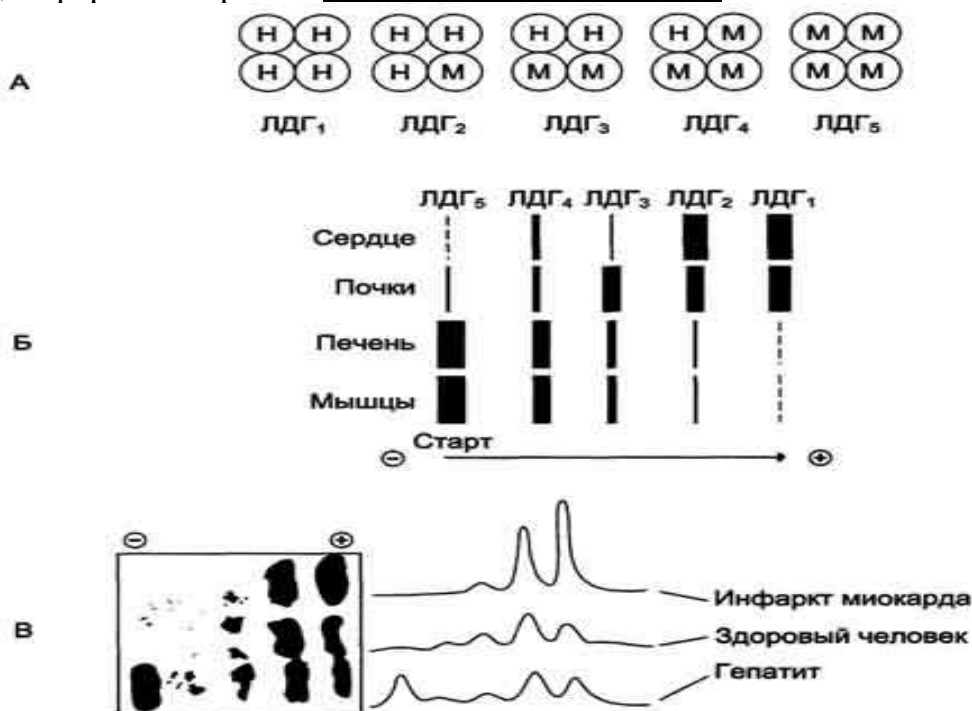


Тирик табиатда бир хил ёки турли бирламчи, иккиламчи ёки учламчи структурага эга, икки ёки кўпроқ суббирликдан тузилган ферментлар молекулалари учрайди.

Суббирликлар одатда протомерлар, улар бирикишидан ҳосил бўлган олигомер молекула-мультимер дейилади.

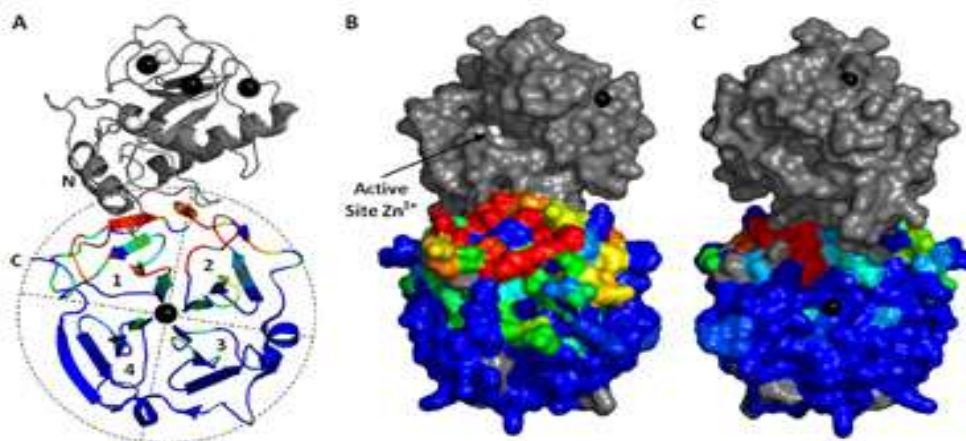
Уларда суббирликларни бириктирувчи ковалент ва валентлик боғлари учрамайди. Асосан ноковалент бўлган боғлар мавжуд, шунинг учун ҳам бундай ферментлар протомерларга осон диссоцирланади.

Алоҳида суббирликлардан структуравий комплексни ҳосил бўлиши, бундай ферментларнинг активлигини белгилайди.



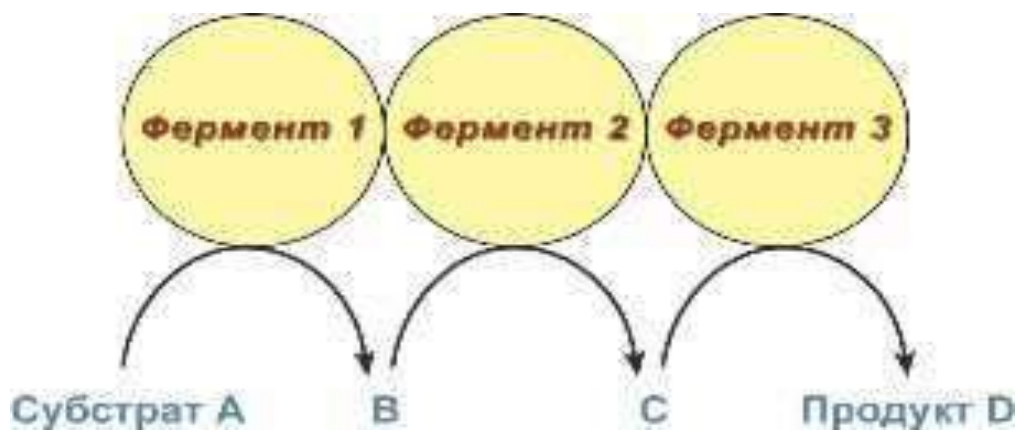
Гель-электрофорез методи ёрдамида яхши ўрганилган 4 ферментдан бири, бу ЛДГнинг изоферментлари бўлиб, улар пирозум кислотасидан сут кислотани ҳосил бўлиши қайтар реакциясини катализлайди.

ЛДГнинг бешта изоферменти иккита турли тип, аммо бир хил тузилган 4 та суббирликдан тузилган.



МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯР ФЕРМЕНТ СИСТЕМАЛАРИ

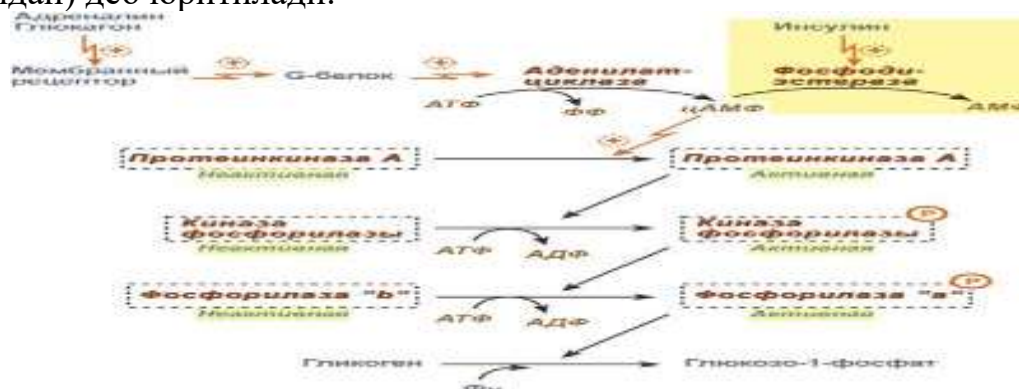
Ферментларнинг алоҳида гуруҳини надмолекуляр (ёки мультимолекуляр) фермент комплекслари ташкил этади. Уларни таркибига бир хил каталитик активликка эга протомерлар эмас, балки субстратни босқичли катализловчи турли ферментлар киради.



Бирор бир органелла (рибосома, митохондрия) ёки биомембрана билан боғланган мультифермент комплексларни баъзан ферментлар ансамбли дейилади.

Улар тўқималарни нафас олиши (нафас олиш ферментлари системаси ёрдамида электронларни субстратдан кислородга ўтказилиши) каби муҳим ҳаётий зарур функцияларни бажарувчи юқори ташкиллаштирилган надмолекуляр системаларни ҳосил қилади.

Агар мультиэнзим комплекси кўп босқичли биокимёвий ўзгаришлар жараёни амалга оширса улар метаболон (метаболизм -моддалар алмашинуви сўзидан) деб юритилади.



Бундай метаболонлар гликолиз, аминокислоталар биосинтези, дикарбон ва трикарбон кислоталар цикли каби жараёнларда қатнашади.

Назорат учун саволлар

1. Ферментларни кимёвий таркиби, тузилиши ва функциялари.
2. Коферментларни хусусияти
3. Актив марказ.
4. Каталитик, субстрат ва аллостерик марказлар.
5. Аллостерик ферментлар
6. Изоферментлар ёки изоэнзимлар
7. ЛДГнинг изоферментлари
8. Надмолекуляр (ёки мултимолекуляр) фермент комплекслари
9. мультифермент комплексларни

4-лаборатория машғулоти

Мавзу: Ферментларни ковалент иммобиллаш. (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган хужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулотида Ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган хужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган хужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга куйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган хужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш усулларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментларни ковалент иммобиллаш механизмини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага иммобилизацияланган хужайра ва ферментлар фаоллигини аниқлашда қайси методлардан фойдаланишни аниқлаш топширилади

Назарий қисм: Иммобилизация усуллари ферментларни табиий ёки сунъий тутувчилар юзасига бириктириш, полимер генга ферментни мембранали капсулалари, тўлиқ толаларини киритиш, фермент молекулаларини кўндаланг тикиш кабилар киради. Иммобилизацияланган фермент иштирокидаги жараёнлар иқтисодий самарадордир. Фруктоза ва глюкозани қўллаш билан глюкоизомеразани олиш жуда арзон бўлади чунки бу ерда иммобилизацияланган фермент препаратлари технологиясига ўтилган. (А.А.Клесов, 1982 й) Ферментлар жараенида гомоген катализаторлар гетероген катализаторларга ўтади. Фермент ва реагентлар ажратилади. Бу эса а) керак бўлганда реакцияни тўхтатиш; б) реакция тугагандан сўнг ферментни регенерлаш ва биотехнологик жараён учун қўллаш; в) реакция маҳсулотини фермент аралашмасисиз олиш бу эса озиқ-овқат ва фармасевтикада муҳим ўрин тутди. Жараёнининг бир ферментатив препаратни қўллаш билан тўхтўвсиз равишда давом эттириш мумкин. Тўхтўвсиз режимли яна бир асосий хусусияти ҳаракатчан ва ҳаракатсиз фазаларни таъмирлашувидир.

Иммобилизацияланган ковалент усулида, тузувчи арматура ролини ижро этадиган ишга мисол қилиб сут эмизувчилар хужайрасини биореакторда гормон ва бошқа қимматли моддалар олиш унинг култивация қилиниши олиш мумкин. Маълумки, хужайра ўсиши улардаги каттик субстратдаги финосацияси билан чимулланади. Фиксация ДЕАЕ-сефидек зарарлари чўкмаси билан таъминланади (W.C. Ху эт ал., 1985).

“Хужайра-тутувчи” контакти кутбли ва ионли ўзаро таъсири, дисперсион таъсир очиди адсорбцияда кучли бўлади.

Олдин амалиётда кенг қўлланган этанол олиш учун ачитқилар бактерия хужайраларини иммобилизацияси, микронормали ионалмашинувчи смоладаги ион кучлари ҳисобига амалга ошади. (А. И Даугулис и др., 1985).

Аминосилазани саноатда Л- ва Д аминокислотаси аралашмасини ажратишда адсорбцияланади.

Керамика ва бошқа тутувчиларда адсорбцияланган ачитқи хужайралари, эркин ачитқи хужайраларидан кўп нафас олиш активлигига эга. (В. Вожтисех, В.Йирху, 1984).

Замонавий ишлаб чиқишида йирик нормали синтетик материаллар ишлайди, улар хужайра массасини ишлаб олади. Кўп тарқалган губкали материал полидретан бўлиб катта ячейкали “кўпик” ҳосил қилади. Кичик қилиб қиймаланган зарраларни биореокторга хужайра билан жойлаштирилади. Хужайралар тутувчи ячейкаларига тузиб, тезда ўсади. Бу тизим оқовосувни тозалашда ишлатилади. (Р.П. Триоло, 1983).

Химий тикишсиз иммобилизацияда биокатолитик тизим хусусиятига тутувчининг кучсиз таъсири кузатилади. Ферментлар табиий активлигини сақлаб қолади хужайралар эса ҳаётчанлигини. Шу вақтнинг ўзида тутувчи билан ферментнинг кучсиз боғи уларни десоросиега олиб келади бу усулни қулайлигини пасайтиради.

Нисбатан мучаҳкам бўлиб ионли таъсирлашувчи ҳисобланади. Ионли адсорбция учун турли тутувчи ишлатилади. Агар биокатализаторини регенерасия қилиш керак бўлса унда эритма алмаштирилади ва фермент десорбцияланади.

Аммо биокатализатор ва тутувчи орасидаги ўзаро таъсир, эритмани катта ион кучида мучаҳкамлик қолади. Бу шароитларда дисперсион ўзаро алоқа принципида адсорбция қулайроқ. Аспарагин кислотасини олиш учун ишлатиладиган аспортиза ферментни хлобчатобумажнўй толада идсарбцияланади. (Ҳ. Уамосаҳи. эт. ал., 1986).

Биокатализаторни тутувчи билан мучаҳкам химиявий тикилишига келадиган бўлсак, бу усул назарий тадқиқотлар билан боғлиқ узун тарихга эга. У кўп сонли модифинансияларни имконини беради. Дярли барча оқсилларни функционал гуруҳлари биокатализатор ва тутувчини топиши учун қўлланилиши мумкин. қисман кенг биокатализатор аминокислотаси ва тутувчи корбонси гуруҳи орасида пептид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реакциялар қўлланилади. Реаксия учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сульфхролид, гидрозин ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳолсил қилади.

Мисол учун биронсиан ва Сл-С-О-СН₂-СН₃ гидрооксин ва аминокислотаси тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реакциялар ўтказилади. Бу хилдаги реакциялардан бири тутувчининг химиявий ҳуруқасида ОН-С-О-СН₂ гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реакцияларни

амалга ошириш учун сикинлашган материалларга малеин ангидрид тутувчи қўшимча чруктуралар қўшилади. Сху усул билан буқани сўвородка албумини глюоноксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус черотхермопХилус хужайраси омадли иммобилизацияланади.

Полимерга у ёки бу ёнаки шохларни бириктириб уни реаксион хусусиятини ва имкониятларни бошқариш мумкин. микросомаларни политенда иммобилизация қилиш қизиқиш уйғотади. Бу шароитда микросомалар юқори чабил монооксигинизоли активлигини сақлаб қолади. Ферментатив активлигни қўшимча чабилизасиясига глисирын қўшиб эритиш мумкин.

Биокатализаторнинг тутувчига химиявий бириктиш йўли билан иммобилизацияси юқори эффективлиги билан ажралиб туради. Иммобилизацияни фермент активлигига таъсири турлича ва фермент чруктурасини ўзгариши учун уни корформасияси субстрат кириши учун дифузион чиксаниш билан белгиланади. Диффузион қийинчиликларни камайтириш мақсадида биокатализаторни айрим ҳолларда тутувчи молекуласи таркибидан чиқарилади. Уни спайсер орқали тутувчига тикилади. Мисол учун сефарозони галатозилтрансдждраза иммобилизасиясидан тутувчи ва фермент орасида - $\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$ -кетма-кетлиги қўшади (Д. Г. Демеррс, С.С. Вонг, 1989).

Спайсерни аптимал узунлигини таъминлаш муаммо саналади. Химиявий тикишни салбий таъсири пайсайтириш мақсадида фермент актив марказида тикиш жойи олиб ташланади. Агар фермент дилигопроедди табиатли бўлса фермент молекуласини оксил қисми эмас, балки углеводли қисмида ковалент тикиш ўтказилади. қандлар спирт гуруҳлари премондатни алдегид гуруҳигача оксидлайди. Бу эса тутувчини аминогуруҳи билан реакцияга киришадию (Ж. Кас эт ал., 1984).

Тикувчи агентсиз қўлланиладиган асосий ҳол сифатида хужайраларни полимер серканигидрооксиди титан, олова ва темир тутувчиларда иммобилизасияланади. (В. Вожтисех, В. Йирху, 1984). Гидроогкид гуруҳлар хужайра деворини у ёки бу метал функционал гуруҳлари кординасион сферасидан чиқарилади. Тутувчи ва биокатализатор орасида кординасион ёки ковалент боғ ўрнатилади.

Ферментлар ва ферментлар сичемаси амалий фаолиятнинг ҳар хил сохаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат сохаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органиқ синтез, кимиёвий тахлил ва. хзо. Схунга қарамасдан амалий энзимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жахон бозорида жуда қиммат эди. Микробиологиянинг ривожланиши натижасида ферментларни керакли миқдори ишлаб чиқариш мумкин бўлди. Ферментларнинг қўлланилишини яна 2та сабаб қийинлаштиради. Биринчидан - ферментларни сақлаш қийин ва ҳар хил таъсирлар, айниқса иссиқликка чидомсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни

реагентдан ва реакция маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидадир. Лекин ҳозирги шунда бу муаммолар ҳал қилинган.

Иммобилизацияланадиган ферментларнинг яратилиши натижасида амалий энзимология олдида янги принциплар ички бўлди. Дж. Нелсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ кумирда адсорбцияланган (яъни иммобилизацияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Схлейх ёғирик кипида адсорбцияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг муҳаммад конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Схлейт томонидан олинди.

Ферментларни ташувчиларга бириктириш натижасида гетероген катализаторлар яратилиб уларга 1971 йилда иммобилизацияланган ферментлар деб қам берилди. Унинг маъноси анча аниқ бўлиб, бу фермент препаратларининг эримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизация тушунчасини анча кенг тушуниш керак: бу оксил молекуласининг (ёки унинг фрагментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. эримайдиган ташувчига бириктиришдан ташқари буни оксил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки молекулалар ўртасидаги боғлар қуйи молекуляр бифункционал реагентлар ёки ферментни эрувчи полимерга бириктириб эришиш мумкин.

Иммобилизацияланган ферментлар бир қатор афзалликларга эга. Биринчидан, гетероген катализатор реакция муҳитидан осон ажралади бу эса :а) реакцияни керакли вақтда тўхтатиш имконини беради ; б) катализатордан қайта фойдаланиш; в) фермент аралашмаган маҳсулот олиш мумкин. Охиригиси айниқса озиқ-овқат ва ферментсезлик ишлаб чиқаришда жуда муҳимдир. Иккинчидан: гетероген катализаторларнинг қўлланилиши ферментатив жараёни узлуксиз олиб бориш имконини беради. Масалан: оқиб ўтувчи колонкаларда реакция тезлигини бошқариш , шу билан бирга маҳсулот ҳосил бўлишини оқим тезлигини ўзгартириб эришиш мумкин.

Учинчидан: ферментнинг иммобилизация ва модификацияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофиқ ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг pHга, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига боғликлиги, унинг ҳар хил денатурасияловчи таъсирларга нисбатан барқарорлигини таъминлайди.

Туртинчидан: ферментларнинг иммобилизацияси уларнинг каталитик активлигини ташувчи хусусиятларига ҳар хил физик омиллар таъсир эттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиклар, пач товушларни кучайтиргичлар ва яратиш имконини беради.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Ферментларни ковалент иммобиллаш ҳақида маълумот беринг?
2. Иммобилизацияланган ҳужайра ҳақида маълумот беринг?
3. Ферментларни саноатда қўллаш ҳақида маълумот беринг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

5-лаборатория машғулоти

Ферментни бифункционал агент орқали имобиллаш (2соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:

Охириги 15-20 йиллар мобайнида кимёвий энзимологиянинг ривожланиши натижасида биологик катализаторларнинг янги типи – **иммобилланган ферментлар** яратилди. Маълумки тоза ферментлар, биринчидан, узоқ вақт сақланмайди, ҳамда турли таъсирларга, айниқса иссиқликка чидамсиз, ҳамда иккинчидан, уларни қайтадан ишлатиш имкони йўқ. Иммобилланган ферментларнинг яратилиши билан саноат ишлаб чиқаришида тоза ферментлар фойдаланишда юзага келадиган қийинчиликлар бартараф етилди.

Иммобилланган ферментлар ферментатив жараёни узлуксиз ўтказиш ва реакция тезлигини бошқариш имконини беради. Ферментларни имобиллаш билан ташувчининг хусусиятини ўзгартириш ҳисобига уларнинг каталитик фаоллиги бошқарилади.

“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш еркинлигини исталган чекланишини англатади.

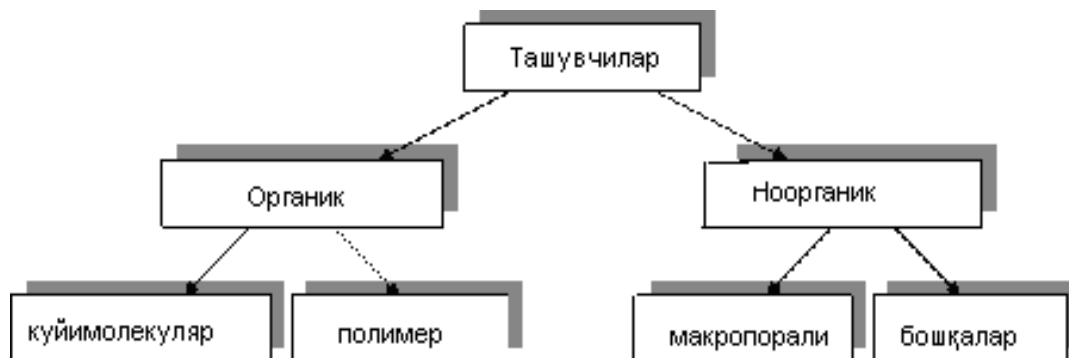
Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

Ферментларни имобиллаш учун органик ва ноорганик ташувчилар ишлатилади. Уларга қўйиладиган асосий талаблар:

- юқори кимёвий ва биологик турғунлик

- юқори кимёвий мустаҳкамлик
- фермент ва субстратлар учун етарли даражада ўтказувчан, ғоваклилиги, солиштирма сирти юқори бўлиши;
- технологик жиҳатдан қулай шаклларда олиниши (гранулалар, мембраналар);
- осон активланиши;
- юқори гидрофиллик
- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



Органик (паст ва қуйимолекуляр) ташувчилар табиий ёки синтетик бўлиши мумкин. Табиий полимер органик ташувчилар ўз навбатида биокимёвий классификациясига кўра 3 гуруҳга бўлинади: полисахаридли, оксилли ва липидли.

Синтетик полимерларни макромолекуласининг асосий занжирини кимёвий тузилишига кўра полиметиленили, полиамидли, полиэфирли гуруҳларга бўлиш мумкин.

Ферментларни иммобиллаш учун табиий полисахаридлар ва полиметил типидagi синтетик ташувчилар кўпроқ ишлатилади. Бунинг сабаби уларда кимёвий реакцияларга осон кириша оладиган реаксион хусусиятли функционал гуруҳлари мавжуд, ҳамда уларнинг гидрофиллигидир. Камчилиги еса микроорганизмларнинг таъсирига чидамсиз ва қимматроқдир.

Полисахаридли ташувчилардан селлюлоза, декстран, агароза ва уларнинг ҳосилалари ишлатилади. Селлюлоза гидрофил хоссали, унда гидроксил гуруҳи кўп бўлиб, шу гуруҳ хисобига уни модификациялайди. Селлюлозани қисман гидролизлаб (бунда аморф участкалари бузилади) гранула ҳолига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Гранулаланган селлюлозани ДЭАЭ-селлюлоза, КМС ва б. сингари турли ионалмашувчиларнинг ҳосилаларига айлантириш мумкин.

Декстран асосида ишлаб чиқилган "Сефадекслар" деб номланувчи ташувчилар ҳам кенг ишлатилади. Қуритилганда улар осон сиқилади, сувда кучли шишади. Ушбу ташувчилардаги поранинг размери "чоклилик" даражаси билан бошқарилади. Декстранларнинг мазкур гуруҳига крахмал ҳам киради. Кимёвий модификацияланган крахмал агентлар билан "тиқилади", масалан формалдегид билан. Шундай йўл билан гидролизга, ферментларга нисбатан чидамли бўлган ғовак крахмал олинган. Декстран асосида яратилган сувда ерувчан препаратлар тиббиётда доривор воситалар ташувчи сифатида ишлатилади.

Ферментларни иммобиллаш методлари.

Ферментларни иммобиллаш икки хил метод билан амалга оширилади: физикавий ва кимёвий.

Ферментларни физикавий иммобиллаш – бу ферментни шундай бир муҳитга жойлаштириш бўлиб, бунда фермент умумий ҳажмининг бир қисмигина қира олади. Физикавий иммобиллашда фермент билан ташувчи ковалент боғ билан боғланмайди. Ферментларни боғлашни 4 типи маълум:

- еримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш;
- гел порасига киритиш;
- яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган ҳажмидан фазовий ажратиш;
- икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент ерийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Бу усуллар куйидаги расмларда келтирилган.

Адсорбцион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг сувли еритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбцияланмаган оксил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг адсорбцияланган молекуласи ташувчи ва оксилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваалс ўзаро таъсирлашуви, водород боғлари, электростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функционал гуруҳларга боғлиқдир.

Ташувчи билан фермент ўртасидаги таъсир кучли бўлиб, биокатализаторнинг сорбцияси унинг структурасини бузиши мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик хужайраларини ситодекс гранулаларида адсорбцияланишида хужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг релефени такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбцион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовақ қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбцион боғланишда ферментни тозалаш ҳам мумкин. Ушбу методнинг камчилиги ташувчи, ҳамда аниқ бир ферментни иммобиллаш учун оптимал шароитни тўғри танлай имконини берадиган умумий йўриқноманинг йўқлигидир.

Кўрсатилган камчиликларни иммобилланган ферментларни гелга киритиш билан бартараф қилиш мумкин. Ушбу методнинг мақсади – фермент молекуласини полимер занжирларидан тўқилган 3 фазали тўрға (гелга) ўтказишдир. Гелдаги қўшни занжирлар орасидаги ўртача масофа киритилган фермент молекуласининг размеридан кичикдир. Шунинг учун у полимер матрицани тарқ етолмайди ва атрофдаги еритмага чиқолмайди, яъни иммобилланган ҳолатга бўла олмайди.

Ферментларни гелда иммобиллашнинг 2 та асосий усули маълум. Биринчисида фермент мономернинг сувли еритмасига солинади, кейин полимеризацияланади. Натижада полимерли гел ҳосил бўлади. Реакцион аралашмада кўпинча полимерга уч ўлчамли тўр структурасини берувчи бифункционал (молекуласида 2 та қўш боғи бор бўлган) агентлар қўшилади. Иккинчи ҳолатда фермент тайёр полимер еритмасига солинади ва унга гелсифат ҳолатга ўтказилади. Ферментларни полимер гелга киритиш билан иммобиллаш препаратга исталган геометрия конфигурация бериш билан бирга ташувчида биокатализаторларни текис тақсимлаш мумкин. Метод универсал ҳисобланади, деярли барча ферментлар, полифермент системалар, хужайра фрагментлари ва хужайраларни иммобиллаш учун қулай. Гелга киритилган фермент бактериялар билан зарарланишдан ҳимояланган.

Мембраналар ёрдамида ферментларни иммобиллашнинг моҳияти шундаки, бунда ферментнинг сувли еритмаси субстратнинг сувли еритмасидан яримўтказувчан мембрана ёрдамида ажратилади. Яримўтказувчан мембрана субстратнинг кичик молекулаларини осон ўтказди, катта молекулаларни еса ўтказмайди.

Кимёвий метод билан иммобиллашда фермент молекуласи, хусусан оксил, билан ташувчи ўртасида янги ковалент боғ ҳосил бўлади. Ушбу йўл билан иммобилланган ферментларнинг препаратлари 2 та муҳим ютуққа ега. Биринчидан, ташувчи билан фермент ўртасидаги ковалент боғ ҳосил бўлган конъюгатнинг мустаҳкам бўлишини таъминлайди,

ташки муҳит омиллари, масалан рН, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантормайди. Бу еса тиббиёт ва озик овқатга мўлжалланган жараёнларни амалга оширишда жуда муҳим. Иккинчидан, ферментларни кимёвий модификациялаб уларнинг каталитик фаоллиги, барқарорлиги каби хоссасини ўзгартириш мумкин. Бунда ферментнинг фаол марказини иложи борича сақлаб қолиш керак.

6-лаборатория машғулоти

Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятлари, ферментлар фаоллигига ҳарорат, pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқиладди.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принципи, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментлар фаоллигига ҳарорат аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага ферментлар фаоллигига pH ва фермент концентратсиясининг таъсирини аниқлаш топширилади

Назарий қисм:

Ферментларнинг махсуслиги

Ферментларнинг махсуслиги ўзига хос хусусият бўлиб, бу нарса фермент таъсир этадиган субстратнинг кимёвий тузилиши билан боғлиқ бўлади. Ҳар бир фермент маълум бир субстратгагина таъсир эта олади.

Амилаза ва уреазаларнинг махсуслигига хос реакциялар

Маълумки, крахмал йод билан кўк ранг ҳосил қилади. Унинг амилаза таъсирида парчаланиши дачлаб декстринлар (амило-, эритро-, ахро-, малтодекстринлар) ни, кейин малтоза ва ундан кейин глюкозани ҳосил бўлишига олиб келади. Крахмалнинг парчаланиши натижасида парчаланишнинг ахродекстрин босқичидан ўтгандан кейин унинг

фрагментлари йод билан ҳеч қандай ранг ҳосил қилмайди. Йодли реактив кричалл йодни калий йод эритмасида эритиб тайёрланган эритма ҳисобланади. Уни тайёрлаш учун 100 мл дичилланган сувда 20 г калий йод эритилади ва уни учига 10 г йод кричали солиниб аралаштирилади. Крахмални аниқлаш учун аралашма 5 марта суюлтирилади.

Соя ўсимлиги дуккагида эса уреаз ферменти бўлиб, у сийдикчилни гидролизланишини катализлайди ва реакция натижасида аммоний карбонат ҳосил бўлади:



Бу иккала фермент учун ҳам пХ-оптимум кўрсаткичлари жуда яқин, яъни сўлак амилазаси учун пХ – 6,8 бўлса, соя уреазаси учун пХ – 7,0 ҳисобланади. Сху боис, ферментларнинг махсуслигини шу икки фермент ёрдамида намоиш қилиш ўринли бўлади.

Амилазанинг махсуслигини ўрганиш учун сўлак суюқлигидан фойдаланилса, уреза учун соя ўсимлиги уруғидан ажратиб олинган экчрактдан фойдаланилади.

Сўлак суюқлигини ажратиб олиш. Сўлак суюқлигини ажратиб олиш учун оғиз бўшлиғига дичилланган сув олиб чайқатилади. Сўнг яна оғизга дичилланган сув олиниб, 1 минут давомида ушлаб турилади, бу сўлакли суюқлик алоҳида конуссимон колбага ўтказилади ва воронкага филтр жойлаштирилиб бошқа идишга филтрланади ҳамда дичилланган сув ёрдамида 10 марта суюлтирилади.

Соя уруғидан уреаз ферменти экчрактини ажратиб олиш. куруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва кўп карра петролей эфири билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози учида қурилади ва унга 5 0С да беш ҳажм бирлигида дичилланган сув қўшилади. Аралашма центрифугаланади ва ҳосил бўлган центрифугатнинг таркиби айнан уреаз ферментли экчракт ҳисобланади.

Иш тартиби: Иккита пробиркага (1 ва 2) 5 мл дан 0,1 % ли крахмал эритмаси (крахмал эритмаси олдиндан И ва КИ эритмаси солганда ҳаворанг рангга бўялиши бу олдиндан синаб кўрилган бўлиши лозим) солинади. Сўнг бошқа иккита пробиркага (3 ва 4) олдиндан бир неча томчи фенолфталеин қўшиб қўйилган сийдикчилнинг 1 % ли эритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин 1- ва 3-пробиркаларга 1 мл дан филтрланган ва суюлтирилган сўлак эритмаси ҳамда 2- ва 4- пробиркаларга эса 1 мл дан юқорида келтирилган тартибда тайёрланган уреаз ферменти экчракти солинади. Аралашмалар яхшилаб аралаштирилади ва 20 минутга 38-40 0С ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади. қиздириш ниҳоясига етгандан сўнг 1- ва 2-пробиркаларга йод эритмасидан бир томчи томизизади. Бунда 1-пробиркадаги аралашманинг кўк рангги ёъқолади, чунки крахмалга сўлак амилазаси таъсир этиши туфайли у парчаланган бўлади, 2-пробиркага эса уреаз ферменти экчракти солинганлиги сабабли реакция содир бўлмайди ва кўк ранг

сақланади. 3-пробиркада амилаза ферменти сийдикчилга таъсир эта олмайди, реакция муҳитида ўзгариш бўлмайди, 4-пробиркада уреaza таъсиридаги реакция туфайли фенолфталеин гулоби рангга бўялади, чунки сийдикчил гидролизланади.

Ферментларнинг термолабиллиги ва pH кўрсаткичларининг ферментатив реакцияга таъсири

Ферментлар термолабил ва муҳитнинг водород иони кўрсаткичига сезгир, яъни ҳарорат ва муҳитнинг pH кўрсаткичларини қисман ўзгариши ҳам ферментатив жараёнга кучли таъсир кўрсатади.

Ферментатив реакцияларнинг термолабиллигини аниқлаш

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 5 мл дан 0,1 % ли крахмал эритмаси солинади. Бундан кейин уларнинг биринчиси ва иккинчисига 1 мл дан дичилланган сув, учинчисига 1 мл 0,1 н хлорид кислота эритмаси солинади. Сўнг биринчи ва учинчи пробиркаларга 1 мл дан суюлтирилган сўлак эритмаси, иккинчи пробиркага шунча миқдорда қайнатиб совитилган сўлак эритмаси солинади.

Уччала пробирка ҳам 20-25 минутга 37 0C ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан сҳиқарилиб, муз солинган идишга ўтказилиб совитилади ва уларнинг ҳар бирига 1-2 томчи йоднинг калий йоддаги эритмасидан томизилади. Бунда биринчи пробиркадаги крахмалнинг парчаланиши юз бериши туфайли йод эритмаси билан кўк ранг ҳосил бўлмайди. Иккинчи пробиркада сўлак таркибидаги амилаза фаолсизланганлиги туфайли реакция юз бермаганлиги, яъни ранг ўзгармаганлиги, учинчи пробиркада муҳит нордон бўлганлиги сабабли реакция секинлашганлиги кузатилади. Демак, иккинчи ва учинчи пробиркалар йод ва калий йодли аралшма таъсирида кўк рангга бўялади.

Ферментатив реакция тезлигига ҳароратнинг таъсирини аниқлаш

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига крахмалнинг 0,25 % ли эритмасидан 5 мл дан солинади. Бундан кейин биринчи пробиркани муз солинган идишга, иккинчи ва учинчи пробиркаларни 38 0C ли термостатга жойлаштирилади. Сўнг биринчи ва иккинчи пробиркаларга 0,5 мл дан суюлтирилган сўлак, учинчи пробиркага худди шу миқдорда қайнатиб совитилган сўлак қўшилади. Вақти-вақти билан иккинчи пробиркадаги аралашмадан бир томчи олиб, учига 1 мл йоднинг калий йодли эритмаси қўшиб, аралаштирилади. Сху ёъсинда крахмалнинг парчаланиш динамикаси кузатилади. Ёнг охирида, иккинчи пробиркадан олинган томчини солинганда солинган йодни калий йодли эритма билан ранг ҳосил қилмайдиган пайт келади. Бу нарса крахмалнинг сўлак таркибидаги амилаза иштирокида тўлиқ парчаланганлигини кўрсатади.

Кейин ҳамма пробиркалардаги аралашмаларга 3-4 мл дан 1 н H_2CO_4 қўшилади ва совитилади. Уччала пробиркаларга ҳам йоднинг калий йодли эритмасидан 2-3 томчи томизилади. Бунда иккинчи пробиркада крахмалнинг парчаланиши ниҳоясига етади ва ранг ҳосил бўлмайди, биринчи пробиркада

крахмалнинг парчаланиши қисман юз бериб қизғиш ранг ҳосил бўлади, учинчи пробиркада крахмал умуман парчаланмайди ва кўк ранг ҳосил бўлади. Ферментатив реакциялар тезлигининг фермент концентрациясига боғлиқлигини аниқлаш

Иш тартиби: Тўртта пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 3 мл дан пХ кўрсаткичи 6,8 бўлган фосфат-цитрат буфер эритмаси ҳамда 4 мл дан 0,25 % ли крахмал эритмаси қўшиб аралаштирилади. Сўнг биринчи пробиркага 20 марта, иккинчи пробиркага 40 марта, учинчи пробиркага 80 марта ва тўртинчи пробиркага 160 марта суюлтирилган сўлак эритмаларидан 1 мл дан қўшилади ва бу аралашмалар 38-40 0C ли термостатга ўтказилади. Бундан кейин вақти-вақти билан намуналардан бир неча томчи олиб, жуда кучли равишда суюлтирилган йоднинг калий йодли эритмаси билан аралаштирилади. Намуналар дачаввал кўк, сўнг қизғиш-бинафша рангга бўялади. Тўрттала пробирка учун ҳам йод билан кўк рангга бўялишининг ёқолиши 0,5 минут аниқликда қайд қилинади. Бу фурсат оралиғи амилолитик парчаланишнинг ниҳояси ҳисобланади. Тажриба натижалари эгри чизиқ орқали ифодаланиб, бунда абсцисса ўқига амилазанинг нисбий концентратсияси, ордината ўқига эса унга тегишли бўлган вақт бирлиги жойлаштирилади. Амилолитик реакция туфайли крахмалнинг парчаланиши учун сарфланган вақт реакция тезлигига тескари пропорционал бўлади.

Сўлак амилазаси фаоллигига фаолловчилар ва ингибировчиларнинг таъсирини ўрганиш

Сўлак амилазасига паст концентратсияли NaCl тузи фаолловчи омил сифатида таъсир кўрсатади. Хусусан, диализ қилинган сўлак амилазасини крахмалга нисбатан фаоллиги йўқолади. Худди шунингдек, баъзи метал тузлари ферментларга фаолловчи таъсир кўрсатиши ва бошқалари ингибировчи таъсир кўрсатиши мумкин.

Иш тартиби: Учта пробирка олиб, уларга 5 томчидан 0,5 % ли крахмал эритмасидан томизилади, биринчи пробиркага 10 томчи дичилланган сув, иккинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли NaCl эритмаси, учинчисига 8 томчи сув билан 2 томчи 1 % ли CuSO_4 эритмаси томизилади, ҳаммасига 5 марта суюлтирилган сўлакдан 10 томчидан қўшиб, яхшилаб аралаштирилиб, хона ҳароратида қолдирилади. 5 минутдан кейин уччала пробиркага ҳам 10 томчидан дичилланган сув, 1-2 томчидан 0,1 % ли йод эритмасидан солиб аралаштирилади, уларнинг учига тажрибадаги уччала пробиркадаги аралашманинг ҳар биридан 2-3 томчидан алоҳида пробиркаларга томизилади. Йод билан қилинадиган реакция 10-15 минутда яна такрорланади. Биринчи пробиркадаги суюқлик бинафша ёки қизил рангга, иккинчиси қизил ёки сариқ, учинчиси эса кўк рангга киради. Демак, иккинчи пробиркада крахмал яхшироқ гидролизланган, учинчисига умуман гидролиз кетмаган. Иш натижаси жадвалда (4-Жадвал) қайд қилинади.

Амилаза фаоллигига фаолловчи ва ингибирловчиларнинг таъсири

№	Фермент	Субстрат	Ферментинг таъсир этиш вақти, мин	Реакцион аралашманинг йод билан берган ранги		
1	Сўлак амилазаси	Крахмал	5			
2	Сўлак амилазаси	Крахмал	10			
3	Сўлак амилазаси	Крахмал	15			
Хулоса:						

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятлари ҳақида маълумот беринг?
2. Ферментлар фаоллигига ҳароратнинг таъсири ҳақида маълумот беринг?
3. Ферментлар фаоллигига pH ва фермент концентратсиясининг таъсири ҳақида маълумот беринг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:Мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулоти ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎЗМУ. 2007. 56б.
3. Давронов .Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

7-лаборатория машғулоти

Мавзу: Чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усулларини ўрганиш борасидаги ишлар ўрганиб чиқилади.

Керакли асбоб-ускуналар: керакли жиҳоз, асбоб-ускуналар, ишлаш принциплари, ишни бажариш тартиби, ушбу услубий қўлланмадан олинади.

Лаборатория иши бажаришда гуруҳ 3 та гуруҳчага ажратилади ва уларга қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш усуллари аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усуллари аниқлаш топширилади. 3-

гурухчага чиқиндисиз технологиялар яратишнинг замонавий усуллари аниқлаш топширилади.

Назарий қисм: Адсорбция қилиш йўли билан иммобилизация қилиш энг содда усуллардан бўлиб, фермент эритмасини "ташувчи" билан аралаштириш йўли билан амалга оширилади. Ёпишмасдан ферментни ювиб ташлагач, иммобилизация қилинган фермент ишлатилишга тайёр бўлади. Адсорбцион иммобилизация қилинган ферментларни олиш учун қуйидаги услубий кўрсатмалардан фойдаланади.

Статичик усул энг осон йўл бўлиб "ташувчи" фермент эритмасига ташланиб (солиниб) ҳосил бўлган аралашма, маълум вақтга ташлаб қўйилади. Иммобилизация ферментни ўз ўзидан диффузияси туфайли бошланиб, адсорбция билан тугалланади. Бу усулни камчилиги, фермент эритмаси билан "ташувчи" аралашмаси узоқ вақт (бир неча кунга) ташлаб қўйилиши лозим. Лаборатория шароитида кўпроқ аралаштириш усули ишлатилади. Бу усулда чатичик усулдан фарқли ўлароқ фермент эритмаси билан "ташувчи" доимий равишда аралаштириб турилади.

Аралаштириш учун магнит аралаштиргич, механик аралаштиргич ёки микробиологик тебратгичдан фойдаланиш мумкин. Бу усул олдингисидан анча учун туриб "ташувчи" сатхида ферментни бир текис жойланишини белгилаб беради. Баъзида адсорбцион иммобилизация қилиш учун электрочўктириш усулидан фойдаланилади. Бунинг учун фермент эритмасига иккита электрод туширилади, улардан биттасини сатхида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатхидаги фаол гуруҳлар ($-NH_2$; $-COOH$ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатхида чўқади.

Технологияда фойдаланиш учун энг қулай усул - колонкалардан ўтказиш усулидир.

Бу усулни икки модификацияси бор, улардан биридан "ташувчи" тўлдирилган колонкадан тепадан пачга қараб, микронасослар ёрдамида фермент эритмаси ҳайдалади, икинчисида эса тескариси, фермент пачдан тепага қараб ёъналтиради. Бу усулни афзаллик томони, ферментни ҳайдаш, ювиш, ва кейинги ферментатив жараёнлар, ҳеч қандай манипуляциясиз бир колонкани ўзида олиб борилади.

Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбцион ўзаро таъсирнинг табиати

"Ташувчи" сатхида адсорбция бўлган фермент молекулалари ҳар хил кучлар ҳисобига, хусусан носпесифик Ван-дер-Ваалс, электрочатик, ўзаро таъсирлар, водород боғлари ва гидрофоб боғлар ҳисобига амалга оширилади. Санаб ўтилган боғларни нисбий иштироки фермент молекуласидаги фаоллик гуруҳлари ёки "ташувчи"нинг кимёвий табиатига боғлиқ бўлади. Кўпчилик ҳолларда асосий вазифани электрочатик ўзаро таъсирлар ва водород боғлари ташкил этади.

Баъзи вақтларда ўзаро таъсир кучи оқибатида "ташувчи"нинг тузилиши бузилишига бориш мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик хужайраларини ситодекс гранулаларига адсорбция қилинганда хужайра девори деформасияга учрагани кузатилган.

Ферментлар адсорбциясига таъсир этувчи омиллар

Адсорбция ўтиш жараёни ва фермент билан "ташувчи" орасидаги боғни мучахкамлиги, кўпчилик ҳолларда иммобилизация қилиш шароитига боғлиқ бўлади.

Фермент адсорбциясига таъсир этувчи омилларга қуйидагилар киради: ташувчини ғоваклиги ва сиртини фаоллигидир.

Ташувчини сорбсия қилиш ҳажми унинг сиртини фаоллигига тўғри пропорционал оксил ёки ферментга келганда бу қонуният фақатгина ташувчини ғоваклиги оксил молекуласидан анчагина катта бўлгандагина ўз кучини саклайди. Ташувчини ғоваклиги жуда кичик бўлганда, ферментлар ғовакларга сиғмасалар, ферментлар учун ташувчилар сатхининг маълум бир қисмигина фойдали бўлади холос.

Бундай пайтларда ташувчининг сорбсия қилиш имкониятлари жуда кам бўлади, бошқача қилиб айтганда, ғоваклар қанча кичик бўлса, ташувчининг адсорбция қилиш имкониятлари шунча кам бўлади. Ғовакларни мўтадил ҳажмини ҳисоблашни биринчилардан бўлиб буни 1976 йилда Р.Мессинг таклиф этган.

У шиша ва сопол материаллардан ташувчи сифатида фойдалана туриб, уларни ғовакларини катталигини (ҳажмини) ўлчаб чиқди ва ғовакларни катталиги фермент бўйидан тахминан 2 маротаба катта бўлган ҳолларда ташувчини адсорбцион имкониятлари максимум бўлишини тажрибалардан исботлаб берди.

Бундай ҳолда субстратни молекуляр ўлчами ферментдан анча кичик бўлмоғи ва сорбсия қилинган фермент ғовакларига бемалол кириб туришлари лозим, албатта.

Субстрат молекуласининг ҳажми ферментникидан катта бўлган ҳолларда ташувчининг ғоваклиги субстрат молекуласи билан белгиланади. Баъзи бир ҳолларда субстратни ўзи ташувчи вазифасини бажариши ҳам мумкин. Масалан, целлюлаза ферментини иммобилизация қилиш учун унинг субстрати бўлган целлюлозадан кенг фойдаланилади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш ҳақида малумот беринг?
2. Чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усуллари ҳақида маълумот беринг?
3. Чиқиндисиз технологиялар яратишнинг замонавий усуллари ҳақида маълумот беринг?

Адабиётлар:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:Мир. 2002
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
3. Давронов. Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
4. www.молбиол.ру
5. www.зиё.нет

8-Лаборатория машғулоти

Бактерия полосахаридларини ажратиш олиш (2 соат)

Машғулотдан мақсад: Микроорганизмларни екиш учун озук муҳити тайёрлаш ва стерилизация қилиш ҳамда продуцент суюқ ва қаттиқ озук муҳитида ўстириш

Керакли асбоб ва жиҳозлар:Микроскоп,аналитик тарози,мензурка,петри ликопчаси ,центрифуга,спирт лампаси, натрий гидрооксид ,натрий сульфат ,сульфат кислота,термостат,микробиологик кесгич,озук муҳитлар,биотехнологик объект

Ишнинг бажарилиши:Ўрганилаётган бактерияларнинг биомассасини кўпайтириш учун озук муҳити тайёрлаш, стериллаш, унга продуцентларни екиш ва биомасса олишни ўрганиш.

2) **Ишнинг ташкил этилиши:** мураббий гуруҳ талабаларини икки гуруҳга ажратади.

Биринчи гуруҳ талабалари: суюқ озук муҳити таркибини тузади, стерилизация қилишади ва продуцентни екиб, зарур кўрсаткичларни таъминлаган ҳолда микробиологик қачалкага идишларни жойлаштиришади. Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суюқликка озук таркиби тузишлари лозим;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озук муҳити тайёрлашади, стерилизация қилиб, продуцентларни екишади (Петри ликопчаларига) ва термостатга жойлаштиришади. Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суюқликка озук таркиби тузишлари лозим;

Жараёнлар давомида мураббий талабаларнинг берган саволларига жавоб бериб бориши ва туғилган муаммоларни ҳал этишда амалий ёрдам бериши лозим.

Дарс (иккинчи жуфтлик) охирида талабалар лаборатория дафтарларига қайд этилган маълумотлар асосида коллоквиум топширади ва машғулотга ажратилган рейтинг балини олади. Рейтинг балини тўплай олмаган талаба кейинги машғулотгача ушбу лаборатория ишини қайта топшириши мумкин.

Лаборатория ишигача техник ходим ёки лаборант талабалар учун 2 сутка давомида колбаларда ва косякларда ўстирилган (Петри ликопчасида ўстириш ҳам мумкин) продуцент микроорганизм култураси ва стерил идишлар билан таъминлаши лозим. Шунингдек, автоклавни зарур вақтда қўшиб, стрейллаш жараёнига тайёрлаб беради. Бундан ташқари микробиологик қачалкада қолдириладиган културал суюқликни назорат қилиш ва кейинги машғулотгача сақлашни таъминлаши зарур.

Мураббий томонидан ҳар иккала гуруҳнинг бир вақтда стериллаш жараёнини амалга оширилиши назорат қилиниди. Стерилизация вақтида еса зарур бўлган маълумотларни талабалар дафтарларига қайд этиб қўядилар.

3) Тушинтириш:

Айни вақтда жаҳон аграр саноати амалиётида микроб инсектицид биопрепаратлардан кишлоқ хўжалиги екинларини зараркунанда хашаротлардан химоя қилишда унумли фойдаланиб келинмоқда.

Бу борада Бац.тхурингиенсис турига мансуб энтомопатоген бактериялар асосида тайёрланаётган инсектицидлар асосий ўрин тутаяди. Шу боисдан Бац.тхурингиенсис бактерияси асосида биопрепарат тайёрлаш учун мўтадил ва арзон озук муҳити танлаш катта амалий аҳамият касб этади.

Адабиётлардан маълумки Бац.тхурингиенсис бактерияси штамmlарини ўстириш учун асосан глюкоза қўшилган маккажўхори, ачитки ва куруқ ачитки экстрактлари асосида тайёрланган озук муҳитларидан фойдаланилади.

Маълумки, Бац.тхурингиенсис бактерияларини биотехнология саноати миқёсида ўстириш учун таклиф етилган маккажўхори экстракти ва глюкоза сақловчи озиқа муҳити ехтиёжга етарлича жавоб бермайди, шунингдек, маккажўхори экстрактининг беқарорлиги ва глюкозанинг танқислиги бу озиқа муҳити ўрнини босадиган арзон ва мўтадил озиқа муҳити манбаларини топишни тақозо этади.

Шу боисдан мазкур ишда биз Бац.тхурингиенсис ентомопатоген бактерияси штаммлари учун қуйидаги озуқа муҳитида ўстиришни тавсия этамиз: стандарт озиқа муҳити: Пептон-1,0; NaCl-0,05; K_2HPO_4 -0,05; $MgSO_4$ -0,02; (pH 7,0) (1л. суюқлик учун). Бунда культуралар юқори даражада маҳсулдорлик кўрсатади. Ушбу озуқа муҳити асосида асосан лаборатория ишлари бажарилади.

Унинг асосида ишлаб чиқаришни ташкиллаштириш еса иқтисодий самарадорликка олиб келиши мумкинлиги исботлаб берилган. Шунинг учун лаборатория шароитида биз мақсадимиз фақатгина ушбу бактериялар синтез қиладиган кристалл оксилларни ўрганиш бўлганлиги учун ҳоҳлаган озуқа муҳитидан фойдаланишимиз мумкин.

Қуйидаги расмда ўрганилаётган бактериянинг спора ва кристалл ҳосил қилиши акс эттирилган бўлиб, талабалар микроскоп остида шу шаклни аниқ кўришлари талаб этилади.



бактерияларнинг спора-кристалл ҳосил қилиши

4) Асбоб-усуналар ва материаллар:

- ✓ 500-700 мл-ли кимёвий стаканлар (2 та);
- ✓ дистилланган сув учун колбалар;
- ✓ Петри ликобчалари (зарур миқдорда);
- ✓ картошка доналари (зарур миқдорда мураббий томонидан таъминланади);
- ✓ Бациллус тхурингиенсис бактериясининг тайёр культураси (зарур миқдорда мураббий томонидан таъминланади);
- ✓ Автоклав;
- ✓ Қуриш шкафи;
- ✓ Суюқ озуқа муҳитида ўстириш учун (1ёки 2 литрли колбалар);
- ✓ Термостат;
- ✓ Микробиологик качалка;
- ✓ Сентрифуга;
- ✓ Микроскоп ва зарур бўёқлар;
- ✓ pH-метр.
- ✓ Тарозилар.

5) Ишнинг бориши:

Микроорганизмлар учун озуқа муҳити тайёрлаш, уни стерилизациялаш ва унга продуцентларни екиш усуллари билан микробиология фанининг лаборатория машғулотларида етарли даражада танишганлиги сабабли талабалар ушбу лаборатория ишини қуйидаги тавсиялар асосида бажаришади:

Стерилизациялаш шароити. Озиқа муҳити 105-110⁰С ҳароратда 1 атмосфера босимда 20 мин. давомида стерилланади. Озиқа муҳитининг pH кўрсаткичи: стерилизацияга 7,0-7,2 ва стерилизациядан кейин 6,8-7,0 га тенг бўлиши лозим (зарур бўлганда pH

кўрсаткичи мўтадиллаштирилиши керак, културанинг мўтадил ўсиб ривожланиши учун озиқа муҳити пХ кўрсаткичини 7,4 да ушлаб туриш мақсадга мувофиқдир).

пХ кўрсаткичи (суяқ озуқа муҳити учун). пХ кўрсаткичи ферментация жараёнигача 6,8-7,0 бўлиши керак; ферментация жараёни охирида пХ кўрсаткичи кўтарилиб кетади (8,0). Табиийки озиқа муҳитининг ишқорий ҳолатга ўтиши кристалларни кичик бўлакларга бўлиниб кетишига олиб келади ва бу кейинги кристалл оксилларни ажратиб олишда қийинчилик туғдиради. *Ўб айёһааі ѳађйаіѳаѳёў æађа,іё ѳѳаааіааі ѳйіа, аёйіаѳаіё æађаѳа іёёаа ёѳёйѳѳаё ѳѳркёёёіёіа* пХ кўрсаткичини 6,2-6,4 даражасигача келтириб оламиз. Бунда мақсадга мувофиқ бўлган барча кристалл оксилларни центрифугалаш (5000 тез/мин. 20 мин) орқали ажратиб олишга еришилади. Бунинг учун ХСл нинг кучсиз еритмаларидан фойдаланиш мумкин.

2-иш. Бактериялардан спора ва кристалларни ажратиб олиш ва микроскопда текшириш

1) **Ишдан мақсад:** ўрганилаётган бактерияларнинг биомассасини ажратиб олиш, биомассадаги споралар ва кристалларни алоҳида ажратиш ва уларнинг миқдорини микроскопик таҳлил қилишни ўрганишдан иборат.

2) **Ишнинг ташкил етилиши:** мураббий гуруҳ талабаларини икки гуруҳга ажратади.

Биринчи гуруҳ талабалари: културал суяқликдан микроб биомассасини центрифугалаш усулида ажратиб олишда ва ундан белгиланган тартибда кристалл оксилларни ажратишда;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган биомассани йиғиб, ундан споралар ва кристалл оксилларни белгиланган тартибда ажратишда.

Ҳар иккала гуруҳ талабалар оксилларни қуйидаги чизма асосида бажаришлари ва микроскопи таҳлил қилишлари лозим. Микроскоп остида кўрган спора ва кристалл оксиллар расмлари дафтарларга чизиб олинади.

Дарс (иккинчи жуфтлик) охирида талабалар лаборатория дафтарларига қайд етилган маълумотлар асосида коллоквиум топширади ва машғулотга ажратилган рейтинг балини олади. Рейтинг балини тўплай олмаган талаба кейинги машғулотгача ушбу лаборатория ишини қайта топшириши мумкин.

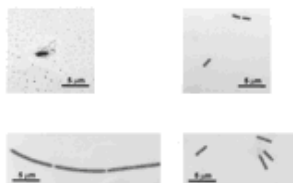
3) Тушинтириш:

Кристалл кўринишдаги оксилларнинг функционал ва аминокислоталари таркибини ўрганиш уларни тоза ҳолда ажратиб олиш муаммосини туғдиради. Ушбу бактерияларда, кристалларни спора, вегетатив ҳужайра ва уларнинг фрагментларидан ажратиш учун асосан қуйидаги усуллардан фойдаланилади: хлороформ–сув, тетрабром этан–сув, тўртхлорли углеводород-1% ли натрий сульфат, полиэтиленгликол 6000–декстрансульфат натрий 500, флотация, СсСл зичлиги градиентида қаватида центрифугалаш ва х.к. Аммо ушбу усуллар ёрдамида Бац.тхурингиенсис култураларидан тоза кристаллар ажратиб олиш катта қийинчилик туғдиради. Шу боисдан штаммлардан кристалларни ажратиб олишда биз Пендлтон усулидан маълум бир ўзгартириш киритган ҳолда қуйидаги тартибда иш олиб бориш тавсия етамиз. Пендлтон усулида икки фазали (1% ли натрий сульфат–н-кислол) тозалаш усулидан фойдаланилган бўлса, биз биринчи босқичдаги гомогенизаторда аралаштириш ва тиндиришдаги 1% ли натрий сульфат ўрнига културани ўстиришда фойдаланилган суяқ озиқа муҳитидан, охирги босқичда еса сувдан фойдаланамиз.

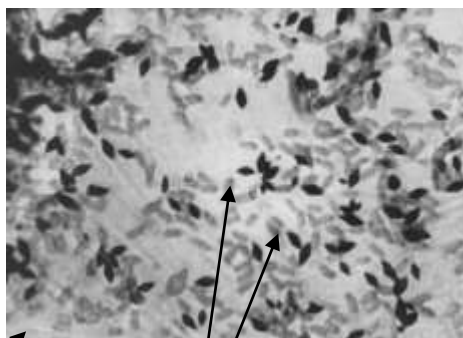
Пендлтон усулини бундай модификация қилиш бизга Бац.тхурингиенсис вар.тхурингиенсис бактерияси штаммларидан 99% дан кўпроқ тоза кристалл ажратиб олиш имконини беради.

Ушбу оксилларни тоза ҳолда ажратиб олиш қишлох хўжалиги, медицина ва фундаментал тадқиқотларда катта аҳамиятга ега.

Талабалар иш давомида ушбу культураларнинг қуйидаги расмлардагидек манзараларни кўришлари мумкин:



Продуцентларнинг вегетатив ҳужайралари



Спора ва кристалл оксиллар кўриниши

4) Асбоб-усуналар ва материаллар:

- ✓ 500-700 мл-ли кимёвий стаканлар (8 та);
- ✓ н-ксилол (200 мл);
- ✓ дистилланган сув ва бир литрли колбалар;
- ✓ Петри ликовчалари (зарур миқдорда);
- ✓ Суюқ озуқа муҳитидан биомассани чўктириш учун епиндорф ёки центрифуга стаканлари (зарур миқдорда);
- ✓ Центрифуга;
- ✓ Микроскоп ва зарур бўёқлар;
- ✓ рН-метр.

Талабанинг коллоквиум топшириши учун топшириқлар:

1. Талаба услубий кўрсатмада берилган маълумотлар ва расмларни дафтарига қад етган бўлиши;
2. Озуқа муҳити тайёрлашнинг уч хил вариантыни (ҳар хил ҳажмда) тузиб кўрсатиши;
3. Стерилизациялаш ва ўстириш шароитларини билиши;
4. Микроскоп остида продуцентнинг шаклини, унинг зарур метаболитик моддаси шаклини чизиб кўрсатиши;
5. Продуцентдан оксил моддаси ажратишнинг усулини айтиб бериши ва амалда бажара олиш даражасини кўрсата олиши;
6. ҳар бир гуруҳ ва кичик гуруҳчалардаги талабалар ажратган оксил ва продуцентнинг спораларини лаборантга топшириши лозим бўлади.

Юқорида берилган топшириқларни бажарган талабаларга белгиланган тартибда рейтинг баҳоси қўйилади.

9-10.Лаборатория машғулоти

Биогаз олиш учун органик чиқиндиларга ишлов бериш (8соат)

Машғулотнинг мақсади:Биоёқилғилар олиш технологияларини ўрганиш

Керакли асбоб-ускуналар: Микроскоп,аналитик тарози,мензурка,петри ликопчаси ,сентрифуга,спирт лампаси,натрий гидрооксид ,натрий сульфат ,сульфат кислота,термостат,микробиологик кесгич,озука муҳитлар,биотехнологик объект.

Ишнинг бажарилиши Экологик муаммоларни кескинлашуви, қайта тикланмайдиган энергоресурслар захирасини тобора камайиб бориши, уларни тан нархи ошиши, органик чиқиндиларни қайта ишлаш, уларни иссиқлик ва бошқа турдаги энергияга айлантириш муаммосини тезроқ ҳал қилишни биотехнологиянинг энг долзарб масалалари қаторига кўтариб қўйди.

Маълумки, ҳайвонлар ўсимликлар асосида яратилган озука энергиясини ёмон ҳазм қилади ва уларнинг ярмидан кўпроғи организмга сўрилмасдан ахлат, гўнг ҳолатида чиқиб кетади. Энг аввало ҳайвонлардан чиққан бу чиқиндидан органик ўғит сифатида фойдаланилади. Буни ўрнига ушбу чиқиндидан тикланадиган энергия манбаи сифатида фойдаланса бўлади.

Ривожланган мамлакатларда йирик шохли ҳайвонлар (нафақат улар) йирик фермаларда ва комплексларда тўпланиб, боқилади. Бу еса бошқа маҳсулотлар қатори уларни чиқиндиларидан (ахлатларидан) атроф-муҳитни ифлослантирмасдан фойдаланиш имкониятини яратади.

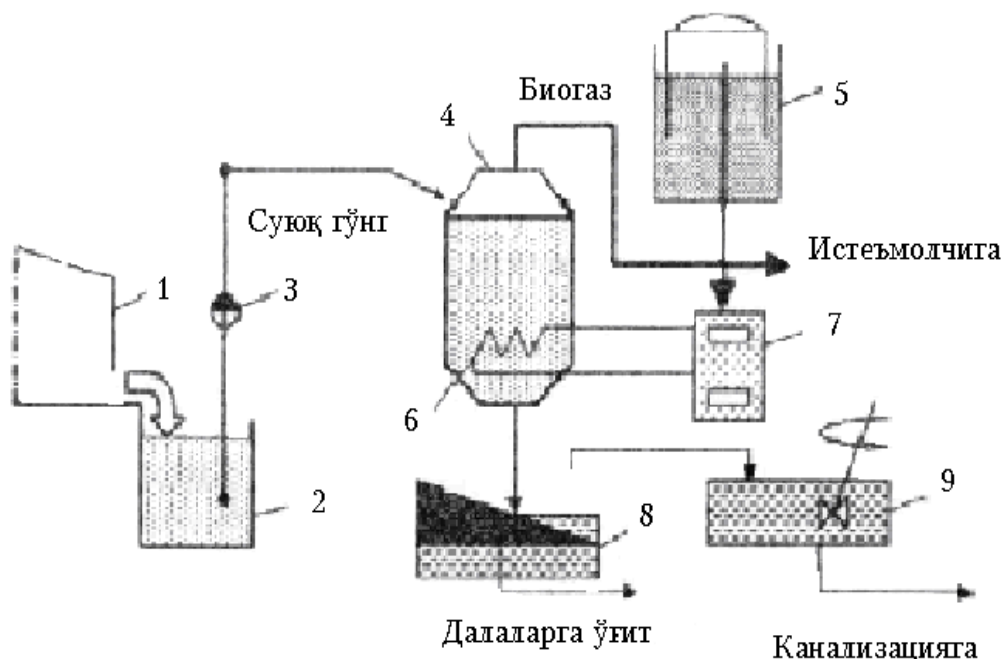
Ҳайвон ахлатларидан ва оқова сувларидан оқилонга фойдаланишни йўлларида бири уларни анаэроб шароитда бижғитишдир. Бу жараёнда ахлатни зарарсизлантирилиб, бир вақтни ўзида уни энг муҳим органик ўғитлик сифатини сақлаб қолган ҳолда, ундан биогаз олиш мумкин.Метанли бижғитиш ёки биометаногенез – биомассани энергияга айлантириш жараёни қадим-қадимлардан маълум бўлган жараёндир. У 1776 йилда Волта томонидан очилган бўлиб, дастлаб у ботқоқлардаги газда метан борлигини аниқлаган. Мана шу жараёнда ҳосил бўладиган биогаз 65% метан, 30% карбонат ангидрид, 1% олтингугурт кислотаси (H_2S) ва унчалик кўп бўлмаган микдорда азот, кислород, водород ва углерод икки оксиди сақлайди.

Ботқоқ газ, баъзида клар-газ ҳам деб юритилади,кўк- ҳаво ранг бериб алангаланаяди, хид чиқармайди.Уни тутун чиқармасдан алангаланиши инсонларга ўтин, ҳайвонлар тезаклари ва бошқа ёқилғиларга нисбатан камроқ ташвиш туғдиради. 28 м3 биогаз энергияси, 16,8 м3 табиий газ, 20,8 л нефт ёки 18,4 л дизел ёнилғисига тенгдир.

Органик чиқиндиларни анаэроб бижғитишга асосланган тозалаш иншоотларини биринчиси 1895 йилда Англияни Экзегер шаҳрида қуриб ишга туширилган еди. Бу иншоотни санитария вазифасидан ташқари кўчаларни ёритиш учун электр энергияси тайёрлаш сарф бўладиган биогаз ишлаб чиқариш бўлган.

Чиқиндиларга анаэроб ишлов бериш узоқ вақт сув тозалаш стансияларини чўкмаларини ва чорвачиликни чиқиндиларини мўтадиллаш мақсадида ишлатиб келинган. Аммо, 1970 йиллардаги энергия танлиги туфайли қишлоқ хўжалик ҳайвонлари чиқиндиларидан биогаз ишлаб чиқариш ғоясига астойдиллик билан қараладиган бўлди.

Гўнгни анаэроб бижғитиш орқали биогазга айлантириш жараёни мустаҳкам ёпиладиган махсус идишлар – биогаз ускурмаларида олиб борилади (1-расм.).



1-расм. Гўнг шарбатини биогаз ускурмасида қайта ишлашни технологик чизмаси
1-молхона; 2-гўнг тўпланадиган жой; 3-насос; 4-метантенк; 5-газголдер; 6-иссиқлик алмаштирувчи; 7-қозон; 8-гўнг сақланадиган жй; 9-аеротенк.

Бу технологик жараён қуйидагича олиб борилади. Хайвонлар сақланадиган молхоналардан (суратда 1) гўнг тўпланадиган идишга юборилади (2), кейин насос (3) ёрдамида уни метантенк (4) (гўнгни анаероб бижиши учун махсус қурилма) га юборилади. Бижиш жараёнида ҳосил бўлган биогаз, газголдер (5)га келиб тушади. ва ундан кейин истеъмолчига тарқатилади. Суюқ гўнгни иситиш учун ва иссиқликни бир хил ушлаб туриш учун метанотенк ичида иссиқлик алмаштириб турувчи ғовурлар ўрнатилган, улар орқали қозонхонадан (7) келган иссиқ сув айланади. Бижиб бўлган гўнг, гўнг сақланадиган (8) чуқурликка туширилади

Метантенкда жараён учун зарур бўлган барча шароит ташкил етилади. (ҳарорат, органик моддалар микдори, pH ва бошқалар.) Метантек термоикулясия қилинган бўлиб, бижиш жараёни меёрида кетиши учун керак бўлган ҳарорат доимий равишда ушлаб турилади. Унда шунингдек гўнгни ҳайдаб туриш учун мўлжалланган ускурма ўрнатилган. Метантенкка гўнг бир меёрда, бижиш жараёни бир хил кетадиган ҳолатда киритиб турилади.

Бижиш даврида гўнгда микроорганизмлар ривожланади ва бирин- кетин органик моддаларни кислоталаргача парчалаб беради. Ҳосил бўлган кислоталар метан ҳосил қилувчи ва синтроф микроорганизмлар таъсирида газсимон маҳсулотлар – метан ва карбонат ангидридига айланади. Гўнгни анаероб бижиш жараёнида органик моддаларни парчаланиш даражаси 25% дан 45% гача етади.

Органик моддаларни парчаланиши (феградасияси) кўп босқичли жараён сифатида амалга оширилиб, бунда углерод боғлари ҳар-хил микроорганизмлар таъсирида бирин-кетин узиладилар. Энг замонавий тушунчалар бўйича органик моддаларни биогазга айланиши тўрт босқичда амалга ошади:

биринчи, мураккаб биополимер молекулаларни (оксил, липид, полисахарид ва х.к.) кичикроқ мономерларга (аминокислота, карбон сувлар, ёғ кислоталари ва х.к.) айланиши;

иккинчи, ҳосил бўлган мономерларни янада оддийроқ моддаларга; тубан кислоталар ва спиртларга бижиш (ферментасия) асосида) айланиши, (Бунда водород ва карбонат ангидрид ҳам пайдо бўлади.);

учинчи, асетоген босқич- бу босқичда метандан олдинги моддалар (асетат, водород, карбонат ангидрид) пайдо бўлади;

тўртинчи, метаноген босқич- охириги маҳсулот, органик моддаларни метанга айланишига олиб келади.

Гўнг ёки бошқа органик моддалардан (чиқиндилардан) биогаз олишда қатнашадиган микроорганизмлар ҳамжамиятини таъсир етиш чизмаси(Заварзин бўйича).

Чизмада органик моддаларни анаэроб шароитда парчаланишида ҳар хил гуруҳга мансуб микроорганизмларни ўзаро трофик алоқалари акс етирилган бирламчи анаэроблар органик моддаларни метанни олд маҳсулотлари бўлган водород, корбонат ангидриди асетат, метанол ,метил амидлар, формиатгача парчалайдилар.

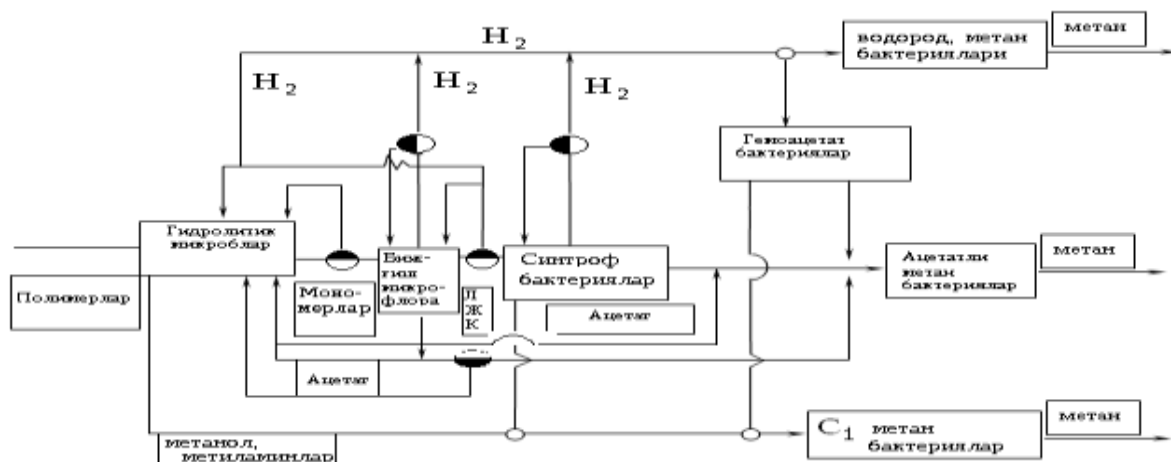
Метаногенларни субстрат спесифеклиги, уларни олдинги босқичда иштирок етган бактериялар билан трофик алоқасиз ривожланишига йўл қўймайди. Ўз навбатида метан ҳосил қиладиган бактериялар бирламчи анаэроблар синтез қилган моддаларни ишлатиш орқали шу бактериялар бажараётган реакциялар имкониятлари ва уларни тезлигини аниқлаб беради.

Метан ҳосил бўлишда бошқариш функциясини бажараётган марказий метаболит бўлиб, водород хизмат қилади. Тизимда водородни парсиал босимини паст ҳолатда ушлаб туриш ҳисобидан уни турлар орасидан бирламчи анаэроблар метобализми бевосита метанни олд маҳсулотлари ҳосил бўлишигача қараб ўзгартириш имкониятини яратади. Агар тизимдан водород чиқариб ташланмаса, қайтарилган маҳсулотлар учувчан ёғ кислоталари ва спиртлар ҳосил бўлади. Бу бирикмаларни метобализми ҳаёт фаолияти ҳосил бўлган водородни метан бактериялар билан боғлашга бағишланган синтроф бактериялар томонидан амалга оширилади. Метан ҳосил бўлиш учун зарур бўлган шароитлар қуйидаги жадвалда келтирилган.

1-жадвал

Метан ҳосил бўлиш шартлари

Кўрсаткичлар	Меъёрий кўрсаткичлар	Чегара кўрсаткичлари
pH	6,8- 7,4	6,4- 7,8
Учувчан кислоталар микдори (CH ₃ COOH бўйича)	50-500 мг/л	200 мг/л
Умумий ишқорийлик (CaCO ₃ бўйича)	500-1500мг/л	1000-3000
Чиқадиган газни таркиби	65-70% метан, 30-35% карбонат ангидриди ва бошқа газлар	
Тузлар		
NH ₄ (Н бўйича)		300 мг/л.
Na		3500-5500 мг/л.
K		2500-4500 мг/л.
Ca		2500-4500 мг/л.
Ҳарорат, 0C	33-37.	
Метан ишлаб чиқариш	0,3-0,4.м3/кг куруқ органик модда ҳисобидан.	



Метан ҳосил қилувчи бактериялар, кислота ҳосил қилувчи бактерияларга нисбатан ўзларини ўсиб ривожланишлари учун юқорироқ талаблар қўядилар яни уларни кўпайишлари учун мутлақо анаероб шароит ва кўпроқ вақт керак бўлади.

2-жадвал.

Биогазнинг физик хусусиятлари

Кўрсаткичлар	Копонентлар					60% метан ва 40% CO ₂ аралашмаси.
	Ш	С	Х ₂	Х		
Хажм қисми %	4	O ₂		2C		
	55-70	27-44	1	3		100
Ўниш иссиқлик ҳажми мдж/м ³	35,5	----	10,8	2,8		21,5
Ўниш ҳарорати 0C	65-750	----	58	---		650-750
Зичлиги, гр/л; меъёрий чегара	0,7	1,9	0,0	1		1,20
	2	8	9	,54		3,20
	10	40	31	3		
	2	8		49		

Биогазни физикавий хусусиятлари уни ишлатиш имкониятларини кўрсатади. Ўнишни ҳажмий иссиқлиги, ўниш ҳарорати, ўниш чегараси асосан Ш4 миқдори билан белгиланади чунки Х₂ ва Х₂С жуда ҳам кам бўлган миқдори бу кўрсаткичга таъсир етиш даражасида эмас.

Биогаз ёқилғи сифатида муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда уни иситиш усқурмаларида, сув иситадиган қозон хоналарида, газ плиталарида, совутгич усқурмаларида (абсорбсион типдаги), инфра қизил нурлатгичларда автомобил ва трактор ҳаракатлантиргачларида ва хоқакуларда ишлатиш мумкин. Карбюраторли ҳаракатга келтирувчилар осонгина газга ўтказилиши мумкин, бунинг учун карбюраторли аралаштиргичга алмаштириш кифоя.

Биогаздан електр энергияси олинганда фақатгина уни 30% электр энергияга айланади холос, 70% чиқинди иссиқликдир. Ундан сув иситиш, ҳайвонларни сақлаш (молхоналарни иситиш), иссиқхоналар ёки уларни иситиш, қуритгич хоналари ёки усқурмаларида ҳавони иситиш, микроклиматни бошқариш ва бошқа мақсадларда фойдаланиш мумкин.

3-жадвал.

Ҳар хил ёнилғиларни ўниш иссиқлигини нисбати

Ёнилғи тури (ёниш иссиқлиги)	Биогаз (м ³ да) Ш4 сақловчи (%)			Табий газ 1м ³ да	Пропан 1 кг да	қозон хона ёқилғиси 1 кг да	Дизел ёқилғиси 1 л да	Электр токи (кВТ.ч)
	56	62	70					
Биогаз 56% Ш4 (20.0 МДж/м ³)	1,0	0,91	0,80	0,60	0,44	0,47	0,56	5,6
Табий газ (33,5 МДж/м ³)	1,68	1,52	1,34	1,00	0,73	0,79	0,93	9,3
қозон хона ёқилғиси (42,3 МДж/кг)	2,12	1,91	1,69	1,26	0,78	1,00	1,17	11,7

Қишлоқ хўжалик хайвонларидан ва парандаларидан чиқадиган гўнг ҳамда улардан олиниши мумкин бўлган биогаз миқдори қуйидаги жадвалда келтирилган.

4-жадвал.

Гўнгдан биогаз чиқиш кўрсаткичлари

Кўрсаткич	Сигирлар	Чўчқалар	Парандалар
Бир бошга бир суткада чиқадиган гўнг миқдори, кг	55,0	0,2	3,5
Бир бошдан бир суткада чиқадиган биогаз миқдори, м ³	1,62	0,02	0,32
Бир тонна қуруқ гўнгдан чиқадиган биогаз хажми, м ³	300	600	500

Бундан ташқари, гўнгни бижғитиш уни дезодарасия қилади (зарарсизлантиради), гелментларини, ҳамда ёввойи ўсимликлар уруғларини йўқотади, ўғицимон моддаларни енгил сўриладиган шаклга (минерал шаклга) ўтказилади. Ўсимликлар учун озикавий моддалар миқдори азот, фосфор, калий бутунлай йўқолмайди. Биогаз ускурмасидан чиққан гўнгди кимёвий таркиби қуйидаги жадвалда баён етилган.

5-жадвал.

Гўнг кимёвий таркибининг бижғиш жараёни вақтига қараб ўзгариши (%)

Бижғиш даври, кун	Азот		P ₂ O ₅	K ₂ O	С:Нумумий
	Умумий Н	Аммонийлик Н- NH ₄			
0 (назорат)	0,32	0,13	0,11	0,24	12,2
5	0,31	0,13	0,11	0,24	11,9
10	0,31	0,16	0,11	0,24	10,5
15	0,31	0,16	0,11	0,24	9,6

Гўнгни анаэроб бижғитишда уни таркибидаги калий ва фосфор бутунлай ўзгармайди. Азот моддалари гўнга ишлов беришни бошқа усуллари ишлатилганда 30% йўқотилса, анаэроб бижғишда 5% йўқолади. шуни ҳам еслаб қолиш лозимки, янги гўнгни азот органик шаклда бўлса, анаэроб бижғиш оқибатида у ўсимлик учун қулай бўлган аммоний шаклига ўтади.

Гўнгни анаэроб бижғитиш атроф мухитни муҳофазаси учун қанчалик фойдали эканлигини иқтисодий ҳисоб китоб қилиш анча мушкул вазифа. Бу йўл билан ишлов берилган гўнг, биологик мўтадил ҳолатда бўлиб, хашоротларни ўзига тортмайди.

Анаэроб бижғишдан кейин гўнгдаги қўланса хид берадиган моддалар йўқолади

6-жадвал.

Бижғитилган гўнг таркибида кучли хид берадиган моддалар
миқдори

Бирикмалар	Табиий гўнг, %	Бижғитилган гўнг, %
Фенол	100	4
Крезол «П»	100	10
Скато́л	100	79
Мой кислота	100	3

Анаероб ишлов беришда поле вируслар миқдори 98,5% га камаяди, индекс Э.коли 108 дан 105-104 гача, паразитларни уруғи 90-100% йўқолади

Табиий ресурслардан фойдаланганда қўйилмдиган экологик талаблар хўжалик ҳисоб китоби шароитида, «улардан фойдаланилганда ўрнига қўйиш» деган иборалар қонуний жужжатлар асосида ишга тушганда алоҳида аҳамият касб этади.

Энергиянинг баҳоси кўтарилиб кетаётган мана шу даврда айниқса анаероб биологик жараёндан фойдаланиш катта иқтисодий фойда келтиради. Гўнгни анаероб шароитида тозалаш нафақат еанергия манбаи сифатида, балки қўшимча энергия манбаи сифатида қаралмоғи лозим.

5.Иловалар

1.1. ФАН ДАСТУРИ

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

Руйхатга олинди

№ БР 5140100-3.14

- 4 - 01 2018 йил



Биотехнология фанининг

ЎҚУВ ДАСТУРИ

Билим соҳаси:	100000	–	Гуманитар соҳа
Таълим соҳаси:	140000	–	Табиий фанлар
Таълим йўналиши:	5140100	–	Биология (Умумий биология)

Тошкент – 2018

Фаннинг ўқув дастури Олий ва ўрта махсус, касб-хунар таълими ўқув-методик бирлашмалари фаолиятини мувофиқлаштирувчи кенгашининг 2018 йил "4" 01 даги "1"-сон мажлис баёни билан маъқулланган.

Фаннинг ўқув дастури Мирзо Улугбек номидаги Ўзбекистон Миллий университетида ишлаб чиқилди.

Тузувчилар:

- | | |
|---------------------|--|
| Ташмухамедова Ш.С. | - ЎзМУ Биология-тупрокшунослик факультети, Микробиология ва биотехнология кафедраси профессори, биология фанлари доктори |
| Мирзарахметова Д.Т. | - ЎзМУ Биология-тупрокшунослик факультети, Микробиология ва биотехнология кафедраси доценти, техника фанлари номзоди |

Такризчилар:

- | | |
|---------------|---|
| Каршиев Т. | - Тошкент кимё-технология институти, Биотехнология кафедраси доценти, биология фанлари номзоди |
| Давранов Қ.С. | - ЎзМУ Биология-тупрокшунослик факультети, Ботаника, экология ва ўсимликлар физиологияси кафедраси профессори, биология фанлари доктори |

Фаннинг ўқув дастури Мирзо Улугбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университетининг Илмий-методик кенгашида тавсия қилинган (2018 йил "26" 12 даги "6"-сонли баённома).

Кириш

Биотехнология фанини ҳозирги вақтда жадал суръатлар билан ривожланиши бевосита биология фанининг таракқиёти билан узвий боғлиқдир. Биотехнология фанлар ичида ҳозирги кунда етакчи ўринни эгалламокда. Сабаби, биологиянинг молекулар даражага кўтарилиши, ҳозирги кунда бир қатор масалаларни биотехнология фанисиз ечиш имконини бермайди. Шу сабабдан ҳам биотехнология турли йуналишлари инсон ҳаёти учун керакли бўлган озиқ-овқат маҳсулотларини, шунингдек энергия муаммоси, турли экологик муаммоларни, биологик фаол ва доривор моддалар ишлаб чиқариш муаммоларини ҳал қилиши мумкин. Биотехнология аввало, экологик жихатдан катта истикболга эга, унинг ёрдамида энергия кам даражада сарфланади, чиқиндисиз технологиялар яратиш амалга оширилади, шу маънода ҳам биотехнология турли препаратлар: жумладан инсулин, интерферон, турли гормонлар, биологик фаол моддалар олишда, биотехнологик жараёнларни қўллаш ҳар жихатдан муҳим аҳамиятга эгадир.

Фанининг мақсади ва вазифалари

Биотехнологияни ўқитишдан мақсад талабаларга ҳозирги замон биологияси ва чегарадош фанлар ютуқларига асосланган, янги технологик жараёнлар яратиш ва технология назарияси асосларидан билим беришдан иборатдир. Ҳозирги кунда Биотехнология йуналишини жадал суръатда ривожланиши натижасида, замон талабига жавоб бера оладиган мутахассисларни тайёрлаш талаб этилмокда. Шу сабабли бакалавр йуналишидаги талабаларга биотехнология асослари фанидан умумий билим бериш мақсадга мувофиқдир.

Фан бўйича билим, кўникма ва малакаларига қўйиладиган талаблар

Биотехнология фанини ўзлаштириш жараёнида бакалавр микроорганизмларни тиббиётда ва халқ хўжалигидаги роли, фойдали микроорганизмларни биотехнологик усулда ажратиш ва улардан биологик фаол моддалар олиш, биотехнология ёрдамида ҳозирги замон биологияси муаммоларини ечиш йўллари, ген ва хужайра инженерияси имкониятлари ва уларни амалиётда қўллаш, ферментлар ва уларни қўллаш имкониятлари ҳақида тасаввурга эга бўлиши;

биотехнология билан экология, тиббиёт ҳамда озиқ-овқат маҳсулотлари ва қишлоқ-хўжалик саноатлари ўртасидаги алоқани, биологик маҳсулотлар олиш мақсадда, конкрет биотехнологик жараённи ишлаб чиқишни, ген ва хужайра муҳандислиги истикболларини, биотехнологик усулларни қўллашда керакли микроорганизмлар ва ферментлар, муҳит ва шарт-шароитларни топа билишни, турли иммобиллашган микроорганизмлар ва фермент препаратларини олишни, замонавий тажриба қурилмалари ва ўлчов асбобларидан ҳамда замонавий ахборот технологияларидан фойдаланишни, фан бўйича тавсия этилаётган зарурий адабиётларни таялашни, виртуал электрон билим манбаларидан фойдаланишни, таълим техник воситаларидан

фойдаланиши; танланган мавзунинг долзарблигини ва аҳамиятини асослашни *билиши ва улардан фойдалана олиши*;

ферментларни каталитик фаоллигини аниқлай билиш; биотехнологиялар ёрдамида янги маҳсулотлар олиш ва мавжуд бўлган технологияларни такомиллаштириш мақсадида гипотеза таклиф этиш, ишнинг мақсади ва муайян вазифаларини шакллантириш, методикаларни танлаш, муаммо ечимининг илмий аргументациясини таклиф қилиш ва ривожлантириш, экспериментал қурилма ва тадқиқот жараёнини баён қилиши, альтернатив ечимларни танқидий англаш, хулосалар ва олинган натижаларни баҳолаш шакллантириш ва аниқ таклифлар бериш *қўникмаларига эга бўлиши керак*.

Фаннинг ўқув режадаги бошқа фанлар билан ўзаро боғлиқлиги ва услубий жиҳатдан узвийлиги

Биотехнологияни ўзлаштиришда талабалар биологиядан: микробиология ва вирусология, генетика, молекуляр биология, биохимия, биофизика, физиология, ботаника ва зоология қонунлари ҳақида тушунчага эга бўлишлари керак. Микробиологиядан: саноат микробиологияси жараёнлари, микроорганизмларни ўстириш ва кўпайтириш услублари, микроблар ёрдамида антибиотиклар, органик кислоталар, ноёб ва керакли моддалар биосинтези, микробларни саклаш ва уларнинг фаол хусусиятларини йўқотмаслик; биохимиядан-ферментатив реакциялар механизмлари, уларнинг фаол марказининг тузилиши, ишлаш жараёнлари, модификация усули ёрдамида барқарорлигини ошириш; биофизикадан-мембраналар тузилиши, транспорт жараёнлари механизмлари, биоэнергетиканинг асосий қонунлари; фотосинтез ва нафас жараёнларига оид реакциялар; ҳужайра биологиясидан ҳужайра тузилиши, ҳужайрада асосий процессларнинг кечиши, ҳужайраларнинг кўпайиши; молекуляр биологиядан-ДНК ва РНК тузилиши, транскрипция, трансляция қонунлари, рибосомалар тузилиши, генетик код структура элементлари ва х.к. Кимёвий технологиядан: асосий технологик жараёнлар, реакторларнинг тузилиши ва ишлаш принциплари, биореакторларни амалиётда қўллаш усуллари ҳақида етарли билимга эга бўлишлари шарт.

Фаннинг илм-фан ва ишлаб чиқаришдаги ўрни

Биотехнология нафақат фан сифатида, балки ўрнини, ишлаб чиқаришда ҳам алоҳида ўрин эгаллаб келмоқда. Ишлаб чиқариш биотехнологияси анъанавий ва замонавий биотехнологияга бўлинади. Анъанавий биотехнология нон маҳсулотлари, шароб, пишлоқ ва бошқа ишлаб чиқариш технологияларини ўз ичига олади. Замонавий биотехнология эса, микроорганизмлар ёрдамида турли оксил табиатли ва бошқа моддалар олиш технологиясига, ферментлар ёрдамида биологик фаол моддалар синтез қилишга, биокатализ асосида бижгиш жараёнини назорат қилишга, ген муҳандислиги ёрдамида олинган организмларни ишлаб чиқаришда қўллашга йўналтирилган.

Фанни ўқитишда фойдаланиладиган замонавий ахборот ва педагогик технологиялар

Талабаларнинг биотехнология фанини ўзлаштиришлари учун ўқитишнинг илғор ва замонавий усулларида фойдаланиш, янги информацион-педагогик технологияларни тadbик қилиш муҳим аҳамиятга эгадир. Фанни ўзлаштиришда дарслик, ўқув ва услубий қўлланмалар, маъруза матилари, таркатма материаллар, электрон материаллар ҳамда виртуал стендлардан фойдаланилади. Шунингдек, атрофлича билим олишни таъминлаш мақсадида талабаларга мустақил иш мавзулари ҳам берилади. Фанни замонавий педагогик услублар – “Кластер”, “Бумеранг”, “Дебатлар”, “Арра”, “Меню”, “Ижодий ўйинлар” тарзида ўтиш ҳам кўзда тутилгандир. Биотехнологиянинг долзарб муаммоларига бағишланган йўналишлари бўйича талабаларнинг хоҳишига қараб курс ишлари берилади. Биотехнология асосларини ўқитишда ўқув дастурлари, компьютер, ўқитишнинг техник воситалари, видеофильмлардан фойдаланилади.

АСОСИЙ ҚИСМИ Маърузалар

Кириш. Биотехнология фанининг предмети, мақсади ва вазифалари; фанининг тadbикот усуллари, асосий объектлари биотехнология фанининг бошқа фанлар билан ўзаро боғлиқлиги, фанининг бошқа турли соҳалардаги муаммоларни ечишда тутган ўрни, шунингдек, биотехнология йўналиши бўйича мутахассис тайёрлашдаги ўрни ва унинг асосий йўналишлари ҳақидаги масалалар.

Ферментлар муҳандислиги

Ферментларни олиш технологияси. Ўсимлик ва ҳайвон органларидан ферментлар ажратиб олиш усуллари. Биоспецифик хроматография ва бу усулни ўта тоза ферментлар олишда қўллаш. Биоспецифик сорбентларнинг олиниш усуллари. Биоспецифик сорбент турлари. Уларга кимёвий ишлов бериш ва десорбциясига таъсир этувчи омиллар. Биоспецифик сорбентлар асосида яратилган технологик жараёнлар.

Ферментларни иммобиллаш

Иммобилланган ферментлар. Иммобилашнинг физик ва кимёвий усуллари. Қўлланиладиган ташувчилар турлари. Юқори молекулали табиий органик ташувчилар. Анограник моддалар асосида олинган ташувчилар. Синтетик усулда олинган полимерларни ташувчилар сифатида ишлатиш. Уларга функционал фаол гуруҳлар киритиш усуллари. Бифункционал гуруҳлар қўллаш. Иммобилаш жараёнига таъсир этадиган омиллар. Иммобилланган ферментларни хоссаларини ўзгариши. Иммобилаш усулларни фермент барқарорлигига таъсир этиши ва ферментлар барқарорлигини ошириш.

Трансген хужайраларни саралаб олиш. Одам геноми. Ген хариталари. Ҳайвон организмига янги генлар киритиш. Ирсий касалликларни даволаш.

Хужайра мухандислиги

Хужайраларни ўстириш ва сақлаш. Хужайра культуралари. Ўсимлик бошланғич тўкима хужайралари. Ўсимликни ўстириш усулларидаги фарқлар. Юксак ўсимликларни соматик хужайраларини гибридлаш. Ўсимлик хужайраси мухандислиги ютуқлари. Биотехнологияда одам ва ҳайвон хужайра культураларини қўллаш. Ҳайвон хужайраси инженерлигида микдорий усуллар. Вакциналар, ферментлар, гормонлар. Гибридом технологиялар. Моноклонал антитаналар олиниши.

Табийий органик бирикмалар биотрансформацияси

Атроф-муҳитни ифлосланиши ва токсик бирикмаларни биодеградацияси. Биотанол ишлаб чиқариш. Крахмал тутувчи чиқиндиларини қайта ишлаш. Целлюлоза тутувчи чиқиндиларини қайта ишлаш. Силослаш ва компостлаш жараёнлари. Биопроцессларни назорат қилиш йўллари. Узлукли ва узлуксиз жараёнлар. Микроорганизмларни ва ферментларни имобилланган ҳолатда биотехнологик қайта ишлашда қўллаш. Аэроб ва анаэроб жараёнлар. Ферментация. Реакторлар. Чиқиндилар (саноат, коммунал ва қишлоқ ҳўжалиги чиқиндилари). Биоёқилгилар ишлаб чиқариш. Турли биотехнологик усуллар ёрдамида қимматбаҳо маҳсулотларни олиш. Минералларни қайта ишлаш биотехнологияси. Технологик жараёнларини такомиллаштириш ва уларнинг техник-иқтисодий кўрсаткичларини кўтариш.

Амалий машғулотларни ташкил этиш бўйича тавсия ва кўрсатмалар

Талабалар томонидан амалий машғулотларни бажарилиши мустақил ижодий ишлашни шаклланишига, илмий тадқиқот элементларини англашга, илмий адабиётларни ўқиш ва таҳлил қилишга ёрдам беради. Талаба амалий машғулотларни бажариш жараёнида ундан ҳам мураккаброқ бўлган вазифани — малакавий битирув ишларини бажариш учун, назарияларни англаш, уларни умумлаштириш ва амалиётда қўллаб мустақил илмий-тадқиқот фаолиятни бошлашга тайёргарлик кўради. Амалий машғулотларни қилиш талабада ахборотларни анализ қилиш қобилиятини ривожланишига ва оқибат натижада назарий билимларни мустаҳкамлашга олиб келади. Амалий машғулотлар бажарилиши талабадан фаннинг турли соҳалари бўйича амалиётда олган билимларини мустаҳкамлашни, янада чуқурлаштиришни ва умумлаштиришни талаб қилади. Ҳар бир танланган мавзу илмийликни, замонавийликни талаб қилади, чунки ҳар бир топшириқда янгилик элементлари бўлиши лозим. Амалий машғулотларнинг энг муҳим омилларидан бири, унинг индивидуаллиги, талабанинг қизиқиши ва қобилиятига қараб белгиланади.

Ферментлар иштирокидаги технологик жараёнлар

Амалий энзимология ютуқларини амалиётда қўллаш. Глюкоза-фруктозали шинни олиш. Аминокислоталар рацемизацияси. D, L-аминокислоталарнинг бир биридан ажратиш. Лактозасиз сут олиш. Сут зардобидан шакарсимон моддалар олиш. Крахмал ва целлюлозани ферментлар ёрдамида парчалаш технологияси. Целлюлолитик микроорганизмларнинг целлюлозага таъсир этиш механизмлари. Целлюлоза гидролизига таъсир этувчи омиллар.

Ген мухандислиги

Организм (in vivo) ген инженерлиги. Генлар тузилиши ва экспрессиянинг бошқарилиши. Кодланадиган ва кодланмайдиган нуклеотидларнинг жойланиши. Интронлар. Транспозонлар. Бактериялар ва эукариотлардаги транспозиция механизмлари. Ген инженерлигида қўлланадиган ферментлар. Рестриктазалар. Рестрикция ва модификация тизимлари. ДНК-полимеразалар ва уларнинг турлари. РНК асосида комплементар ДНК полимерларини синтез қилиш механизми. Праймерлар. ДНК-лигазалар. ДНКлар рекомбинация жараёни. Векторлар ва уларни хужайрага жойлаштириш. Векторларнинг умумий хусусиятлари. Векторларнинг хужайрага интеграцияси. Селектив маркер генлар. Плазмидалар ва вируслар вектор сифатида. Плазмидаларнинг автоном репликацияга учраши. Репликонлар. Плазмидаларнинг бактериал хужайрага интеграцияси. Бегона генлар экспрессияси. Бактерия хужайраларида клонланувчи генлар экспрессияси. Микроорганизмлар иштирокида бирламчи ва иккиламчи метаболитлар ишлаб чиқариш. Суперпродуцент штаммлар яратиш. Интерфероннинг ген инженерия усулида олиниши. Соматотропин. Инсулин. Эритропоэтин. Ферментлар.

Ўсимлик ген мухандислиги

Ўсимлик ген мухандислиги. Протопластлар. Каллус тўқима. Ўсимлик гибридларини олиш. Бегона генларни ўсимликларга киритиш йўллари. Бир-уруғ ва икки-уруғ паллалик трансген ўсимликлар олиш. Трансген хужайраларни саралаб олиш. Агробактер тумифациенс бактерияси ва унинг хусусиятлари. Тi-плазида. Опинлар. Тi-плазмидалар тузилиши. Тi- ва Ri-плазмидалар ёрдамида протопластларга бегона ДНК-лар киритиш. Ўсимлик ген мухандислигида қўлланиладиган маркер генлар. Трансген хужайраларнинг саралаб олиш. Трансген ўсимликларни истиқболлари.

Ҳайвон ген мухандислиги

Ҳайвон ген мухандислиги. Ҳайвон хужайраларининг ўзига хос маркерлари. Ҳайвон хужайралари трансформацияси ва трансфекцияси. Ҳайвонларга бактериал генларни киритиш. Вирусларни вектор сифатида қўлланилиши. Липосомалар асосида ёд генларни хужайрага киритиш. Эмбрионал ўзак хужайраларни трансген ҳайвонлар яратишда қўллаш.

*Амалий машғулотларга тавсия этиладиган тахминий
мавзулари рўйхати:*

1. Ферментлар фаол марказларини тузилиши.
2. Ферментлар барқарорлигини таъминловчи факторлар.
3. Имобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қўллаш.
4. Иммунобиотехнология. Иммуноэнзим таҳлили.
5. Векторлар ва уларни қўллаш.
6. Ген муҳандислигида ишлатиладиган ферментлар.
7. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оксил ва гормонларни (интерферон, инсулин ва бошқа) олиниши.
8. Ўсимликлар ген муҳандислиги. Тi-плазмидаларни ва фитовирусларни ўсимлик ген муҳандислигида ишлатилиши.
9. Ҳайвон ва одам ген муҳандислиги.
10. Геном муҳандислиги (ҳужайра муҳандислиги).
11. Биозлектроника принциплари. Биосенсорлар яратиш ва қўллаш.
12. Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсорлар.
13. Чикиндисиз технология яратиш.

*Изоҳ: Ишчи ўқув дастурни шакллантиришда амалий машғулотлар мавзулари ўқув
режадаги соатларга мос ҳолда ва ОТМ имконияти даражасида танлаб бажарилади.*

**Лаборатория машғулотларни ташкил этиш бўйича
тавсия ва кўрсатмалар**

Лаборатория ишлари ҳар бир талаба томонидан айрим-айрим бажарилади. Бунда аввало талаба бажариладиган лаборатория ишининг назарий ва амалий томонини қисқача изоҳлаб беради. Сўнгра лаборатория ишининг бажарилиши давомида олинган натижаларни хулосалаб ўз дафтарига ёзиб қўяди. Ушбу хулосалар ўқитувчи томонидан оғзаки мулоқот шаклида текширилади.

*Лаборатория машғулотларга тавсия этиладиган тахминий
мавзулари рўйхати:*

1. Чикиндисиз технология яратиш.
2. Фермент фаоллигини аниқлаш.
3. Ферментни меъёрий кўрсаткичларини аниқлаш.
4. Ферментни ковалент имобиллаш.
5. Ферментни бифункционал агент орқали имобиллаш.
6. Ферментни физик-кимёвий хусусиятини ўрганиш.
7. Чикиндилар асосида ташувчи (сорбент) синтезлаш.
8. Бактерия полисахаридларини ажратиш олиш.
9. Биогаз олиш учун органик чиқиндиларга ишлов бериш.
10. Биогаз олиш учун микроорганизмлар ассоциациясини яратиш.

*Изоҳ: Ишчи ўқув дастурини шакллантиришда лаборатория машғулотлар
мавзулари ўқув режадаги соатларга мос ҳолда ва ОТМ имконияти даражасида
танлаб бажарилади.*

Мустақил таълимни ташкил этишининг шакли ва мазмуни

Мустақил ишлаш учун талабаларга биотехнологияга онд маълумотлар мавжуд бўлган турли адабиётлар тавсия этилади. Бундан ташқари зарур ҳолларда лабораториялардаги мавжуд асбоб ва ускуналар ҳам уларни яхши билувчи мутахассис ёки ўқитувчи иштирокида талабалар ихтиёрига берилади. Мустақил ишлаш учун бериладиган мавзулар ва ишлар индивидуал характерда бўлиб, талабаларнинг биотехнологик жараёнларни янада чуқурроқ ўрганишга қаратилгандир. Тавсиялар индивидуал талабга асосланади ва жорий, оралик назорат шаклида ёки реферат ҳамда мулоқот тарзида топширилади.

Мустақил таълим учун қуйидаги мавзудаги топшириқларни бажариш тавсия этилади:

1. Хужайра мухандислигидаги технологик жараёнлар.
2. Гибридомалар технологияси.
3. Моноклонал антителолар олиш.
4. Ген мухандислиги ёрдамида ноёб оксилларни синтезлаш.
5. Ферментлар ёрдамида органик моддалар синтези ва стерсонизомерлар олиниши.
6. Имобилланган ферментлар иштирокида биоёқилги олиш.
7. Азот-боғловчи ўсимликларни ген мухандислиги ёрдамида яратиш.
8. Вирусларни ген мухандислигида қўлланилиши.
9. Атроф-муҳитни сақлашда биотехнологиянинг роли.
10. Ноанъанавий усулда ёқилги олиш технологияси.
11. Ферментлар ёрдамида аминокислоталар синтези.
12. Иммуноэнзим таҳлилининг гетероген усули.
13. Трансген ҳайвонлар олиниши.
14. Микроорганизмлар ёрдамида трансген оксиллар олиш технологиялари.
15. Биотехнология усуллари кимёвий реакцияларда қўллаш.
16. Биотанол олиш технологияси.
17. Водород олиш технологияси.
18. Биосенсорлар.
19. Биоэлектроника.
20. Иммуноэнзим таҳлилининг гомоген усули.

Изоҳ: Ишчи ўқув дастури шакллантирилишида мустақил таълим мавзулари ўқув режадаги соатларга мос ҳолда танлаб бажарилади.

Дастурининг информатсион-услубий таъминоти

Дарсни ўтишда мавзуларнинг мураккаб ва оддийлигига қараб таълимнинг замонавий (хусусан интерфаол) усуллари, педагогик ва ахборот – коммуникация (медиа таълим, амалий дастур пакетлари, презентацион, электрон-дидактик) технологиялар қўлланилади. Таъминот вазифасини замонавий дарсликлар, ўқув қўлланмалари ва бошқа ўқув-услубий адабиётлар, диссертациялар, монографиялар, илмий мақолалар, амалий

кўрсатмалар, электрон адабиётлар, интернет ва бошқа маълумотлар бажаради.

Тавсия этилган адабиётлар

Асосий адабиётлар:

1. Комилов Х.М., Рахимов М.М., Одилбекова Д.Ю. Биотехнология асослари. Тошкент: Extremum. 2010.
2. Мирхамидова Р., Вахабов А.Х., Давранов К., Турсунбоева Г.С. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент: Ilm Ziyο. 2014.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. М.:Мир. 2002.

Кўшимча адабиётлар:

4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.:Мир. 1987.
5. Овчинников Ю.А. Био-органическая химия. М.: Просвещение. 1987.
6. Альбертс. Молекулярная биология клетки. М.:Мир. 1994.
7. Введение в прикладную энзимологию. Под ред. Березина И.В. Мартинеска К.М. М.:МГУ. 1997.
8. Рекомбинатные молекулы: значение для науки и практики (Под ред. Бирса и Бериса Э.). М.: Мир. 1980.
9. Безбородов А.М. Биохимические основы микробиологического синтеза. М.: Наука. 1980.
10. Биотехнология (Под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: Высшая школа. 1978.
11. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: УзМУ. 2007.
12. Мирзарахметова Д.Т. Основы биологической специфичности. Услубий қўлланма. Тошкент: УзМУ. 2006. 112 с.
13. Мирзарахметова Д.Т., Щербак Е.Ю., Садыкова К.А. Методические рекомендации по проведению большого практикума курса «Биотехнология». Тошкент: УзМУ. 2007. 566.
14. Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge:Cambridge University Press, 2009.
15. Kimball Nill. Glossary of Biotechnology terms. New York: CRC Press LLC., 2002.
16. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten G.L. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Washington: ASM Press. 2010.
17. Nair A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New delhi: Infinity Science Press LLC, 2007.

Интернет ва Ziyonet сайтлари

<http://www.natlib.uz/uz/>
<http://www.lib.mn/>
<http://www.molbiol.ru>
[http:// www.zyio.net](http://www.zyio.net)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ИШЧИ ЎҚУВ ДАСТУРИ

**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIY VA O'RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI**

TERMIZ DAVLAT UNIVERSITETI

Ruyxatga olindi

**№_BD5140100-3,14
2018 yil “07” 01**

“Tasdiqlayman”

o'quv ishlari prorektori R.To'rayev

2021_yil « ____ » _____

**Biotexnologiya
fanidan
(Sirtqi ta'lim shakli 4-kurs xorijiy biologiya talabalari)**

Ishchi o'quv dasturi

Bilim sohasi: 100000 – gumanitar soha
Ta'lim sohasi: 140000 – tabiiy fanlar
Ta'lim yo'nalishi: 5140100– biologiya

Soatlar taqsimoti

Umumiy o'quv soati	-220 soat
shu jumladan:	
Ma'ruza	-20 soat
Tajriba mashg'uloti	-26 soat
Mustaqil ish soati	-174 soat

Termiz-2021

Ushbu ishchi dastur O'zbekiston Respublikasi Oliy va o'rta maxsus, kasb hunar ta'limi o'quv metodik birlashmalari faoliyatini muvofiqlashtiruvchi kengashning 2018-yil 7-yanvardagi 1-son majlis bayoni bilan ma'qullangan fan dasturi asosida ishlab chiqilgan.

Tuzuvchi:

Sattorov A.S.

TerDU Botanika kafedrası
dotsenti ,biologiya fanlari nomzodi**Taqrizchilar:**

Begmatov A.M.

TerDU Botanika kafedrası mudiri

Qodirova D.N.

TerDU Botanika kafedrası dotsenti,
biologiya fanlari nomzodi

Fanning ishchi o'quv dasturi Botanika kafedrasining 2021 yil "___" _____ dagi "___"-sonli yig'ilishida muhokamadan o'tgan va fakultet Kengashida muhokama qilish uchun tavsiya etilgan.

Kafedra mudiri: _____ **A.Begmatov**

Fanning ishchi o'quv dasturi Tabiiy fanlar fakulteti Kengashining 2021 yil "___" – avgustdagi 1-sonli yig'lishida muhokama qilingan va universitet o'quv uslubiy Kengashiga tavsiya qilingan

Fakultet dekani : _____ **b.f.d. A.Xurramov**

Fanning ishchi o'quv dasturi Universitet o'quv uslubiy Kengashining 2021 yil "___"-avgustdagi 1-son yig'lishida tasdiqlangan va foydalanishga tavsiya etilgan.

O'quv uslubiy boshqarama boshlig'i _____ **K.Yangarov**

I. Fanning mazmuni

Biotexnologiya fanini hozirgi vaqtda jadal sur'atlar bilan rivojlanishi bevosita biologiya fanining taraqqiyoti bilan uzviy bog'liqdir. Biotexnologiya fanlar ichida hozirgi kunda yetakchi o'rinni egallamokda. Sababi biologiyaning molekular darajaga ko'tarilishi, hozirgi kunda bir qator masalalarni biotexnologiya fanisiz yechish imkonini bermaydi. Shu sababdan ham biotexnologiya turli yunalishlari inson hayoti uchun kerakli bo'lgan oziq-ovkat mahsulotlarini, shuningdek energiya muammosi, turli ekologik muammolarini, biologik faol va dorivor moddalar ishlab chiqarish muammolarini hal qilishi mumkin. Biotexnologiya avvalo, ekologik jihatdan katta istiqbolga ega, uning yordamida energiya kam darajada sarflanadi, chiqindisiz texnologiyalar yaratish amalga oshiriladi, shu manoda ham biotexnologiya turli preparatlar: jumladan insulin, interferon, turli gormonlar, biologik faol moddalar olishda, biotexnologik jarayonlarni qo'llash har jihatdan katta istiqbolga ega.

II. O'quv fanining maqsadi va vazifalari

Biotexnologiyani o'qitishdan maqsad talabalarga hozirgi zamon biologiyasi va chegaradosh fanlar yutuqlariga asoslangan, yangi texnologik jarayonlar yaratish va texnologiya nazariyasi asoslaridan bilim berishdan iboratdir. Xozirgi kunda Biotexnologiya yo'nalishini jadal sur'atda rivojlanishi natijasida, zamon talabiga javob bera oladigan mutaxxassislarni tayyorlash talab etilmoqda. Shu sababli bakalavr yo'nalishidagi **talabalarga biotexnologiya asoslari fanidan umumiy bilim berish maqsadga muvofiqdir.**

“Biotexnologiya” o'quv fanini o'zlashtirish jarayonida bakalavir biotexnologiya bilan ekologiya, tibbiyot hamda oziq-ovqat mahsulotlari va qishloq xo'jalik sano'atlari o'rtasidagi aloqani, biologik mahsulotlar olish maqsadida, konkret biotexnologik jarayonni ishlab chiqishni, gen va hujayra muhandisligi istiqbollarini, biotexnologik usullarni qo'llashda kerakli mikroorganizmlar va fermentlar, muhit vashart- sharoitlarni topa bilishni, turli immobillangan mikroorganizmlar va ferment preparatlarini olishni, zamonaviy tajriba qurilmalari va o'lchov asboblariidan hamda zamonaviy axborot texnologiyalaridan foydalanishni, fan bo'yicha tavsiya etilayotgan zaruriy adabiyotlarni tanlashni, virtual electron bilim manbalaridan foydalanishni, ta'lim texnik vositalaridan foydalanishni, tanlangan mavzuning dolzarbligini va ahamiyatini asoslashni bilishi va **amaliy ko'nikmalarga ega bo'lishi kerak.**

Biotexnologiyani o'zlashtirishda talabalar biologiyadan: mikrobiologiya va virusologiya, genetika, molekulyar biologiya, bioximiya, biofizika, fiziologiya, botanika va zoologiya qonunlari xaqida tushunchaga ega bo'lishlari kerak. Mikrobiologiyadan: sanoat mikrobiologiyasi jarayonlari, mikroorganizmlarni o'stirish va ko'paytirish uslublari, mikroblar yordamida antibiotiklar, organik kislotalar, noyob va kerakli moddalar biosintezi, mikroblarni saqlash va ularning fa'ol xususiyatlarini yo'qotmaslik; bioximiya-dan-fermentativ reaksiyalar mexanizmlari, ularning fa'ol markazining tuzilishi, ishlash jarayonlari, modifikatsiya usuli yordamida barqarorligini oshirish; biofizikadan-membranalar tuzilishi, transport jarayonlari mexanizmlari, bioenergetikaning asosiy qonunlari; fotosintez va nafas jarayonlariga oid reaksiyalar; hujayra biologiyasidan hujayra tuzilishi, hujayrada asosiy protsesslarning kechishi, hujayralarning ko'payishi; molekulyar biologiyadan-DNK va RNK tuzilishi, transkripsiya, translyatsiya qonunlari, ribosomalar tuzilishi, genetik kod struktura elementlari va x.k. Kimyoviy texnologiyadan: asosiy texnologik jarayonlar, reaktorlarning tuzilishi va ishlash printsiplari, bioreaktorlarni amaliyotda qo'llash usullari **xaqida yetarli bilimga ega bo'lishlari shart.**

III. Asosiy Qism (maruza mashg'ulotlari) fan tarkibiga quyidagi mavzular kiradi:

1-mavzu: Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari (2 soat)

Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari. Fanning tadqiqot usullari, asosiy ob'ektlari, biotexnologiya fanining boshqa fanlar bilan bog'liqligi, fanning boshqa turli sohalardagi muammolarni yechishdagi tutgan o'rni. Biotexnologiya fanining tadqiqot usullari, asosiy ob'ektlari, zamonaviy yo'nalishlari. Hozirgi zamon biotexnologiyasining asosiy yo'nalishlari, fanning boshqa turli sohalardagi muammolarni yechishdagi tutgan o'rni, shuningdek, biotexnologiya yo'nalishi bo'yicha mutaxassis tayyorlashdagi o'rni va uning asosiy yo'nalishlari.

2-mavzu: Fermentlar muxandisligi (2 soat)

Fermentlar muxandisligi. O'simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari. Fermentlarni olish texnologiyasi. O'simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari. Biospetsifik xromatografiya va bu usulni o'ta toza fermentlar olishda qo'llash. Biospetsifik sorbentlarning olinish usullari. Biospetsifik sorbent turlari. Ularga kimyoviy ishlov berish va desorbtisiasiga ta'sir etuvchi omillar. Biospetsifik sorbentlar asosida yaratilgan texnologik jarayonlar. Fermentlarni ajratib olish va tozalash texnologiyasi. Mikroorganizm fermentlarining o'ziga xos xususiyatlari. Fermentlarni ajratib olish

texnologiyasi. Mikroorganizmlardan fermentlar ajratib olish va ularning o'ziga xos xususiyatlari. Fermentning ishlash mexanizmi.

Ferment + Substrat kompleksi, uning hosil bo'lishiga tasir etuvchi omillar.

3-mavzu: Fermentlarni immobillash. (2 soat)

Fermentlarni immobillash. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari. Immobillangan fermentlar. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari. Immobillangan fermentlarning o'ziga xos xususiyatlari. Immobillashning amaliy enzimologiyadagi ahamiyati. Immobillashda qo'llaniladigan tashuvchilar turlari. Tabiiy, organik, anorganik va sintetik usulda olingan polimerlarni tashuvchilar sifatida ishlatish. Qo'llaniladigan tashuvchilar turlari. Yuqori molekulyar tabiiy organik tashuvchilar. Anorganik moddalar asosida olingan tashuvchilar. Sintetik usulda olingan polimerlarni tashuvchilar sifatida ishlatish. Ularga funktsional faol guruhlar kiritish usullari. Immobillash jarayoniga ta'sir etadigan omillar. Immobillangan ferment xossalari o'zgarishi. Bifunktsional guruhlar qo'llash. Immobillash jarayoniga ta'sir etadigan omillar. Immobillangan ferment xossalari o'zgarishi. Immobillash usullarining ferment barqarorligiga ta'sir etishi va fermentlar barqarorligini oshirish.

4-mavzu: Fermentlar ishtirokidagi texnologik jarayonlar (2 soat)

Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Glyukoza-fruktozali shinni olish. Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Glyukoza-fruktozali shinni olish. Aminokislotalar ratsemizatsiyasi. D,L-aminokislotalarning bir biridan ajratish. Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Laktozasiz sut olish. Sut zardobidan shakarsimon moddalar olish. Kraxmal va sellulozani fermentlar yordamida parchalash. Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Laktozasiz sut olish. Sut zardobidan shakarsimon moddalar olish. Kraxmal va sellulozani fermentlar yordamida parchalash texnologiyasi. Sellyulolitik mikroorganizmlarning sellulozaga ta'sir etish mexanizmlari. Sellyuloza gidroliziga ta'sir etuvchi omillar.

5-mavzu: Gen muxandisligi (2-soat)

Gen muxandisligi. Organizm (in vivo) gen injenerligi. Genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi. Organizm (in vivo) gen injenerligi. Genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi. Kodlanadigan va kodlanmaydigan nukleotidlarning joylanishi. Intronlar. Transpozonlar. Bakteriyalar va eukariotlardagi transpozitsiya mexanizmlari. Gen muxandisligida qo'llaniladigan fermentlar Restriktazalar. Restriksiya va modifikatsiya tizimlari. Gen muxandisligida qo'llaniladigan fermentlar Restriktazalar. Restriksiya va modifikatsiya tizimlari. DNK-larni modifikatsiya qiladigan metilazalar. DNK-polimerazalar va ularning turlari. RNK asosida komplementar DNK polimerlarini sintez qilish mexanizmi. Praymerlar. DNK-ligazalar. Rekombinat DNK-lar to'g'risida tushuncha. Plazmidalar va viruslar vektor sifatida. Plazmidalarning avtonom replikatsiyaga uchrashi. Superprodutsent shtammalar yaratish. Vektorlar va ularni hujayraga joylashtirish. Vektorlarning umumiy xususiyatlari. Vektorlarni hujayraga integratsiyasi. Selektiv marker genlar Plazmidalar va viruslar vektor sifatida. Plazmidalarning avtonom replikatsiyaga uchrashi. Replikonlar. Plazmidalarning bakterial hujayraga integratsiyasi. Begona genlar ekspressiyasi. Bakteriya hujayralarida klonlanuvchi genlar ekspressiyasi. Mikroorganizmlar ishtirokida birlamchi va ikkilamchi metabolitlar ishlab chiqarish. Superprodutsent shtammalar yaratish. Interferonning gen injeneriya usulida olinishi. Somatotropin. Insulin. Eritropoetin. Fermentlar.

6-mavzu: O'simlik gen muxandisligi (2 soat)

O'simlik gen muxandisligi. Protoplastlar. Kallus to'qima. O'simlik gen muxandisligi. Protoplastlar. Kallus to'qima. Kallus to'qima yaratish borasidagi olib borilgan ishlar. Kallus yaratish uchun qo'llaniladigan oziq muhitlar va sterilizatsiya ishlari. O'simlik gibrirlarini olish. Begona genlarni o'simliklarga kiritish yo'llari. O'simlik gibrirlarini olish. Begona genlarni o'simliklarga kiritish yo'llari. Bir-urug' va ikki-urug' pallalik transgen o'simliklar olish. Transgen o'simliklar bozorini shakllantirish va uning ahamiyati. O'simlik gen muxandisligida qo'llaniladigan marker

genlar. Transgen hujayralarni saralab olish. O'simlik gen muxandisligida qo'llaniladigan marker genlar. Transgen hujayralarni saralab olish. . Transgen hujayralarni saralab olish. Agrobakter tumifatsiens bakteriyasi va uning xususiyatlari. Ti-plazmida. Opinar. Ti-plazmidalar tuzilishi. Ti- va Ri-plazmidalar yordamida protoplastlarga begona DNK-lar kiritish. Transgen o'simliklarning istiqbollari.

7-mavzu: Hayvon gen muxandisligi (2 soat)

Hayvon gen muxandisligi. Hayvon hujayralarining o'ziga xos markerlari va bakterial genlarni kiritish. Hayvon hujayralari transformatsiyasi va transfektsiyasi. Hayvonlarga bakterial genlarni kiritish. Viruslarni vektor sifatida qo'llanilishi. Liposomal asosida yot genlarni hujayraga kiritish. Embrional o'zak xujayralarni transgen hayvonlar yaratishda qo'llash. Transgen hayvonlar yaratish. Transgen hujayralarni saralab olish. Odam genomi. Gen xaritalari. Transgen hujayralarni saralab olish. Odam genomi. Gen xaritalari. Hayvon organizmiga yangi genlar kiritish. Irsiy kasalliklarni davolash.

8-mavzu: Hujayra muxandisligi (4 soat)

8.1. Hujayra muxandisligi. Hujayralarni o'stirish va saqlash. Hujayra kulturalari

Hujayra muxandisligi. Hujayralarni o'stirish va saqlash. Hujayra kulturalari. O'simlik boshlang'ich to'qima hujayralari. O'simlikni o'stirish usullaridagi farqlar. Yuksak o'simliklarni somatik hujayralarini gibridlash. O'simlik hujayrasi muhandislik yutuqlari.

8.2. Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash.

Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash. Hayvon hujayrasi injenerligida miqdoriy usullar. Vaksinalar, fermentlar, gormonlar. Gibridom texnologiyalar. Monoklonal antitanalar olinishi.

9-mavzu: Tabiiy organik birikmalar biotransformatsiyasi (2 soat)

Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi. Bioetanol ishlab chiqarish. Tabiiy organik birikmalar biotransformatsiyasi. Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi. Bioetanol ishlab chiqarish. Kraxmal tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Sellyuloza tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Siloslash va kompostlash jarayonlari. Bioprotseslarni nazorat qilish yo'llari. Uzlukli va uzluksiz jarayonlar. Mikroorganizmlar va fermentlarni immobillagan holatda biotexnologik qayta ishlashda qo'llash. Aerob va anaerob jarayonlar.

Mikroorganizmlar va fermentlarni immobillagan holatda biotexnologik qayta ishlashda qo'llash. Aerob va anaerob jarayonlar. Fermentatsiya. Reaktorlar. Chiqindilar (sanoat, kommunal va qishloq ho'jaligi chiqindilari). Bioyoqil'ilar ishlab chiqarish. Chiqindilar (sanoat, kommunal va qishloq ho'jaligi chiqindilari). Bioyoqil'ilar ishlab chiqarish. Turli biotexnologik usullar yordamida qimmatbaho mahsulotlarni olish. Minerallarni qayta ishlash biotexnologiyasi. Texnologik jarayonlarni takomillashtirish va ularning texnik iqtisodiy ko'rsatgichlarini ko'tarish.

IV. Maruza mashg'ulotlarining soatlar bo'yicha taqsimlanishi.

№	Mavzu nomi	Soat
1	Kirish. Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari.	2
2	Fermentlar muxandisligi	2
3	Fermentlarni immobillash.Immobillashning fizik va kimyoviy usullari.	2
4	Fermentlar ishtirokidagi texnologik jarayonlar	2
5	Gen muxandisligi	2
6	O'simlik gen muxandisligi	2
7	Hayvon gen muxandisligi	2
8	Hujayra muxandisligi (4 s) 8.1 Hujayralarni o'stirish va saqlash. Hujayra kulturalari. (2s) 8.2 Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash.(2s)	4
9	Tabiiy organik birikmalar biotransformatsiyasi	2
Jami:		20

Laboratoriya mashg'ulotlarini tashkil etish bo'yicha tavsiya va ko'rsatmalar

Laboratoriya ishlari har bir talaba tomonidan alohida-alohida bajariladi. Bunda avvalo talaba bajariladigan laboratoriya ishining nazariy va amaliy tomonini qisqacha izohlab beradi. So'ngra laboratoriya ishining bajarilishi davomida olingan natijalarni xulosadlab o'z daftariga yozib qo'yadi. Ushbu xulosalar o'qituvchi tomonidan og'zaki muloqat shaklida tekshiriladi.

Laboratoriya mashg'ulotlari mavzulari ro'yxati.

№	Laboratoriya mashg'ulotlari mavzulari	Soati
1	Chiqindisiz texnologiya yaratish.	4
2	Ferment faolligini aniqlash	2
3	Fermentni me'yoriy ko'rsatkichlarini aniqlash.	2
4	Fermentlarni kovalent immobillash.	2
5	Fermentni bifunksional agent orqali immobillash.	2
6	Fermentlarning fizik-kimyoviy xususiyatlarini o'rganish.	2
7	Chiqindilar asosida sorbent sintezlash	2
8	Bakteriya polisaxaraitlarini ajratib olish	2
9	Biogaz olish uchun organik chiqindilarga ishlov berish.	4
10	Biogaz olish uchun mikroorganizmlar assotsiatsiyasini yaratish.	4
Jami		26

Izoh: Ishchi o'quv dasturlarni shakllantirishda laboratoriya mashg'ulotlar mavzulari o'quv rejadagi soatlarga mos holda va OTM imkoniyati darajasida tanlab bajariladi.

Mustaqil ishni tashkil etishning shakli va mazmuni

Mustaqil ishlash ishlash uchun talabalarga biotexnologiyaga oid ma'lumotlar mavjud bo'lgan turli adabiyotlar tavsiya etiladi. Bundan tashqari zarur hollarda laboratoriyadagi mavjud asbob va uskunalardan ham ularni yaxshi biluvchi mutaxassis yoki o'qituvchi ishtirokida talabalar ixtiyoriga beriladi. Mustaqil ish uchun beriladigan mavzular va ishlar individual harakterda bo'lib talabalarning biotexnologik jarayonlarni yanada chuqurroq o'rganishga qaratilganidir. Tavsiyalar individual talabga asoslanadi va joriy, oraliq nazorat shaklida yoki referat hamda muloqot tarzida topshiriladi.

V. Mustaqil ish uchun quyidagi topshiriqlarni bajarish tavsiya etiladi:

№	Mustaqil mashg'ulotlari mavzulari	Soati
1	Hujayra muxandisligidagi texnologik jarayonlarini o'rganish.	10
2	Gibridomalar texnologiyasi.	6
3	Monoklonal antitelolar olish	6
4	Gen muhandisligi yordamida noyob oqsillarni sintezlash	14
5	Fermentlar yordamida organik moddalar sintezini va stereoizomerlar olinishni o'rganish.	10
6	Immobilangan fermentlar ishtirokida bioyoqilg'i olish	10
7	Azot-bog'lovchi o'simliklarni gen muhandisligi yordamida yaratish.	8
8	Viruslarni gen muhandisligida qo'llanilishi	10
9	Atorf muhitni saqlashda (muhofoza qilishda) biotexnologiyaning roli	10
10	Noananaviy usulda yoqilg'i olish texnologiyasi.	14
11	Fermentlar yordamida aminokislotalar sintezi	6
12	Immunoenzim tahlilining getrogen usuli	6
13	Transgen hayvonlar yaratish usullarini o'rganish.	10
14	Mikroorganizmlar yordamida transgen oqsillar olish texnologiyalari	8
15	Biotexnologiya usullarini kimyoviy reaksiyalarda qo'llash	6
16	Bioetanololish texnologiyasida fermentlarni roli va ahamiyati.	8
17	Vodorod olish texnologiyasi	6
18	Biosensorlar.	10
19	Bioelektronika	8
20	Immunoenzem tahlilining gomogen usuli	12
Jami		174

Izoh: Ishchi o'quv dasturlarni shakllantirishda mustaqil ta'lim mavzulari o'quv rejadagi soatlarga mos holda va OTM imkoniyati darajasida tanlab bajariladi.

VI. Fanni o'qitilishidan kutiladigan natijalar, zamonaviy axborot va pedagogik texnologiyalar

Talabalarining mikrobiologiya fanini o'zlashtirishlari uchun o'qitishning ilg'or va zamonaviy usullaridan foydalanish, yangi informatsion-pedagogik texnologiyalarni tadbiq qilish muhim ahamiyatga egadir. Fanni o'zlashtirishda darslik, o'quv va uslubiy qo'llanmalar, ma'ruza matnlari, tarqatma materiallar, elektron materiallar, virtual stendlar hamda gerbariylardan foydalaniladi. Fanning o'qitish turlari dasturda ko'rsatilgan mavzular ma'ruza, amaliy mashg'ulotlar shaklida olib boriladi. Shuningdek atroflicha bilim olishni ta'minlash maqsadida talabalarga mustaqil ish mavzulari ham beriladi. Fanni zamonaviy pedagogik uslublar – "aqliy xujum", "fsmu", "menyu" tarzida o'tish ham ko'zda tutilgandir. Ma'lumotlar ko'rgazmali o'quv qurollari, kodoskop, multimedia, mikroskop, total va kesmali preparatlar yordamida olib boriladi. Ma'ruza va laboratoriya darslarida mos ravishdagi ilg'or pedagogik texnologiyalardan foydalaniladi.

VII. Ta'lim texnologiyalari va metodlari:

Darsni o'tishda mavzularning murakkab va oddiyligiga qarab ta'limning zamonaviy xususan interfaol usullari, pedagogik va axborot - kommunikatsiya (mediata'lim, amaliy dastur paketlari, prezintatsion elektron – didaktik) texnologiyalar qo'llaniladi.

izoh: ta'minot vazifasini darslik, o'quv qo'llanmalar va boshqa o'quv adabiyotlar, monografiyalar, dissertatsiyalar, elektron adabiyotlar hamda internet ma'lumotlari bajaradi.

VIII. Talabalar bilimni baholash mezonlari

Talabaning laboratoriya mashg'ulotlaridagi, mustaqil ta'lim topshiriqlarini bajarishi hamda faolligi "5" baholik tizimda baholanib boriladi va nazorat turlarida inobatga olinadi.

Nazorat turi **yozma(og`zaki)** shaklda o'tkazilganda:

- talaba fan (mavzu) bo'yicha mustaqil qaror qabul qilsa, ijodiy fikrlasa, bilimni amalda qo'llay olsa va savol mohiyatini bilib, xulosa chiqarganligi uchun "5" (a'lo) baho;

- talaba fan (mavzu) bo'yicha qisman mustaqil qaror qabul qilsa va ijodiy fikrlasa hamda bilimni amalda qo'llay olsa, berilgan savolning mohiyati haqida tushunchaga ega bo'lsa "4" (yaxshi) baho;

- talaba fan (mavzu) bo'yicha bilimni amalda qisman qo'llay olsa, savol mohiyatini tasavvur qilsa "3" (qoniqarli) baho;

- talaba fan dasturi talablarini o'zlashtirmagan bo'lsa va fan hamda savollar mohiyati haqida tasavvurga ega emas deb topilganda "2" (qoniqarsiz) baholar bilan baholanadilar.

Yakuniy nazorat turi fakultet dekani, o'quv-uslubiy boshqarma bilan kelishgan holda va o'quv ishlari bo'yicha prorektor tomonidan tasdiqlangandan grafik asosida tegishli fan bo'yicha o'quv mashg'ulotini olib borgan o'qituvchi ishtirokisiz o'tkaziladi.

Yakuniy nazorat shakli fan xususiyati va o'quv auditoriya soatidan kelib chiqib, kafedra tomonidan belgilanadi.

Oraliq nazorat

Test shaklida o'tkazilsa variant 30 ta savoldan iborat bo'lsa quyidagicha baholanadi:

26-30 "5" (a'lo)

21-25 "4" (yaxshi)

17-20 "3" (qoniqarli)

16 va undan kam bo'lsa "2" (qoniqarsiz)

"yozma" shaklda o'tkazilsa savollar tarkibi 3 tadan iborat bo'ladi va har bir savol "5" baholi tizimda baholanadi, amaliy, seminar va tajriba mashg'ulotlarining umumiy bahosining o'rtachasi olinib, on bahosi bilan o'rtacha bahoni hisobga olishni tavsiya etamiz.

Nazorat ishi.

Har bir semestrda talabaga nazorat ishi bo'yicha bittadan mavzu qo'shimcha beriladi va yakuniy nazorat oldidan fan o'qituvchisiga topshiradi hamda yakuniy nazorat vaqtida qo'shimcha baholanadi.

Yakuniy nazorat

"test" shaklida o'tkazilsa variant 30 ta savoldan iborat bo'lsa quyidagicha baholanadi:

26-30 "5" (a'lo)

21-25 "4" (yaxshi)

17-20 "3" (qoniqarli)

16 va undan kam bo'lsa "2" (qoniqarsiz)

"yozma" shaklda o'tkazilsa savollar tarkibi 5 tadan iborat bo'ladi va har bir savol "5" baholi tizimda baholanib o'rta baho hisobga olinadi.

Tavsiya etilgan adabiyotlar:

Asosiy adabiyotlar

1. Komilov X.M., Raximov M.M., Odilbekova D.Yu. Biotexnologiya asoslari.

Toshkent: Extremum. 2010.

2. Mirxamidova R., Vaxabov A.X., Davranov K., Tursunboeva G .S. Mikrobiologiya va biotexnologiya asoslari. Toshkent: Ilm Ziyo. 2014.

3. Glik B., Pasternak DJ. Molekulyarnaya biotexnologiya: printsipy i primeneniye. M.:Mir. 2002.

Qo'shimcha adabiyotlar:

1. Sasson A. Biotexnologiya : sversheniya i nadejdy M.Mir.1987
- 2.Ovchinnikov Yu.A. Bioorganicheskaya ximiya. M.Prosvещeniye.1987
- 3.Al'berts. Molekulyarnaya biologiya kletki. M.Mir.1994
- 4.Vvedeniye v prikladnuyu enzimologiyu. Pod red. Berezina I.V. Martineka K.M. M: MGU.1997
5. Rekombinatnyye molekuly: znachenie dlya nauki i praktiki. (Pod red. Birsa i Berisa E) M.Mir.1980
6. Bezborodov A.M. Bioximicheskie osnovy mikrobiologicheskogo sinteza. M.Nauka.1980
- 7.Biotxnologiya. (Pod red. Yegorova N.S., Samuilova D.V.) v 8 kn. M.Высшая shkola. 1978
- 8.Mirzaraxmetova D.T., Raximov M.M. «Fermentlar muxandisligi» fanidan amaliy mashg'ulotlar o'tkazish bo'yicha uslubiy qo'llanma. Toshkent: UzMU. 2007. 56b.
- 9.Mirzaraxmetova D.T. Osnovy biologicheskoy spetsifichnosti. Uslubiy qo'llanma. Toshkent: UzMU. 2006. 112s.
10. Mirzaraxmetova D.T., Щербак Ye.Yu., Saдыkova K.A. Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu bolshogo praktikuma kursa «Biotexnologiya». Toshkent: UzMU. 2007. 56b.
- 11.Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge: Cambridge Univcrsity Press, 2009.
- 12.Kimball Nill. Glossary of Biotechnology terms. New York: CRC Press LLC., 2002.
- 13.Glick B.R., Pasternak J.J., Patten G.L. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Washington. ASM Press. 2010.
- 14.Arora D.K., Bridje P.D., Bhatnagar D. Fungal. Biotechnology in Agriculturan, Food and Environmental Applications. N.Y.:Marsel Dekker, Ins, 2004.
- 15.Jordening H.J., Winter J, Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GMBH&Co.KGaA, 2005.
- 16.Evans G.M., Furlong J.C. Environmental Biotechnology. Theory and Applications. West Sussex: John Wiley& Sons. LTD, 2003.
- 17.Nair A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New Delhi: Infnity Science Press LLC, 2007.

Internet saytlari:

<http://www.natlib.uz/.uz/>
<http://www.Lib.mn/>
[http\\www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru)
[http/, www.ziyo.net](http://www.ziyo.net)
[http: www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[illegible]

[illegible]

ТЕСТЛАР

1. Бир хужайранинг генетик жиҳатдан бир хил бўлган авлоди нима деб аталади?

- А.Клон
- Б.Мутантлар
- С.Ревертонтлар
- Д.Супрессорлар

2. Хромасом мутасияларни кўрсатинг?

- А. Барча жавоб тўғри
- Б. Хромасомалар сонинг ўзгариши
- С. Генларнинг жойлашиш тартиби ва сонинг ўзгариши
- Д. Айрим генларнинг ўзгариши

3. Хромасома бўлакларининг тушиб қолиши нима деб аталади

- А. Делесиялар
- Б. Дупликасиялар
- С. Трансподисиялар
- Д. Инверсиялар

4. Хромасомалар ўртасида хромасом бўлакларининг ўзаро жойи алмашиши нима де-йилади?

- А.Транслокасиялар
- Б.Инверсиялар
- С.Транпозисиялар
- Д.Амплификасиялар

5. Нима миссенс-мутасияга олиб келади?

- А.Транспозисия ва транверезиялар
- Б.Дупликасиялар
- С.Дупликасия ва транспазисия
- Д.Трансверсиялар

6. Бошланғич генетопга тескари мутасия натижасида юзага келадиган мутантлар нима деб аталади?

- А.Ревертонтлар
- Б.Супрессорлар
- С.Леки-мутант
- Д.Клонлар

7. Из қолдириш (отпечаток) методи биотехнологияга ким томонидан киритилган?

- А.Д.Ледерберг ва Э.Ледерберг
- Б.Н.Н.Дубинин
- С.В.В.Суходелес
- Д.Д.Ж.Уоцон

8. Ичак таёқчаси хромасомаси қандай намоён бўлади?

- А.ДНК молекуласининг ҳалқасимон шакли
- Б.Чизиксимон ДНК молекуласи шаклида
- С.РНК молекуласининг ҳалқасимон шаклида

9. “__бу рекликонлар, доимий равишда хромасомадан ташқарида ирсийланади” ушбу иборада нима назарда тўтилган?

А.Плазмида

Б.Векторлар

С.Космида

Д.Бактерия

10. Битта хромасомага нечта йирик плазмида тўғрикелади?

А.1-4

Б.10-200

С.6-12

Д.100-150

11. Хужайраларнинг ўзаро мулоқоти, натижасида, донор хужайрадан ресипиант хужайра генетик информасиянинг берилиши яъни генетик алмашинув жараёни нима деб аталади?

А.Конюгасия

Б.Танскрипсия

С.Транслясия

Д.Репликасия

12. Бактерия вируслари нима деб аталади?

А.Бактериофаглар

Б.Бошқа синф бактериялари

С.Кўк-яшил сув ўтлари

Д.Плазмидлар

13. Фаг заррачалари нималардан иборат?

А.ДНК, РНК ва оксилдан

Б.Фақат ДНК

С.Фақат РНК

Д.Фақат оксилдан

14. Фагларнинг ҳаёт синкли қачондан бошланади?

А.Фаг заррачасининг хужайрага тегиши билан

Б.Бактериал хужайра лизисидан сўнг

С.Фаг хромасомасининг кўп каррали репликасияси вақтида

Д.Фаг қобиғининг ҳосил бўлиши вақтидан

15. Фаглар томонидан амалга ошириладиган донор хужайрадан, ресипиент хужайрага генетик информасиянинг берилиши қуйидаги жараёнларнинг қайси бирига тўғри келади?

А.Трансдуксия

Б.Транслясия

С.Терминасия

Д.Трансподисия

16. Трансдуксияни ким биринчи бўлиб тарифлаб берди?

А.Сендер ва ледерберг

Б.Ватанабе

С.Сикитя

Д.Суходолис

17. Трансдукцияловчи заррачаларнинг ҳосил бўлишининг асосий босқичи бўлиб нима ҳисобланади?

- А.ДНК нинг бактериофага шайланиши
- Б.Оқсил биосинтези жараёни
- С.Транскрипсия жараёни
- Д.Трансляция жараёни

18. Донор ҳужайрадан ажратилган ДНК нинг ресипиент ҳужайрага тушиши натижасида содир бўладиган генетик ахборот алмашинуви жараёни нима дейилади?

- А.Трансформация
- Б.Транспозисия
- С.Трансляция
- Д.Терминация

19. Ажратиб олинган фаг ДНК сининг бактерия ҳужайрасига ўтиши ва у ерда етилган фаг зарраларининг ҳосил бўлишига шароит яратиб берувчи жараёни нима дейилади?

- А.Транфекция
- Б.Трансформация
- С.Транспозисия
- Д.Трансляция

20. ДНК молекулаларининг қандай формалари мавжуд?

- А.Катянанлар
- Б.Конкатамерлар
- С.Мономерлар
- Д.Юкоридагиларнинг барчаси

21. Ген инженерлигида намунавий тадқиқот неча босқичдан иборат?

- А.4
- Б.5
- С.3
- Д.2

22. Ген инженерлигида ДНК молекулаларининг муҳим манбаи нима ҳисобланади?

- А.Турли хил организмларнинг генетик материаллари бўлаклари
- Б.Генларнинг кимёвий синтези
- С.Генларнинг химико-оперментатив синтези
- Д.Муҳим манбалар йўқ

23. Ҳозирги вақтда рестриктазаларнинг неча хили фарқланади?

- А.3
- Б.8
- С.5
- Д.10

24. ДНК даги бир хил кетма-кетликни аниқловчи ферментлар нима деб аталади?

- А.Изошизомерлар
- Б.Мегазалар
- С.Полимеразалар

25. Ушбу таъриф қайси жавобга тўғри келади?

“__ўз таркибида бир ёки бир неча растриктазалар таниши бўлган қисқа синтетик қўшспиралли олигануклеотидлар”.

мумкин

А.Изошизомерлар

Б.Линкерлар

С.Гилролазалар

Д.Лигазалар

26. Рекомбинант ДНК ни хўжайин хужайрасига киришини ва уни репликациясини таъминловчи қисми нима деб аталади?

А.Вектор

Б.Плазида

С.Космида

Д.Фазмида

27. Ичак таёқчаси бактериясининг неча хил векторлари мавжуд?

А.4

Б.2

С.3

Д.1

28. Плазмидалар хужайрага қандай йўл билан киритилади?

А.Трансформасия

Б.Трансдукция

С.Инекция

Д.Механик йўл билан

29. Трансформасияда ДНК нинг неча молекуласи иштирок этади?

А.10000-1000тадан 1та

Б.100тадан 2та

С.50тадан 5та

Д.100-1000тадан 3та

30. Ичак таёқчаси бактериясида жойлашган вирус нима деб аталади?

А.Бактериофаг лямбда

Б.Бактериофаг алфа

С.Бактериофаг гамлея

Д.Бактериофаг бетта

31. Космидаларни биринчи бўлиб таърифлаган олим?

А.Коллиз ва Кон

Б.Ледерберг

С.Конда и Маккей

Д.Симон

32. Клонотек геномлар яратишга ва еукариот ДНК нинг катта бўлакларини клонлашга мослашган йирик хажмли векторлар нима деб аталади?

А.Космидлар

Б.Фазмидлар

С.Плазмидлар
Д.Бактериофаглар

33. Фазмидлар нима?

- А.Фаг ва плазмидлар ўртасидаги гибридлар
- Б.Лямда фагининг ёпишқоқ учли ДНК ли, плазмиум
- С.ДНК нинг катта бўлакларини клонлашга мослашган векторлар
- Д.Хромасомадан ташқаридаги генетик элементлар

34. Таркибида плазмидалар ва репликасияси ва селекцияси учун зарур бўлган ва фагининг литик етилишига зарур генларни сақловчи ишлаб чиқарилган лямбда бактериофаглари нима деб аталади?

- А.Фазмидлар
- Б.Космидалар
- С.Плазмидлар
- Д.М13 фаги

35. Кўп микдорда оксил олиш учун нима қили лозим?

- А.МРНК турғунлигини таъминлаш ва оксил протеолизини тўхтатиш
- Б.МРНК турғунлигини камайтириш
- С.МРНК турғунлигини ошириш
- Д.Оксил протеолизини ошириш

36. Сайт-спесиорик мутагенез техникаси қандай имкониятлар беради?

- А.Мутасияларни геннинг аниқланган участкасига олиб киради
- Б.Мутасияларни геннинг бирон бир участкасига олиб киради
- С.Мутасиялардан химоялайди
- Д.Генга мутасияларнинг киришига йўл қўймайди

37. “Ҳаёт цикли давомида дифференцияровканинг бир неча босқичи маълум бўлган тупроқ грамманфий бактериялар” қуйидаги таъриф қайси жавобга тўғри келади?

- А.Аксиномисетлар
- Б.Бациллар
- С.Илдиз бактериялар
- Д.Ачитқилар

38. Оминокислоталарнинг ишлаб чиқарилишида кенг фойдаланиладиган, катоген бўлмаган прамманфий микроорганизмлар группасини кўрсатинг

- А.Илдизбактериялар
- Б.Аксиномисетлар
- С.Ачитқилар
- Д.Бациллалар

39. Хўжалик фаолиятида одам томонидан фойдаланилувчи микроорганизмлар (наввойчиликда, вино ва пиво тайёрлашда)

- А.Ачитқилар
- Б.Бациллалар
- С.Аксиномисетлар
- Д.Илдиз бактериялар

40. Бактерия ҳужайрасида бегона оқсиллар экспрессиясини оптимизациялаш муаммосини кўрсатинг.

А.Юқоридагиларнинг ҳаммаси тўғри

Б.Протеолизга қарши кураш

С.МРНК нинг стабиллизасияси

Д.Баъзи оқсил ҳужайралари учун заҳарланишни олдини олиш

41. Биокатолитик тизимлар иммобилизасиясининг асосий методларини кўрсатинг

1. Адсорбция ёки химиявий боғланиш

2. Полимер тузилишга қўшилиш

3. Имкапсуласия

4. Полифункционал агентлар ёрдамида кўндаланг тикиш

5. Изоелектрик фокуслаш

А.1,2,4,5

Б.1,2,3,5,

С.1,2,3,4,

Д.Барча жавоблар тўғри

42. Иммобилизасия нима?

А.Ферментлар фаоллигини сақлаш учун унинг ҳаракати ва тузилишини чегаралаш

Б.Ферментлар фаоллигини ўзгариши

С.Ферментлар синтези

Д.Ферментларнинг католитик активлиги ва тузилишининг ўзгариши

43. Иммобилизасиянинг адсорбцион усули нимага асосланади?

А.Табиий ва сунъий ташувчилар юзасига ферментларни бириктириш

Б.Ферментларни полимер гелларга боғлаш

С.Ферментларни мембрана қосулларига боғлаш

Д.Ферментларни кўндаланг тикиш

44. Ферментлар иммобилизасиясида нима рўй беради?

А.Гомоген ҳолатдан гетероген ҳолатга ўтади

Б.Ферментлар гетероген ҳолатдан гомоген ҳолатга ўтади

С.Ферментлар структураси ўзгаради

Д.Ҳамма жавоблар тўғри

45. Ферментлар ва реагентлар бўлинишига нима имкон беради?

А.Барча жавоблар тўғри

Б.Реаксияни керакли вақтда тўхтатиш

С.Реаксиядан сўнг ферментларни қайта тиклаш

Д.Фермент қўшилмаган маҳсулот олиш

46. Ҳужайра ва органлар учун иммобилизасиянинг қайси усулидан фойдаланиш мақсадга мувофиқ?

А.Полимер қўшилишга бириктириш

Б.Кўндаланг тикиш йўли билан

С.Адсорбция усули ёки киёвий синтез

Д.Инкосуласия усули

47. Инкосуласия усули нимага асосланади?

А.Ярим ўтказгич қобик билан қопланганлигига

- Б.Биокатолизаторларнинг ўтказмас қобик билан қопланганлигига
- С.Хужайраларнинг оксил копсуласига қўшилганлигига
- Д.Хужайра қобиғининг бузилишига

48. Хужайралар гел билан қўшилганда уларда қандай ўзгариш содир бўлади?

- А.Нормал ўсади ва кўпаяди
- Б.Ўсиши сусаяди ёки тўхтади
- С.Ёмон кўпаяди
- Д.Махсулот ажратмай уни ичида тўплайди

49. Биокатализаторни полимер тузилишга киритгач нима ҳосил бўлади?

- А.Гранулалар, хужайралар, толалар
- Б.Гранулалар, гел массаси
- С.Толалар ва таёқчасимон ҳосилалар
- Д.Тасмалар

50. Ферментлар функциялари.

- А.Католитик
- Б.Янги брикмалар синтези
- С.Химиявий реакцияни узади
- Д.Синтетик реакцияларга ҳалақит беради

51. 17 асда биринчи марта “хужайра” сўзидан ким фойдаланган?

- А.Роберт Гук
- Б.Г. Шванн
- С.А. Левингук
- Д.Р. Вихров

52. Про-ва еукариот хужайраларга хос бўлмаган, нотўғри жавобни кўрсатинг.

- А.Рибосомалар прокариотларда бор, еукариотларда йўқ
- Б.Либосомалар прокариотларда бор, еукариотларда йўқ
- С.Прокариотларда хужайра девори бор, еукариотларда еса йўқ
- Д.Про-ва еукариотларда ҳам плазматик мембрана бор

53. Ферментатив регуляция бу -

- А.Фермент молекулаларига метоболит махсулотлари таъсир қила бошлаганда ферментларнинг миқдорига боғлиқ бўлмаган ҳолда улар активлигининг ўзгариши
- Б.Фермент миқдорининг камайиши билан унинг фаоллигининг ўзгариши
- С.Фермент фаоллигининг ўзгармаслиги
- Д.Биохимиявий реакция тезлигининг катализатор ферментлар таъсири натижасида секин ўзгариши

54. Конститутив ферментларга мисоллар кўрсатинг.

- А.Глюкозани пируватга айлантирувчи гликолиз ферментлари
- Б.Пируватни глюкозага айлантирувчи ферментлар
- С.Пируватни глюкозага ва глюкозани пируватга айлантирувчи ферментлар
- Д.Ҳамма жавоблар нотўғри

55. Ферментлар индукцияси бу -

- А.Химиявий брикма - индукторнинг пайдо бўлишига жавоб сифатида фермент синтезининг нисбий ўзгариши
- Б.Ферментлар синтези тезлигининг ошиши

- С. Ферментлар синтези тезлигининг камайиши
Д. Фермент фаоллигининг регуляцияси
56. Ферментлар синтезининг сустлашуви ёки тўхтаб қолиши нима деб аталади?
А. Ферментларнинг координирланган репрессияси
Б. Ферментларнинг координирлайдиган индукцияси
С. Ферментатив регуляция
Д. Ҳамма жавоб нотўғри
57. Репрессия ёрдамида нималар синтези бошқарилади?
А. Ҳамма жавоб нотўғри
Б. Аминокислоталар
С. Витаминлар ва бошқа бирламчи метолитлар
Д. Пурин ва меримидинлар
58. Метоболизм тезлиги қандай аниқланади?
А. Энергия тақчиллиги билан
Б. Мухитдаги у ёки бу субстратлар консентрасияси билан
С. Хужайранинг энергияга бўлган еhtiёжи билан
Д. Барча жавоблар тўғри
59. АТФ синтезининг ягона йўлини кўрсатинг.
А. Субспорап фосфорланиш
Б. Фосфорланиш ёки электронлар ташилиши
С. Учкарбон кислота цикли оралиқ махсулотларининг оксидланиши
Д. Барча жавоблар тўғри
60. Хужайра ички протеолиз стимуляцияси қачон кузатилади?
А. Барча жавоблар тўғри
Б. Аминокислоталар тақчиллигида
С. Азот манбаси тақчиллигида
Д. Энергия ва углевод тақчиллигида
61. Агар хужайрани юқоримолекуляр бирикмалар, масалан: крахмал аммонит ва минерал тузлар бўлган муҳитга жойлаштирадик у:
А. Барча жавоблар тўғри
Б. Аввал крахмални глюкозага гидролизлайди
С. Глюкозани хужайра ичига етказиб беради
Д. Глюкозани икки ва уч-углеводли бирикмаларга ажратади ва бу кичик молекулаларни уч карбон кислота циклига киритади
62. Янги ўсимлик навлари яратиш учун йўналишлар мавжуд?
А. Барча жавоблар тўғри
Б. Гибридизация асосидаги селекция
С. Табиий ва сунъий реакциялар
Д. Ген муҳандислиги
63. Туганак бактериялар қайси авлодга мансуб?
А. Рҳизобиум
Б. Агробацтериум
С. Азотобацтер
Д. Клебсиелла

64. Қайси бирикмалар ўсимлик хўжайин ва туганак азотафиксаторлар ўртасида симбиоз муносабатини ўрнатувчи генларга ега?

А.Сйм

Б.Пак

С.Сфх

Д.Осм

65. Нам етишмовчилиги, иссиққа, совуққа ва ер шўрлигига қарши ўсимлик чидамлилигини генлар қандай бирикмаларга оид?

А.Осм

Б.Сйм

С.Пак

Д.Сфх

66. Ўсимликларда CO_2 нинг функциясини мувофиқлаштирувчи генлар қандай бирикмаларга оид?

А.Сфх

Б.Сйм

С.Пак

Д.Осм

67. Қайси фототроф микроорганизмлар оксил манбаи бўла олади?

А.Барча жавоблар тўғри

Б.Спирулина

С.Члорелла

Д.Счнедесмус

68. CO_2 ва H_2O ёнишида олинадиган экологик ёқилғи.

А.Этанол

Б.Газохол

С.Гидрогеназа

Д.Биогаз

69. Бензиннинг 10-20% ни нима ташкил қилади?

А.Газохол

Б.Этанол

С.Гидрогеназа

Д.Биогаз

70. Таркибида Фе С - ситрлар бўлган фермент.

А.Гидрогеназа

Б.Этанол

С.Газохол

Д.Биогаз

71. Ёмон сифатли ўсмалар ва маълум микроорганизм гуруҳларига нисбатан физиологик фаолликка ега бўлган ҳаётий фаолият маҳсулоти.

А.Антибиотиклар

Б.Гармонлар

С.Интерферанлар

Д.Интерлейкинлар

72. Юқумли вирусларнинг таъсирига жавобан инсон ва ҳайвон ҳужайралари нима ажратади?

- А.Интерлейкинлар
- Б.Антибиотиклар
- С.Гармонлар
- Д.Интерферонлар

73. Иммуни жавобини ташкил қилишда қатнашадиган калта полипептидлар?

- А.Интерлейкинлар
- Б.Интерферонлар
- С.Антибиотиклар
- Д.Гармонлар

74. Рекombинат вакциналар қандай олинади?

- А.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
- Б.Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
- С.В - гибриддон ҳужайралари маҳсулотлари
- Д.Тўғри жавоб йўқ

75. Вакцина антигенлар қандай олинади?

- А. Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
- Б.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
- С.В - гибриддон ҳужайралари маҳсулотлари
- Д.Тўғри жавоб йўқ

76. Маноклонал антителалар нима?

- А.В - гибриддон ҳужайралари маҳсулотлари
- Б.Касаллик қўзғатувчи генлар клонлаштирилади
- С.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
- Д.Тўғри жавоб йўқ

77. Озиқ биомассасида оксил, нуклиен кислоталар ва липидлар қанча миқдорда бўлиши керак?

- А.80%, 2%, 1%
- Б.90%, 1%, 0,5%
- С.60%, 10%, 5%
- Д.10%, 55, 3%

78. Бактериялардан қайси бири С ёрдамида оксидлаб Fe, Cu, Zn ва бошқа металлларни ишқорлайди?

- А.Тхриобациллус феррохиданс
- Б.Чромбацтериум виолацеум
- С.Зоолгоца рамигера
- Д.Хантомонас цампестрис

79. Қайси бир бактерия олтинни еритади?

- А.Чромбацтериум виолацеум
- Б.Зоолгоца рамигера
- С.Хантомонас цампестрис
- Д.Тхриобациллус феррохиданс

80. Қайси бир бактерия оқава сувлардан H, Cu, Cd ни ажратиб олади?

- А.Зоолгоца рамигера
- Б.Хантомонас цампестрис
- С.Тхиобациллус ферроохиданс
- Д.Чромбацтериум виолацеум

81. Қайси бактериянинг ҳужайрадан ташқари полисахариди нефтни ажратиб олишда фойдаланилади?

- А.Хантомонас цампестрис
- Б.Тхиобациллус ферроохиданс
- С.Чромбацтериум виолацеум
- Д.Зоолгоца рамигера

82. Ўстириш учун энг зарур моддаларни кўрсатинг.

- А. NH_3 , X_2 С, CO_2 , H_2 , O_2
- Б. X_2 CO_2 , Кцл, X_2 CO_3 , Мг CO_4
- С. На Сл
- Д. Барча жавоб тўғри

83. Иқтисодий нуқтаи назардан, фойдаланиш мақсадга мувофиқ ашёни кўрсатинг. бўлган хом

- А. Тўғри жавоб йўқ
- Б. Қимматли хом ашё
- С. Арзон хом ашё
- Д. Тоза ҳолатда олинган бирикмалар аралашмаси

84. Автотроф организмлар, ҳужайранинг органик бирикмаларини қуйидагиларнинг қайси биридан синтез қилади?

- А. CO_2 ва X_2O
- Б. NH_2 ва X_2O
- С. X_2C ва CO_2

85. Арзон ва мўл хом ашёни кўрсатинг.

- А. Ксилоза
- Б. Лактоза
- С. Меласса

86. Углерод ва энергиянинг кенг тарқалган манбалари бўлиб ҳисобланувчи компонентлар.

- А. Нефт
- Б. $(\text{NH}_4)_2 \text{CO}_4$
- С. Мочевина
- Д. NH_3

87. Лигнинни аниқлашнинг кенг тарқалган методида қайси модда билан ишлов берилади?

- А. CO_2
- Б. CO_2
- С. NH_3

88. Гемиселлийўлозаларнинг асосий компоненти

- А. Сахароза
- Б. Лактоза

С.Ксиллон
Д.Крахмал

89. Қайси ферментлар гуруҳи атомлар группасини бир бирикмадан иккинчи бирикмага ташишни амалга оширади?

- А.Трансфераза
- Б.Изомеразалар
- С.Гидромазалар
- Д.Оксидоредуктазалар

90. Лигаза, амилаза, пептидаза ферментлари қайси ферментлар синфига мансуб?

- А.Гидролазалар
- Б.Лиазалар
- С.Лигазалар
- Д.Тронеферазалар

91. Саноатнинг қайси соҳаларида амилазалардан фойдаланилади?

- А.Текстил, нон пишириш, пиво ишлаб чиқариш
- Б.Озиқ-овқат, тери, гўшт саноатида
- С.Фармацияда, фотографияда
- Д.Озиқ-овқат, текстил, резина

92. Бактериал протеазалардан фойдаланиш

- А.Кир ювиш воситалари, оксил гидролизатларини олиш (озуқа ишлаб чиқаришда) терини юмшатишда
- Б.Глюкозани ажратишда, шарбатларни ёрқинлаштиришда
- С.Кўпик микдорини мувозанатлаштиришда тиш пастасига қўшилади
- Д.Болалар озуқасини ишдаб чиқаришда

93. Ферментларни чизик бўйлаб жойлашиши қандай имкониятларни беради?

- А.Ўзини бошқариш имконини беради
- Б.Турли хил тугалланган маҳсулотларга олиб келади
- С.Ингибициянинг тескари алоқа бўйича ўзини бошқариш
- Д.Ҳамма жавоблар тўғри

94. Кофакторлар функцияси.

- А.Ферментлар фаоллигини тўхтатади
- Б.Ферментлар синтези учун зарур
- С.Каталитик актив ишларни амалга ошириш учун зарур
- Д.Ҳамма жавоб нотўғри

95. Температура оширилганда ферментатив реакция тезлиги қандай ўзгаради?

- А.Маълум чегарагача тўғри пропорционал ўзгаради
- Б.Ўзгармайди
- С.Тўғри пропорционал
- Д.Тескари пропорционал

96. Адсорбция йўли билан иммобилизация методи ёрдамида биологик объектларни фиксация қилиши мумкин бўлган органик тошувчиларни кўрсатинг?

- А.Мейтран, полиэтилен, полистеран

- Б.Нуклеин кислоталар, ферментлар
- С.Оқсиллар, ёғлар, бензол
- Д.Карбонатлар, глисерин, кўмир

97. Этонол олиш учун, ачитқи ва бактериялар хужайралари иммобилизасияси учун органик тошувчини кўрсатинг?

- А.Ионлари алмашадиган смолалар
- Б.Селйўлоза
- С.Полинуритон
- Д.Хитин

98. Оқова сувларни тозалашда қайси тошувчилардан фойдаланилади?

- А.Полиуретан
- Б.Кўмир
- С.Карбонатлар
- Д.Барча жавоблар тўғри

99. Аспаргиназа ферменти қайси тошувчига адсрбсия қилинади?

- А.Пахта матога
- Б.Полистеролга
- С.Полиетиленга
- Д.Селйўлозага

100. Японларнинг анъанавий таоми - лисо поя дуккакларини қайси влод замбуруғлари билан зарарлантириб тайёрланади?

- А.Псалиота цампестрис
- Б.Аспергиллус
- С.Сопринус
- Д.Сферцораеиус