

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

БОТАНИКА КАФЕДРАСИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ
фанидан

РАҚАМЛИ-УСЛУБИЙ ТАЪМИНОТ

(Сиртқи таълим шакли 2-мутахасислик 4-курс талабалари)

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 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. (2с)	
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 (2с)	
2.10	Биогас олиш учун микроорганизмлар ассоциациясини яратиш. (2с)	
Жами Лаборатория машғулоти соати 32 соат		
Амалий машғулоти мавзулари		
3.1	Ферментлар фаол марказларининг тузилиши.	
3.2	Ферментлар барқарорлигини таъминловчи омиллар.	
3.3	Иммобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қўллаш имкониятларини ўрганиш (2с)	
3.4	Иммунобиотехнология. Иммоэнзим таҳлили. Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсорлар. (2с)	
3.5	Векторлар ва уларни қўллаш (2с)	
3.6	Ген муҳандислигида ишлатиладиган ферментлар (2с)	
3.7	Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оксил ва гормонлари (интерферон, инсулин ва бошқа) олиниши.	
3.8	Ўсимликлар ген муҳандислиги Ти-плазмидаларни ва фитовирусларни	

	ўсимлик ген муҳанлислигида ишлатилиши. (2с)	
3.9	Ҳайвон ва одамлар ген муҳандислиги.	
3.10	Геном муҳандислиги. (хужайра муҳандислиги). (2с)	
3.11	Биоэлектроника принциплари. Биосенсорлар яратиш ва қўллаш.	
3.12	Иммунокомпонентлик асосидаги бисенсорлар. (2с)	
3.13	Чиқиндисиз технология яратиш. (2с)	
Жами амалий машғулоти мавзулари соати 16 соат		
Семинар машғулоти мавзулари		
4.1	Ферментларнинг ўзига хос хусусиятлари, табиий ва имобилланган ферментларнинг ўхшашлиги ва фарқли томонлари. (2с)	
4.2	Суперпродуцент штаммлар яратиш. Интерфероннинг ген инженерия усулида олиниши. Самотатропин. Инсулин. Эритропоетин. Ферментлар. (2с)	
4.3	Трансген хўжайраларни саралаб олиш. Трансген ўсимликларнинг истиқболлари. Ҳайвон организмига янги генлар киритиш. Ирсий касалликларни даволаш. (2с)	
4.4	Атроф муҳит ифлосланиши ва токсик бирикмаларнинг биодеградацияси. (2с)	
Жами семинар машғулоти мавзулари 8 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**

ТАБИИЙ 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.

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, хужайра муҳандислиги, ген инженерияси, культура, Микроорганизм, Молекуляр биотехнология, йўналишлар, вазифалар, қўлланиладиган методлар.*

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

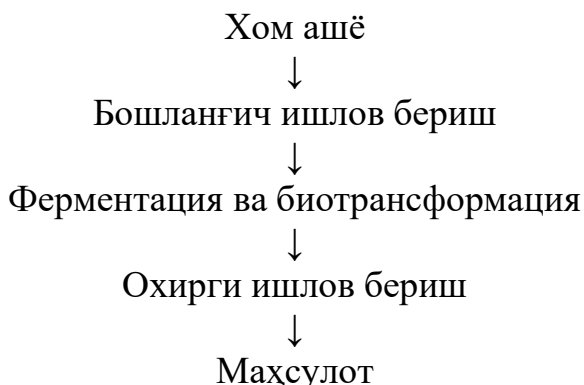
1.Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари

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 хужайра фаолиятини турли механизмлар ёрдамида бошқариш имконини берди. Биология соҳасида яратилган оламшумул янгиликлар ва ишланмалар замонавий биотехнологияни ривожланишига туртки бўлди ва улар қуйидагилардир:

- 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 очиқ берилиши;
- Микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон хужайралари культурасини олишнинг маълум бўлган технологияларни мукаммаллаштириш ва янги технологияларини яратилиши;
- Генетик ва хужайра 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 масштабни 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;

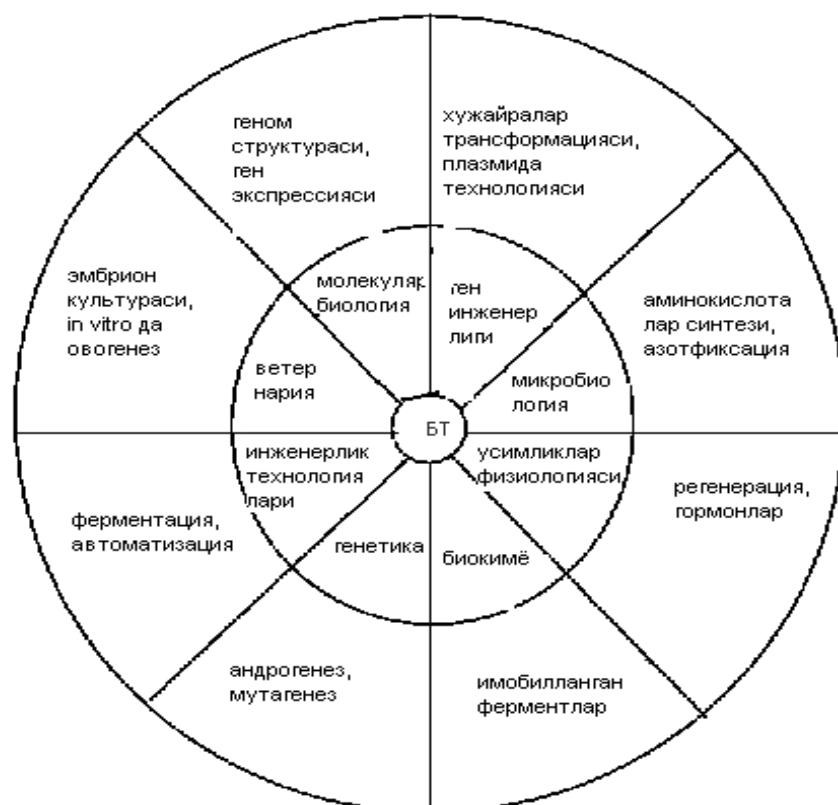
- Керакли маҳсулотлар олиш ёки сервис технологиясини яратиш мақсадида биологик агентлар ёрдамида ишлов бериш учун илмий ва инженерлик принциплардан фойдаланиш.

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

Биотехнология йўналишларининг вазифалари куйидагилардир:

- 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 химоялашнинг биологик воситаларини, бактериал ўғитлар ва ўсимлик ва ҳайвонларнинг ўсиш регуляторларини; нокулай 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 (озуқавий оқсил, аминокислоталар, витаминлар, озуқаларни 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 келаётган 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 Эреки «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 рестрикцион 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 хужайрасидан 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 хужайрадан сут эмизувчи клонлаштирилди

Ўзбекистонда биотехнологияни фан сифатида икки йўналишини кўриш мумкин:

1. Ҳозирги замон биотехнологияси.
2. Классик биотехнология.

Ҳозирги замон биотехнологияси ген ва хужайра 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, катик 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 куйи 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 келадиغان 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 тўқишдаги 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 ачитқи замбуруғларни таҳлил қилиб, уларни новвойчилик, виночилик ва чорвачиликка қўл келадиган турларини олди ва улар асосида махсус хамиртурушлар ва виночилик учун ачитқи 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 озука 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 целлюлозалигнин биокаркасини (ғўзапоя, самон, каноп пояси, қипиқ ва бошқалар, махсус тайёрланган базидиомицетларнинг ферментлари иштирокда табиий целлюлозалигнин 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, мархум 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 йулга қуйилган.

Охирги 20-30 йилда, айниқса микроб оқсиллини олиш технологияси ривожланиб кетди. Қишлоқ хужалиги учун ута зарур булган бу махсулотни ишлаб чиқариш билан бир қаторда ундан унумли ва оқилона фойдаланиш йуллари амалга оширилмоқда. Оқсил 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 булди. 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 булган бошқа мутахассислар амалга оширадилар. Микроб препаратларини ишлаб чиқаришни фаоллаштиришнинг яна бир йули икки ёки ундан ортиқ булган, бириккинчисини фаоллигини ошириб бераоладиган (симбиозда ишлайдиган) микроорганизмлар ассоциациясидан фойдаланишдир. Бу йул ҳозирги вақтда ферментлар, антибиотиклар, витаминлар ва метан газли олишда ҳамда оқова сувларни тозалаш жараёнларида кенг қулланилиб 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 булади ва бу муоммоларни ечишда на фақат микробиологлар, биокимёгарлар, биотехнологлар, балки муҳандислар ва технологлар иштирок этишлари зарур булади.

Бу эса, микроб биотехнологияси фанини яхши узлаштириб олиш учун юқорида эслаб ўтилган фанлардан хабардор булмоқликни тақазо 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.

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 *Фикус* оиласига мансуб ўсимликлардан) ажратиб олинади.

Шу билан бирга ўсимликлардан фермент ажратиб олиш иқтисодий жиҳатдан самарали эмас, чунки сарфланадиган ўсимликка нисбатан олинadиган 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 зардобдаги 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 озуқа 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

озуқа муҳитда ўстирилган культуранинг сувли экстракти хизмат қилади. Фермент препаратлари кукун ёки суюқ концентрат кўринишида олиниши мумкин. Ажратиш жараёнида препаратнинг ймумий 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 суюқ озуқа муҳитида ўстириш йўли билан олиниши мумкин. Суюқ 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 типдаги 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 ишлатиладиган 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 курук микроорганизмлар махсус қоплаш машиналарида 25-40 кг қилиб қопланади ва тайёр маҳсулотлар омборига юборилади.

Кўпчилик продуцентлар синтез қилган ферментларнинг асосий қисмини суюқ озук муҳитига чиқарадилар ва тўплайдилар. Тоза фермент препаратларини продуцентнинг биомассаси билан биргаликда филтрларда, центрифугаларда ёки сепараторларда ажратилади.

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

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

Фермент саноатида кўпинча рамали филтр-пресс ҳам ишлатилади. Маҳсулот кўл ишига асосланган ҳолда олинади. Рамали филтр-прессларнинг филтрловчи ҳажми кичик бўлганлиги сабабли барабанли вакуум-филтрга нисбатан ҳам кам самарадордир. Рамали филтрда филтрлаш жараёни 0,6-0,4 Мпа босим остида олиб борилади. Одатда филтратнинг биринчи қисми тиниқ бўлмайди ва у қайта филтрланади.

Филтр-пресснинг камчиликлари горизонтал камерали типдаги ФПАКМ да бирмунча бартараф этилган. У устма-уст жойлашган филтрловчи плиталар ва филтрловчи 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 филтрлашда жуда кўл 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 соплоти сепараторлари ишлатилади.

Биомассани филтрлаш самараси ишлатаётган ускуна типига, озук муҳит таркибига, ажратилаётган бўлакчалар катта-кичиклигига, эримаган фракциялар микдорига, филтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Филтрлаш 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.) кўшилади. Бу тўлдирувчилар филтрлаш самарасини оширади, лекин фермент фаоллигига салбий таъсир қилади. Олинган биомасса (биошрот) стерилизация қилинади ва қуритилиб чорва молларига ем сифатида ишлатилади. Культурал суюқлик филтрлати 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 ҳўл 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 борида 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 ажратиш 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 суюқ 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 шарти паст ҳароратда қайнатиш ва жараёни қисқа муддатда олиб бориш билан бирга, буғлантирилаётган суюқликни қизиш кетиши ва ферментлар инактивацияга учрашини олдини олишдир. Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутати 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 суюқликни

куюклаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда фаоллигини йўқотади. Куюклаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бирмунча ўзгаради, куруқ модда ҳисобига эса 11-20 %га камаяди ва куюклашган экстрактнинг рН кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентнинг турига қараб уларнинг культурал суюқликлари ҳам ҳар хил кимёвий таркибга ва ферментлар комплексига эга бўлганлиги учун, вакуум-буғлантиришнинг ҳарорат режимлари тадқиқот йўли билан аниқланади.

Фермент фаоллигини куюклаштириш 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, жараёни ўтиш муддатини 10 маротабага 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 қиради.

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, $D\delta$ – диализ коэффиценти, 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); гелфилтрация ($15 \times 10,5$ 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 суюқлик 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 қўшиш 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 бўйсунади:

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

бунда C , C_o - 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 тозалиги 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: $\text{CO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{J}^- > \text{CH}_3\text{S}^-$, 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

оқсилларнинг 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 оқсил бўлса унинг 90%и чўкмага тушиши мумкин, лекин эритмада бор-йўғи 0,1 мг/мл оқсил бўлса ҳеч қандай фермент препаратини олишнинг иложи бўлмайди.

Нейтрал тузлар билан оқсилларни 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. Оқсилларни чўктириш самараси органик эритувчилар таъсирида сувнинг фаоллигини камайиши билан узвий боғлиқдир. Эритувчининг концентрацияси ортиши билан ферментнинг зарядланган гидрофил молекулаларини сув таъсирида солватланиш қобилияти пасаяди. Оқсилнинг гидрофоб қисмидаги сув молекулалари органик эритувчи томонига ўта бошлайди ва натижада ферментнинг эрувчанлиги пасаяди. Оқибатда оқсил молекулалари агрегатланади ва чўкмага тушади.

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

Оқсилларни агрегатланиши жараёни ва чўкма ҳосил бўлиши чўктиришнинг бир қанча омилларига боғлиқдир. Шулардан бири оқсил молекуласининг размеридир. Чўктириш жараёнида оқсил 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 аралашishi 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 истикболлиси 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 химоя 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 камайтиришга 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 $5-10^{\circ}\text{C}$ 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 тушадилар. 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 қаторида 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 камайтиришини 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 куришиб 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.

Оксилларнинг 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 оксилларни ажратиш технологияси қандай типдаги усулда бўлишига қарамай қуйидагиларга асосланади. Фермент маҳсулотини ўз таркибига олган оксиллар аралашмаси маъқул 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 оксил 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 оксиллар электростатик куч ёрдамида боғланадилар, яъни бу ҳодиса зарядланган оксил 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 оксилнинг 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 оксилни ювиш учун аффин усулидан ташқари икки усулдан фойдаланилади. Биринчи усул - буфернинг рН кўрсаткичини маълум даражага ўзгартириш билан ион кучини ошириб,

адсорбент ва оксил ўртасидаги электростатик ўзаро таъсирни камайтиришдир. Бу усул умуман яхши натижа бермайди. Чунки буфер ҳажмини кичик бўлганлиги учун рН кўрсаткичини бирданига ўзгартириш оксил 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 типидagi 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 оксил на адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камаюди. Туз ионлари концентрациясини ошиши билан адсорбентга боғланган оксиллар 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 юборувчи 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 тозаликка 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 крмайди. 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 гель 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 суюқ хроматография услуги қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охириги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

Назрат 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 КИМЁВИЙ УСУЛЛАРИ.

Режа:

1. Имобилланган ферментлар.
2. Имобиллашнинг физик ва кимёвий усуллари.
3. Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.
4. Ташувчиларга қўйиладиган талаблар.
5. Ферментларни физикавий имобиллаш.
6. Ферментларни кимёвий имобиллаш.
7. Имобиллаш жараёнига таъсир этадиган омиллар.
8. Ферментларнинг барқарорлигини ошириш
9. Имобилланган ферментлар хоссаларини ўзгариши
- 10.

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

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

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

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

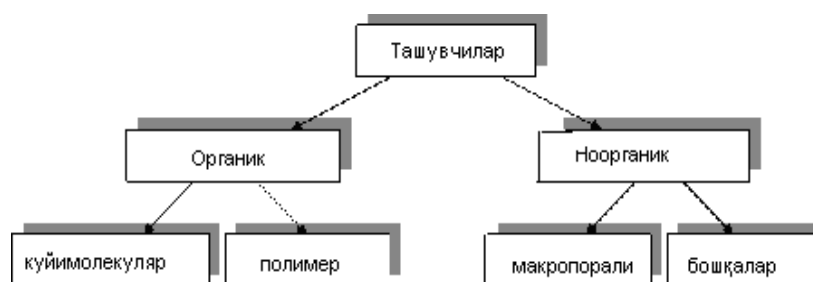
Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

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 1-расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



1-расм

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 полиметиленли, 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 холига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Грануланган 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 "чоклилик" 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.

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 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 ҳужайраларни фазовий турли 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.

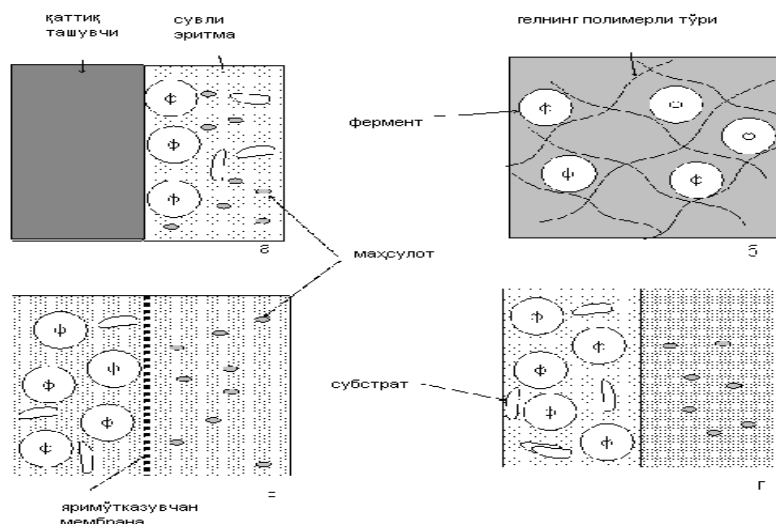
Ферментларни иммобиллаш икки хил метод билан амалга оширилади: физикавий ва кимёвий.

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

- эримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш;

- гелъ 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 иммобилилаш 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 иммобилилашнинг 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 хужайраларини цитодекс гранулаларида адсорбцияланишида хужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг рельефени 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 тўрга (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 типидagi 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. реакция якунлангандан 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 ифлослантормайди. 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.

Охирги 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.

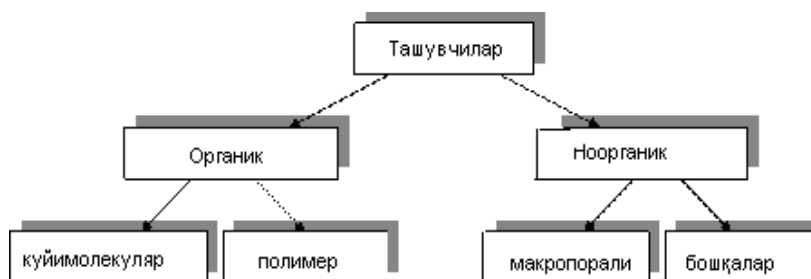
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш еркинлигини исталган чекланишини англатади.

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, солиштира сирти юқори бўлиши;
- технологик жиҳатдан қулай шаклларда олинishi (гранулалар, мембраналар);
- осон активланиши;
- юқори гидрофиллик;
- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



3-расм

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 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 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 холига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Гранулаланган селлюлозани ДЭАЭ-целлюлоза, 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 "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.

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

Синтетик полимер ташувчилар ферментларни ковалент ва сорбционной иммобилашда, гел ва микрокапсулаларни олишда ишлатилади. Сорбцион иммобилашда 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 турли 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 иммобилаш 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.

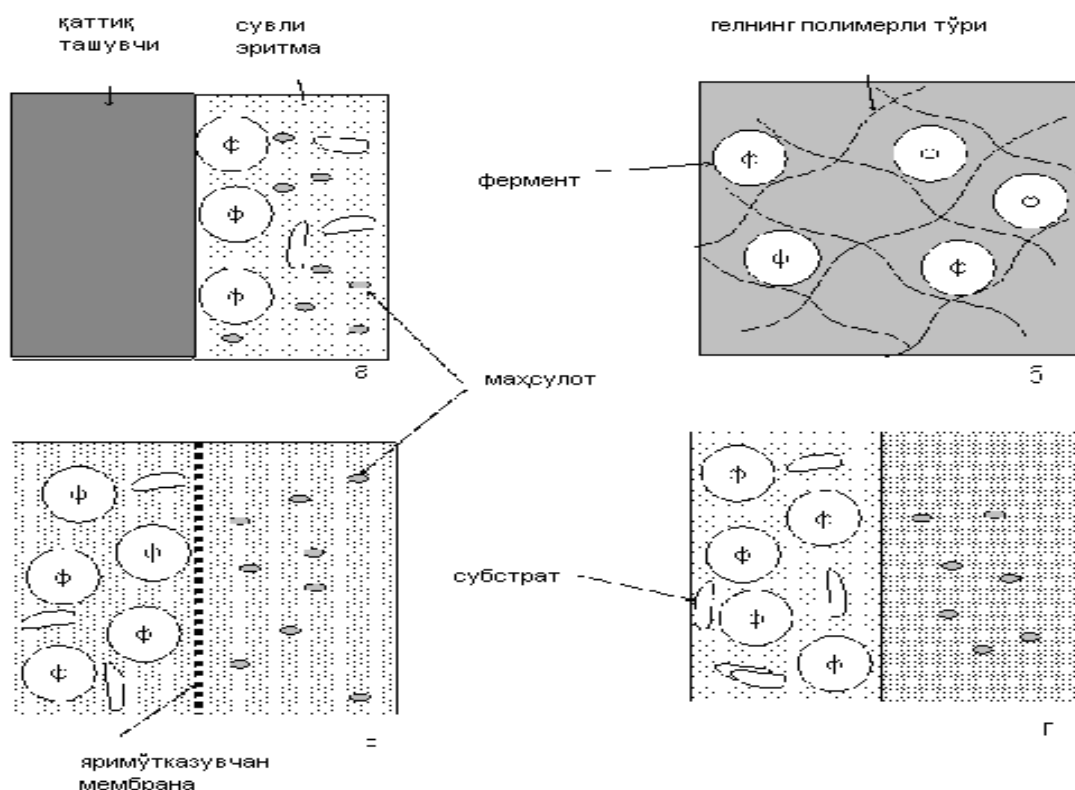
Ферментларни иммобилаш методлари.

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

Ферментларни физикавий иммобилаш – бу ферментни шундай бир муҳитга жойлаштириш бўлиб, бунда фермент умумий хажмнинг бир қисмигина кира олади. Физикавий иммобилашда 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 - яримўтказувчан мембрана ёрдамида ферментни реакцион 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 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 юзаси 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 ҳужайраларини ситодекс грануларида адсорбцияланишида ҳужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг рельефи 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 тўрга (гелга) ўтказишдир. Гелдаги қўшни занжирлар орасидаги ўртача масофа киритилган фермент молекуласининг размеридан кичикдир. Шунинг учун у полимер матрицани тарк 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.

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 pH, 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 борича 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 хужайралар ишлатилиши мумкин. Бир босқичли реакцияларни иккала ҳолатдаги хужайралар амалга ошира оладилар. Полиферментли реакцияларни эса тирик хужайраларни қўллаш билан амалга оширилади, бундай хужайралар узок вақт давомида АТФ ва коферментларни (НАДФ, НАД) ренегенерациялай олиши керак.

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

Кимёвий иммобиллаш 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 узок вақт хаёт 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 хавзаларини 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 университетида аспарагин кислотасини олиш методи яратилган. Полиакриламид гелга киритилган *Э.золи* хужайралари 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 микдорда олиш учун ўсимлик тўқима ва ҳужайраларини иммобиллаш методи ишлаб чиқилган. 1966 йилда Мосбах *Умбилицариа пустулата* 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. цевеисиае*, *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 суюқ 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. Мухит 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 ортттиради.

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 қийинчиликларни физик жиҳатдан ҳаракатсиз ҳужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

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

Иммобилланган ҳужайралардан фойдаланганда керакли маҳсулотларни ажратувчи кимёвий моддалар билан ишлаш мумкин. Айрим ўсимликларнинг, масалан *Сансиум фрутесценс* ўсимлиги ҳужайрасининг культураси иккиламчи метаболитларни атроф-муҳитга ажратади. Иммобилланган ҳужайралар системаси эса культурани зарарламасдан маҳсулотни олиш имконини беради. Демак, ҳужайраларни иммобиллаш идиолитларни осон изоляциялаш имконини беради.

Иммобилланган ҳужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

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

Иккала системада ҳам суяқ муҳит ҳаракатсиз ҳужайралар атрофини циркуляциялайди.

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

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

Олдин амалиётда кенг қўлланган етанол олиш учун ачиткилар бактерия ҳужайраларини 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 ачитки ҳужайралари, еркин ачитки ҳужайраларидан кўп нафас олиш активлигига ега. (В. Вожтисех, В. Йирху, 1984).

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

Химий тикишсиз имобилизасияда 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 мустақкам 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 мустақкамлик қолади. Бу шароитларда дисперсион ўзаро алоқа принципида адсорбсия қулайроқ. Аспарагин кислотасини олиш учун ишлатиладиган аспортиза ферментни хлоробактериум толада идсорбсияланади. (Ҳ. Уамосаҳи. ет. ал., 1986).

Биокатализаторни тутувчи билан мустақкам химиявий тикилишига келадиган бўлсак, бу усул назарий тадқиқотлар билан боғлиқ узун тарихга ега. 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 корбонс гуруҳи орасида пептид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реакциялар қўлланилади. Реаксия учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сульфидрогид, гидрогид ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳосил қилади.

Мисол учун биронсидан ва $\text{Cl}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ гидрооксид ва аминогруҳни тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реакциялар ўтказилади. Бу хилдаги реакциялардан бири тутувчининг химиявий структурасида $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реакцияларни амалга ошириш учун сиқинлашган материалларга малеин ангидрид тутувчи қўшимча структуралар қўшилади. Шу усул билан буқани сывородка албумини глюноксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус стеротхермофилус хужайраси омадди имобилизасияланади.

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

Биокатализаторнинг тутувчига химиявий бириктиш йўли билан имобилизасияси юқори эффективлиги билан ажралиб туради. Имобилизасияни фермент активлигига таъсири турлича ва фермент структурасини 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 галатозилтрансдхжаз имобилизасиясидан 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 гуруҳига оксидлайди. Бу еса тутувчини аминогруҳи билан реакцияга киришадия (Ж. Кас ет ал., 1984).

Тикувчи агенциз қўлланиладиган асосий ҳол сифатида хужайраларни полимер серканигидрооксиди титан, олова ва темир тутувчиларда имобилизасияланади. (В. Вождисех, 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 системаси амалий фаолиятнинг ҳар хил соҳаларида кенг қўлланилади. Бу озик - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа

саноат соҳаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органик синтез, кимиёвий таҳлил ва хзо. Шунга қарамасдан амалий энзимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жаҳон 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 чидамсиз. 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 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 мустаҳкам 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 кенг тушуниш керак: бу оксил молекуласининг (ёки унинг фрагментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. еримайдиган ташувчига бириктиришдан ташқари бунинг оксил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки молекулалар ўртасидаги боғлар қуйи молекуляр бифункционал реагентлар ёки ферментни ерувчи полимерга бириктириб еришиш мумкин.

Иммобилизацияланган ферментлар бир катор афзалликларга эга. Биринчидан, гетероген катализатор реакция муҳитидан осон ажралади бу еса :а) реакцияни керакли вақтда тўхтатиш имконини беради ; б) катализатордан қайта фойдаланиш; в) фермент аралашмаган маҳсулот олиш мумкин. Охиргиси айниқса озиқ-овқат ва ферментадига 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 еришиш мумкин.

Учинчидан: ферментнинг иммобилизация ва модификацияси катализатор хусусиятини мақсадга мувофиқ ўзгаришига олиб келади каталитик активлигининг pHга, ион таркибига ва муҳитининг бошқа параметрларига боғлиқлиги, унинг ҳар хил денатурацияловчи 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 датчиклар, паст

Хилма-хил ичимликлар тайёрлашда биотехнологик усуллардан фойдаланиш тобора ошиб бормоқда. 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 миқдorigа қараб еса – концентранган, дистилланган ва концентранмаган гуруҳларга бўлиш мумкин. Ферментация жараёни (бижғиш) нафақат спирт ҳосил бўлишини ўз ичига олади. Бу жараёнда ачитқи замбуруғларнинг метаболлик

имкониятларидан келиб чиққан ҳолда ачиётган муҳитда катор бирикмаларнинг кетма-кет ўзгариб туришларини кузатиш мумкин.

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

Кўпчилик алкоғолли ичимликлар бошқоқли ўсимликларнинг уруғини ёки бошқа крахмал сақловчи маҳсулотларни қайта ишлаш орқали тайёрланади. Россия, Голландия, Олмония, Полша, Скандинавия мамлакатлари ва бошқа кўпгина мамлакатларда пиво ва бошқа бақувват ичимликларни бошқоқлардан тайёрлаш анъанага айланган. Европанинг жанубий мамлакатлари: Испания, Италия, Франция, Греция, 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.

Алкоғолли ичимликларни одатдан ташқари кўп хилда чиқаришнинг бир неча сабаблари бор. Бундай сабаблардан асосийси ичимлик чиқараётган мамлакатнинг иқлим шароити билан боғлиқ. Осиё мамлакатларида алкоғолли 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.

Алкоғолли ичимликларни ишлаб чиқариш ва сотиш, ўрта асрларданок 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, алкоғолли ичимликлар тайёрлашда ягона халқаро назорат тизимини ташкил қилиш имконияти яратилгани йўқ.

Алкоғолли 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 яроқсиз ҳисобланади ва шунинг учун ҳам улар фақатгина техник мақсадлар учун спирт олишга ишлатилади.

Субстратларга тегишли ишлов берилгандан кейин (полисахаридлар парчалангандан сўнг), шакар еритмасига ачитқи 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 моносакхаридларни – глюкоза, фруктоза, галактоза; ва дисахаридларни – сахароза, малтозани етил спиртигача бижғитиб берадилар.

Сахаромисетлар бошқа авлодга мансуб бўлган ачитқи замбуруғларига нисбатан етил спиртига чидамли еканлиги аниқланган. Бижғиш жараёни тугаганда аралашмада 14-16% гача етил спирти тўпланади. Бижғиб турган муҳитда етил спиртининг бу миқдори ачитқи 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 циклниң кейинги босқичи – бу дистилляциядир. Бу жараён ва унда ишлатиладиган асбоб ускуналар илмий ва техникавий адабиётларда кенг ёритилган.

Дистилляция – бу этил спиртни концентрасия қилиш ва унинг тоза фракциясини ажратишдир. Мана шу босқич кенг маънода алкоғолли ичимликларнинг сифатини белгилаб беради.

Баъзи бир ҳолларда тайёр маҳсулотнинг органолептик сифатларини тузатиш мақсадида, этил спиртниң 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 концентрланган) ичимликлар келтирилган.

Ферментланган, дистилланмаган алкоғолли ва алкоғолсиз 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	Коняк (бренди)
Маккажўхори, жавдар	Бурбон, виски
Картошка, буғдой, жавдар	Ароқ
Арпа	Виски
Арпа, картошка	Акватит

Нок	Нок брендис
Шоли	Хитой брендис

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 кристалли солиниб аралаштирилади. Крахмални аниқлаш учун аралашма 5 марта суюлтирилади.

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



Бу иккала фермент учун ҳам pH-оптимум кўрсаткичлари жуда яқин, яъни сўлак амилазаси учун pH – 6,8 бўлса, соя уреазаси учун pH – 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 колбага ўтказилади ва воронкага филтр жойлаштирилиб бошқа идишга филтрланади ҳамда дистилланган сув ёрдамида 10 марта суюлтирилади.

Соя уруғидан уреаз ферменти экстрактини ажратиб олиш. Қуруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва кўп қарра петролей ефири билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози устида қуритилади ва унга 5 °C да беш ҳажм бирлигида дистилланган сув қўшилади. Аралашма центрифугаланади ва ҳосил бўлган центрифугатнинг таркиби айнан уреаз 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 уреаз ферменти экстракти солинади. Аралашмалар яхшилаб аралаштирилади ва 20 минутга 38-40 °C ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади. Қиздириш ниҳоясига етгандан сўнг 1- ва 2-пробиркаларга ёд еритмасидан бир томчи томизизади. Бунда 1-пробиркадаги аралашманинг кўк ранги йўқолади, чунки крахмалга сўлак амилазаси таъсир етиши туфайли у парчаланган бўлади, 2-пробиркага еса уреаз 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 уреаз 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 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 миқдорда қайнатиб совитилган сўлак еритмаси солинади.

Уччала пробирка ҳам 20-25 минутга 37 °С ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан шиқарилиб, 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 °С 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, 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 pH кўрсаткичи 6,8 бўлган фосфат-цитрат 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 °С 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 амилолитик парчаланишнинг ниҳояси ҳисобланади. Тажриба натижалари егри чизик орқали ифодаланиб, бунда абсцисса ўқига амилазанинг нисбий концентрацияси, ордината ўқига еса унга тегишли бўлган вақт бирлиги жойлаштирилади. Амилолитик реакция туфайли крахмалнинг парчаланиши учун сарфланган вақт реакция тезлигига тескари пропорционал бўлади.

Сўлак амилазаси фаоллигига фаолловчилар ва ингибирловчиларнинг 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 ингибирловчи 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 суюқлик бинафша ёки қизил рангга, иккинчиси қизил ёки сарик, учинчиси еса кўк рангга киради. Демак, иккинчи пробиркада крахмал яхшироқ гидролизланган, учинчисига 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	Реакцион 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 узоқ 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 ($-\text{NH}_2$; $-\text{COOH}$ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатҳида чўқади.

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, икинчисига 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 ҳужайраларини ситодекс гранулаларига адсорбция қилинганда ҳужайра девори деформасияга учрагани кузатилган.

Ферментлар адсорбциясига таъсир етувчи омиллар

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

Фермент адсорбциясига таъсир етувчи омилларга қуйидагилар кирази: ташувчини ғоваклиги ва сиртини фаоллигидир.

Ташувчини сорбция 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 сорбция 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 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 адсорбцион имкониятлари максимум бўлишини тажрибалардан исботлаб берди.

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

Субстрат молекуласининг ҳажми ферментникдан 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.

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, имобиллаш, 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 -гўштни 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. Стеаротхермопхиллис 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 пишлоқлар ишлаб чиқариш ётади. Сир тайёрлашда ишлатиладиган ферментлар “сизжуг 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 рационида 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 тўхтайди, 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 травмаси, нефроз, аллергия ва бошқа касалликларда калликреин-кинин системаси 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 қиради. 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 қулоқнинг 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, шапкўрлик 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 тенгдошларилан орқада қолади ва унда психиканинг ва интелектнинг бузилиши кузатилади. Сийдикда фенилпируват ҳисобига ўзига хос сичқон хид бўлади. Болалар сочи малла териси оқиш, 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 беzi соки, орқа мия суюқлиги, сийдик ва б.) фермент ва изоферментлар активлигини аниқлашнинг замонавий ферментатив диагностик тестлари яратиш билан шуғулланади.

- Изланишлар икки йўналишда олиб борилади.

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

- иккинчиси, биомуҳитларда ферментлар активлигини аниқлаш методларини мукаммаллаштириш 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 ҳосдир.

• 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 (инсульт, ИБС, инфаркт миокардда) протеолитик ферментлардан фойдаланилади: фибринолизин, бриназа, бринолаза (актиномицетлардан), стрептокиназа ва урокиназа.

- Зарarli 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.

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, изомеразалар

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, ҳужайрадаги ахборот оқимини матрица синтезининг реакциялари амалга оширади, яъни, **ДНК репликацияси** (ирсий ахборотни киз ҳужайраларга узатиш учун керак), **транскрипция** (ҳужайра 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 ҳужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан овальбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информатив РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотиддан 1158 тасигина оқсилнинг 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 плазмидага жойлаштирганлар ва уни *Э. coli* ҳужайрасида 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 информатив РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлуқли 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, қушлар 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 ҳужайралар ядросида кўпаядиган вирусларда топилган.

Транспозонлар

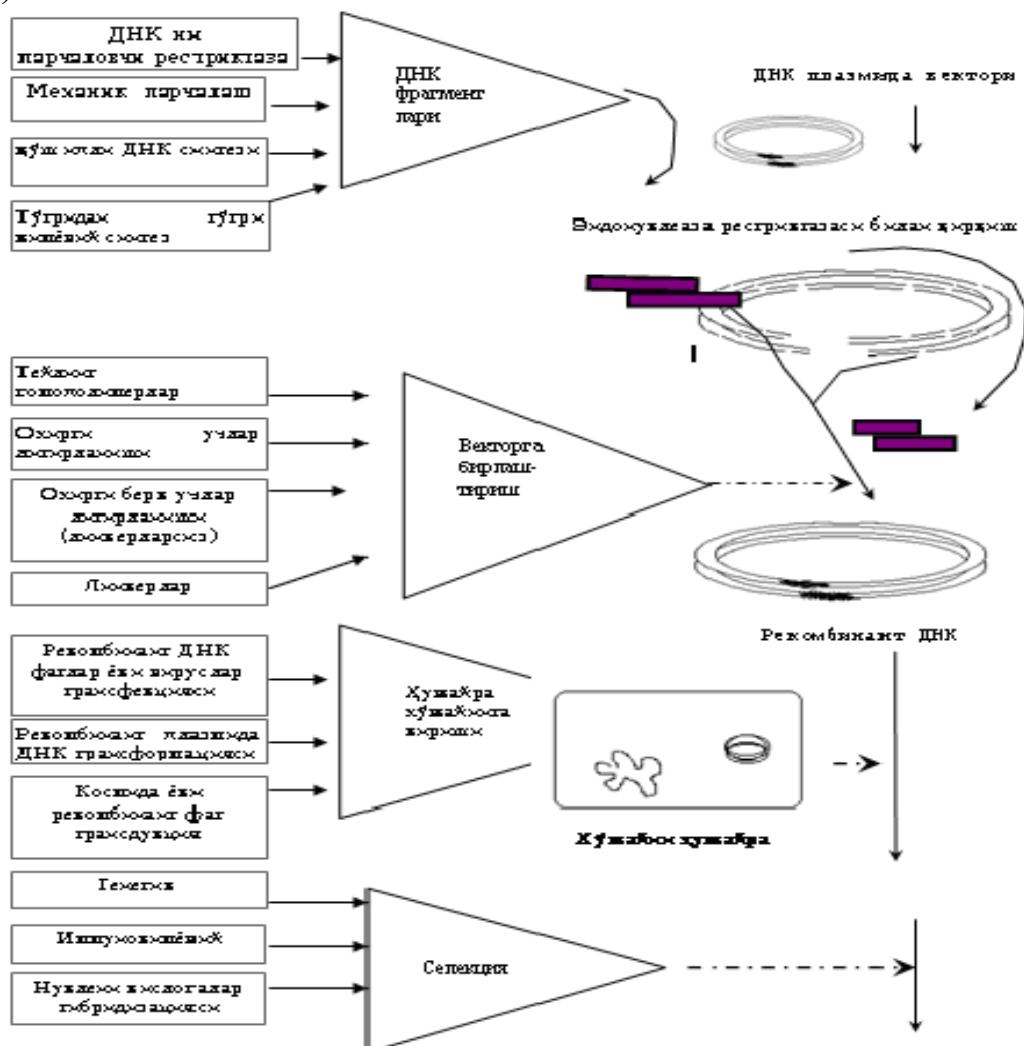
Транспозонларнинг кашф этилиши генетик муҳандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди.

Кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонларни ўсимлик организмида АҚШ олимаси Барбара Мак Клинтон, микроорганизмларда АҚШ олими Ахмад Бухорий ва хашаротларда 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 бўлақларини боғловчи фермент лигаза таъсирида ўзаро боғланади. Транспозонларнинг хужайра 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 хужайрали, ядроси мукаммал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномицетлар, риккецийлар ва тубан еукариотлар (бир ва кўп хужайрали, ядроси мукаммал, хромосомалари махсус липопроteid табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитки ва мицелиал замбуруғлар, енг содда жониворлар ва сув ўтлари ҳамда уларни ҳар хил усуллар (селекция, мутагенез, хужайра 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 холос.

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

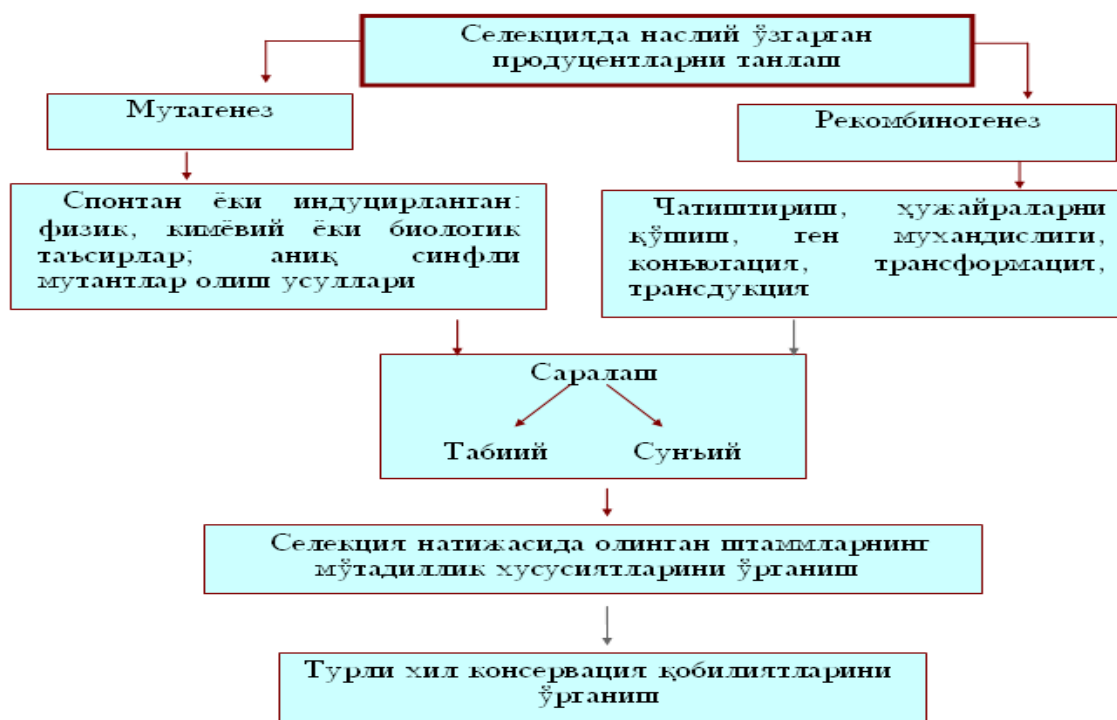
- ✓ *ўсиш тезлигининг баландлиги,*
- ✓ *арзон озиқа муҳитида ўсиши,*
- ✓ *бошқа микрофлорага ва фагга чидамлилиги,*
- ✓ *юқори ҳосилдорлиги.*

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 антибиотики синтез қиладиган продуцентнинг фаоллиги дастлабки штаммларга қараганда 10 минг маротабадан ошиб кетган.

Юқори фаолликга ёки ҳосилдорликка 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).

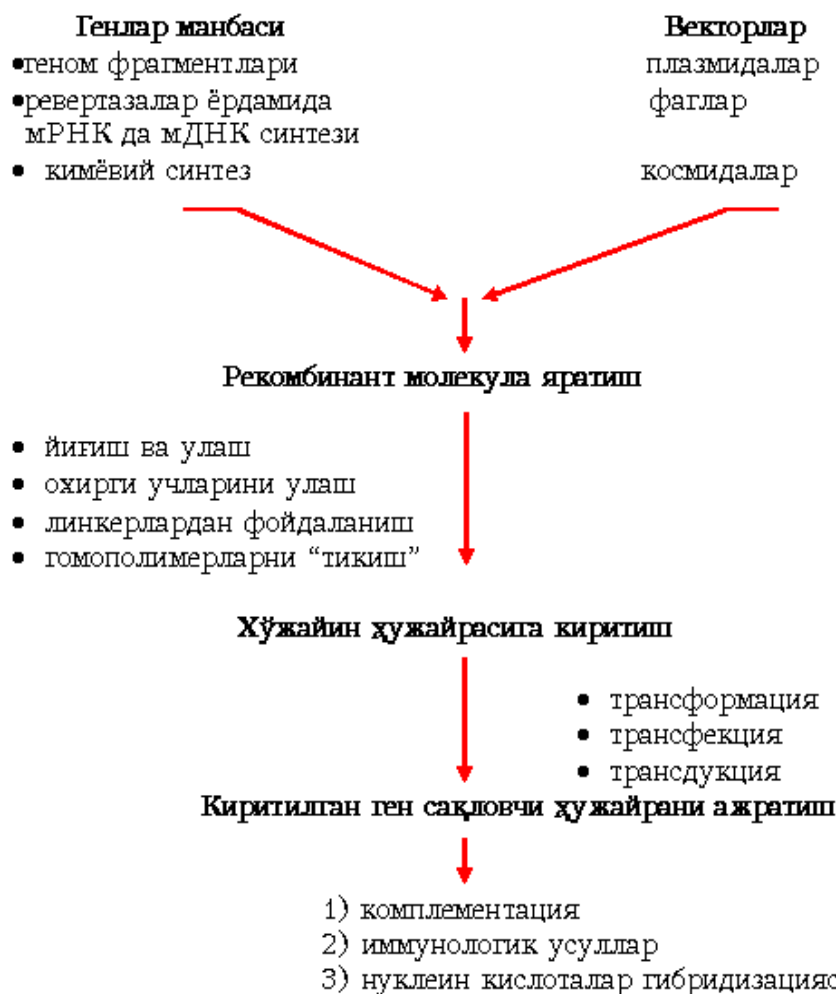


8-расм. Микроорганизмлар селекцияси

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 емас, 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).



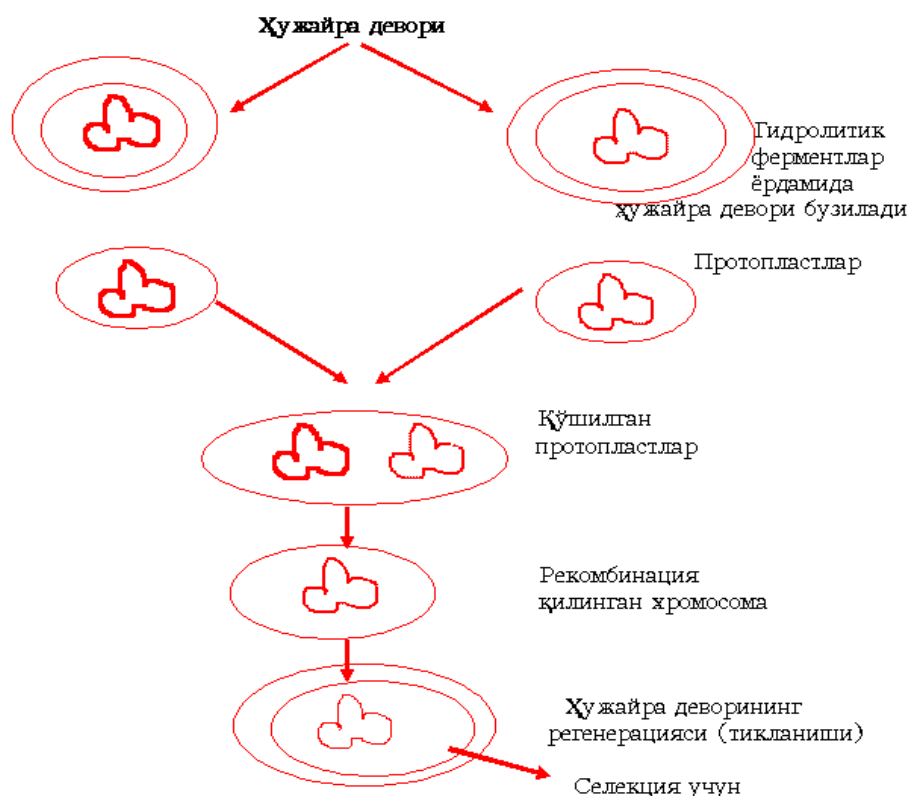
9-расм. Генларни клонлаш стратегияси

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.

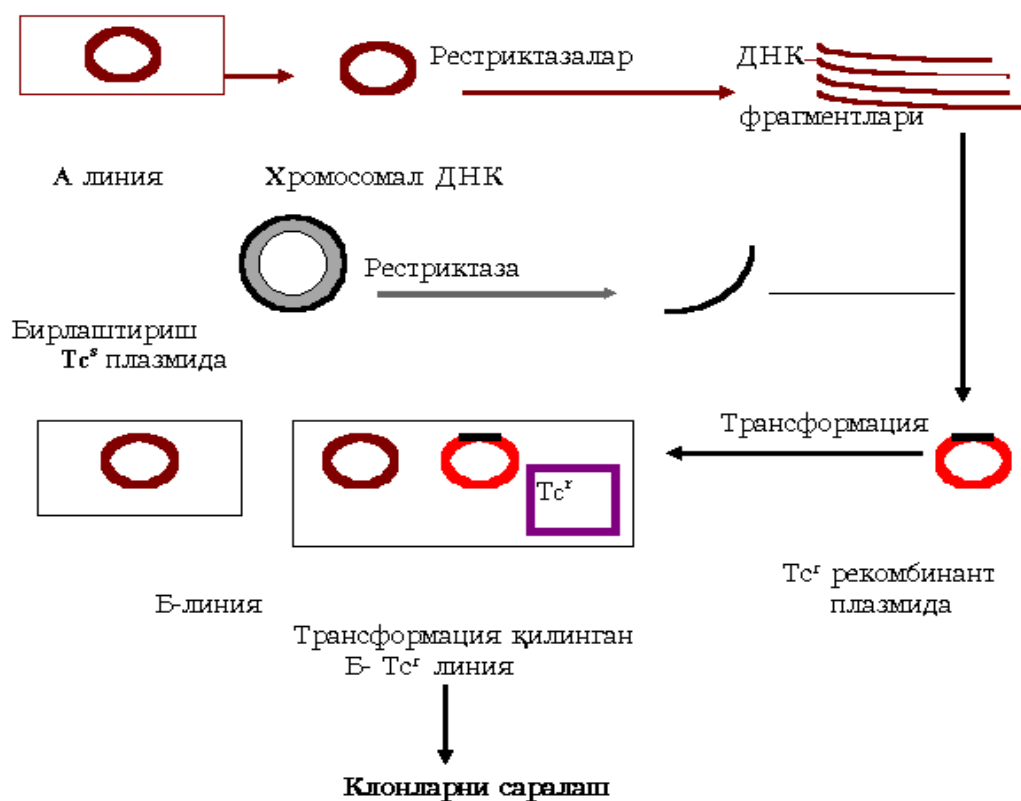
Протопластларни қўшилиши орқали табиий шароитда бир-бирлари билан қўшилмайдиган микроорганизмларни генетик материалларини бирлаштириш ҳам мумкин.

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-расм. Плазмида ДНК си ва бактерия хужайрасидан фойдаланиб, генни 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 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 (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 олинадиган 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 шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараённи асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ емас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оқсил моддаларини керакли меъёрда ушлаб туриш, уларни модификацияга учраб, микроорганизм ҳужайрасида парчаланиб кетмаслиги учун шароит яратиш билан ҳам узвий боғлиқдир.

БИОТЭХНОЛОГИЯДА 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 кўламда қўлланилаётган биотехнология фанини замонавий кўринишларидан бири бўлган ген муҳандислиги усуллари мукамал егаллашилари ва амалиётга тадбиқ эта олишлари лозим.

Биотехнологияда ген муҳандислиги соҳасини ўрганишдан мақсад, тирик организмлар ирсий белгилари ҳақидаги ахборот жойлашган ДНК молекуласининг тузилиши ва роли, ген молекуляр биологияси; генетик муҳандисликнинг 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 чорвачиликда 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 кидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.
 - б. Ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, траспозон ёки плазмид ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.
 - с. Вектор конструкция трансформация усули билан ҳужайрага киритилади ва трансген ҳужайра олинади.

Трансген ҳужайрадан сунъий равишда етук ўсимлик ўстирилади. Ушбу усулдан фойдаланиб ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар ҳужайраларидан 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.

Ҳужайра мухандислиги усуллари билан фойдаланиб, тирик организмлардан гибрид ҳужайралар 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 тўплamlаридан 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 тартибида ОИТС (СПИД) га қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

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

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

1. ДНК, РНК ва оксил молекулаларининг биосинтези.

ДНК репликацияси.

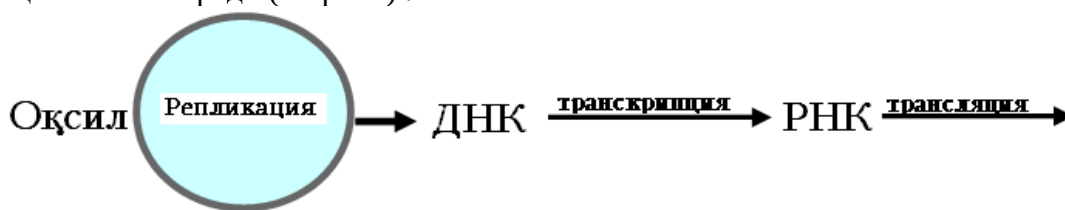
Тирик организмда олдиндан мавжуд қолип асосида янги ДНК молекуласининг яратилиши нуклеин кислоталарининг синтезланиш йўлидир. Мавжуд ДНК молекуласидан нусха олиш репликация деб аталади.

Репликация жараёни ДНК-полимераза И, ИИ, ИИИ, 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 ИИИ ферменти ДНК нинг 3' учидан 5' учигача ДНКнинг битта занжирини тўла синтез қилиш қобилиятига ега. ДНК синтези фақат ДНК нинг 3' учидан 5' учига қараб бориши туфайли ДНК нинг иккинчи занжири праймаза, ДНК-полимераза И ва ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида амалга ошади.

Праймаза (ревертаза) ферменти ёрдамида ДНК нинг иккинчи занжири синтези учун праймер синтез қилинади ва ДНК-полимераза ИИИ ферменти ёрдамида праймер нуклеотидлар кетма-кетлигидан ДНК синтези бошланади ва ДНК-полимераза И 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 И, ИИ, ИИИ) ферментлари ёрдамида амалга оширилади. пРНК синтези РНК-полимераза И ферменти, иРНК РНК-полимераза ИИ ферменти ва тРНК ҳамда кичик ўлчамли ядро РНК си молекулалари РНК-полимераза ИИИ ферменти ёрдамида амалга оширилади. Ҳамма РНК молекулалари синтези учун ДНК нинг битта ипи матрица вазифасини ўтайди.

Оқсил синтези рибосомаларда ўтади. Рибосома ҳужайра 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 қўчирилади. 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 эмас. Бунда ҳосил бўладиган комбинациялар сони $64 \cdot 4^3$, кодланадиган аминокислоталар сонидан анча кўп, лекин маълум бўлдики 20 та аминокислотадан 18 таси биттадан ортқ 2, 3, 4, ва 6 кодон билан кодлана олар экан. Бундан ташқари, учта кодон УАА, УАГ, УГС аминокислоталарни кодламайди ва полипептид занжирининг тугаганидан дарак беради, улар терминаторлар «тугатувчилар» деб аталади. Полирибосомаларда оқсил синтези иРНКнинг 5ъ охиридан бошланиб 3ъ 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 ҳўжалик аҳамияти юқори бўлган мутант формалари халқ ҳўжалигида кенг кўламда 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	Эсчеричиа поли	Лизин, метионин, изолейцин	Глюкоза	20
Л-орнитин	Сорйнеобацтериум глутамицум	Аргинин	Глюкоза	26
Л-фенил-аланин	Артхробацтер парафинеус	Тирозин	Ҳ-алканлар	15

Л-тирозин	Сорйнебацтериум 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 ҳужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидлар ва мўтадил фагларнинг ҳужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар қўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия ҳужайрасига кўчириб ўтказадиган ситема -плазмидлар 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 оқсилларни, 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	Ўлчам, минг нуклеотидлар
клонлаш учун плазмид векторлари: пБР 322	40-50	4,4
пАСУ 184	~20	4,0
клонлашда махсус катталиқдаги векторлар: л Чрон 4А	100-200	41,8
космида пҲС 79	~20	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 ҳужайрага 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 ҳужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатиладган клонирлаш техникасининг молекулаларига мослаштирилган варианты 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.

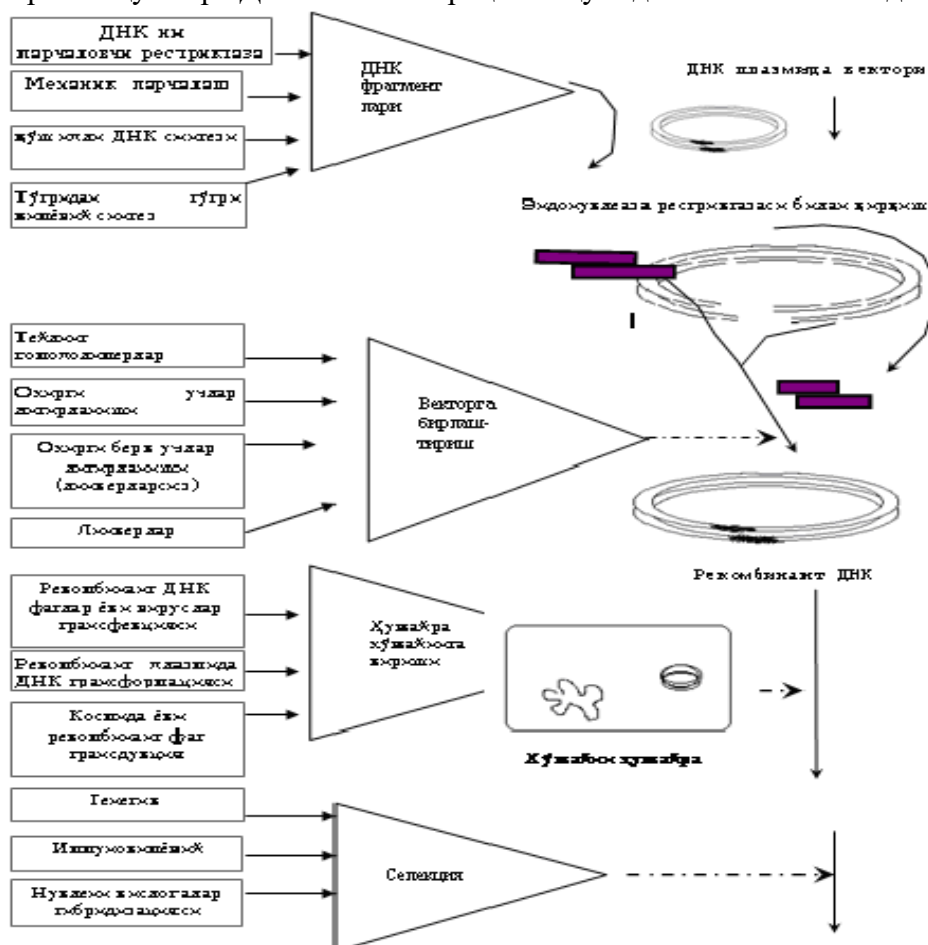
2.1. Транспозонлар

Транспозонларнинг кашф етилиши генетик мухандисликнинг ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлди.

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

Кўчиб юривчи 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 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 айна пайтда транспозон учларига қовуштиради. Ҳосил бўлган хромосома ДНКси ва транспозон ДНКсидан иборат қовушма хужайра ДНК бўлакларини 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 юривчи генетик элементлар иштирокида ген мухандислигига асосланган кўпгина биотехнологик жараёнлар яратилган.

Ген мухандислигида қўлланиладиган плазмид ва фаг векторлар, рестриктазалар

Бактерия ва тубан эукариот организмлар ҳужайраларида 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, ачитқи 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 ҳужайра 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. Ҳужайра бўлингanda 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 бўлингanda қиз ҳужайралар орасида тасодифий равишда тақсимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир ҳужайрадан иккинчисига ҳужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади.

Табиатда бирор микроорганизм ҳужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол ҳужайра 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 I, Дра I, Ҳае IIII, Ҳпа I, ЭцоR B, Ҳинц III, Пву III, Рса I, Сца I, Сма I 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 I, Бам ҲI, ЭцоRI, Ҳинд IIII ва бошқалар). Бу рестриктазалар функцияси жиҳатдан транспозазага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқоқ" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлақларини бир - бирига боғлаш осонлашади. Ана шу хусусияти туфайли бу хил рестриктазалар ген мухандислигида 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 бўйаш 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 РИ	Эшеричия цоли РИ	-Г-А-А-Т-Т-С- -С-Т-Т-А-А-Г-
Ҳинд III	Ҳаемотропхилус инфлуензае	-А-А-Г-С-Т-Т- -Т-Т-С-Г-А-А-
Сал I	Стрептомицес албус	-Г-Т-С-Г-А-С- -С-А-Г-С-Т-Г-
Бам I	Бациллус амиллоликүефациенс	-Г-Г-А-Т-С-С- -С-С-Т-А-Г-Г-
Ҳпа III	Ҳаемотропхилус параинфлуензае	-С-С-Г-Г- -Г-Г-С-С-
Алу I	Артрохобактер лүтеус	-А-Г-С-Т- -Т-С-Г-Т-
Ҳаемотропхилус III	Ҳаемотропхилус 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 ғовакларида 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. Рестрикция эндонуклеаза ферментларининг очилиши ва электрофорез мосламасида ДНК бўлакларини ўта аниқлик билан бир-биридан ажратишнинг такомиллашуви гигант ДНК молекуласидан исталган ДНК бўлагини ажратиш олиш имконини беради.

Хулоса қилиб айтганимизда ген муҳандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформация ва трансдукция жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестрикция 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 ЭцoРИ 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 II ферменти ёрдамида тулдирилади.

Рестриктаза-лигаза усули енг 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 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 жараёндр. 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 эндонуклеазалар 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 таёкчаси хужайраларига ҳайвон ва одам генлари киритилиб, улар репликацияланишига эришиш 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 цитоплазмага ташиydi, (бунда улар оксиллар трансляцияси учун ишлатилади). Бактерия ҳужайраларида эса 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 эга. 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:

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

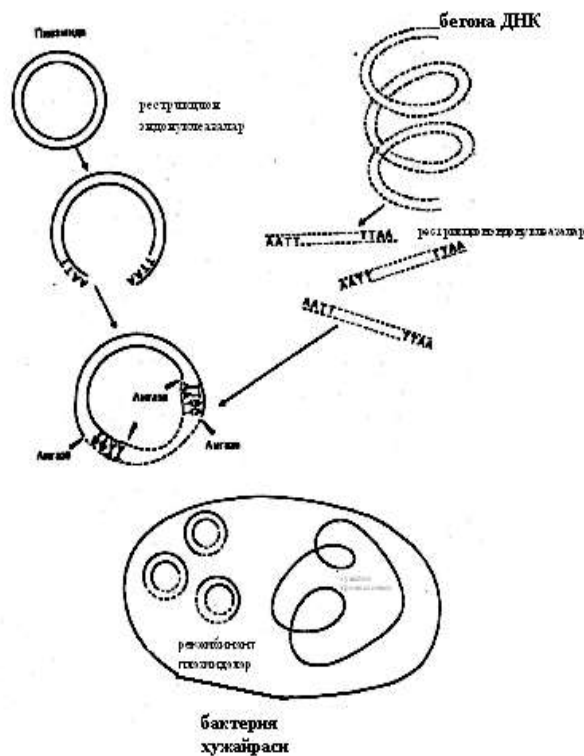
1950 йилнинг бошларида Ледерберг *Э.коли* да конъюгация жараёни рўй беришини кўрсатиб бергандан сўнг бактерия ҳужайраларининг “қўшилиши” генетик белгиланган ва бу генетик информация ота типидagi ҳужайрадан она типидagi ҳужайрага ёки реципиент ҳужайрага ўтиши аниқланган. Конъюгация пайтида ҳужайраларнинг 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 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 плазмида 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.колининг* Р-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 характерини аниқлаш учун туртки бўлди.

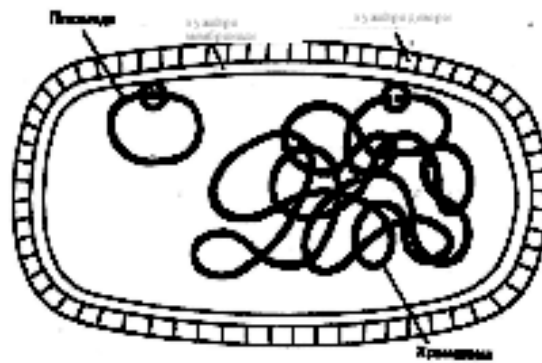
Ҳужайрада плазмидалар сони 1 ва 100 ортиқ бўлиши мумкин, плазмида қанчалик катта бўлса, унинг ҳужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



14-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия ҳужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактериялараро плазмидалар алмашилиши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазмидадаги генларнинг ўзаро алмашинувиغا олиб келади. Натижада реципиент ҳужайралар донор ҳужайралар 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 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 эгаллайди. Инсон хужайраси ДНКси 46 та хромосомада тузилган, уларнинг ҳар бирининг узунлиги тахминан 4 см, нуклеотидлар сони эса 3 млрдга яқиндир. Рестрикцион 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 оксил (масалан, инсулин) ишлаб чиқарадиган махсус хужайрасидан 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 хужайраларнинг

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 соматостатинни антагонисти) ҳам олина бошланган. Гилберт ва унинг шогирдлари инсулин мРНКсини каламуш ошқозон ости безидаги β -хужайрасининг ўсмаларидан ажратиб олишган. Бунинг учун мРНКнинг ДНКнусхасини рБР322 Э.цоли плазмидасига геннинг ўрта қисмига пенициллиназа жойлаштирилади. Ҳосил бўлган ДНКнинг кетма-кетлиги аниқланганда, унинг рекомбинант плазмидаси проинсулин структура тўғрисидаги ахборотга эгаллиги маълум бўлган. Ичак таёқчаси хужайраларида 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 пакуналик 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 хужайраларида 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 рестрикция эндоуклеазалар 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. Олиннадиган гормон миқдори 1 мл культурага 2,4 мкг тўғри келади. Бактерияларда синтезланган гормон керакли молекуляр массага эга бўлади ва бошқа бактериал оқсиллардан холи бўлади.

Қон хужайралари ва фибриобластларда интерфероннинг ҳосил бўлиши. Культураларда ўстирилиувчи ва интерферон ҳосил қилувчи хужайраларнинг барча типи учун интерферон олиш жараёни деярли бир хил. Хужайралар Сендай вируси билан зарарлантирилади ва 24 соатдан сўнг

центрифугаланади: чўкма усти суюқлигидан интерфероннинг “дағал” препарати олинади ва тозаланеди. 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 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.

Ген муҳандислигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

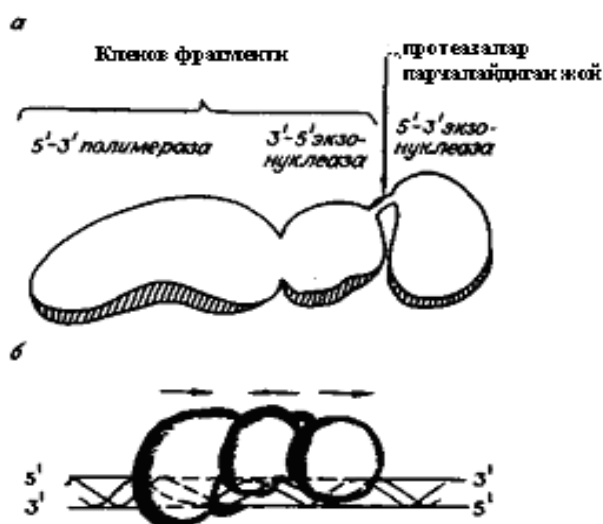
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

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 Вилькокс *Хаеомпхилус инфлуензае* 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 фаолликка 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

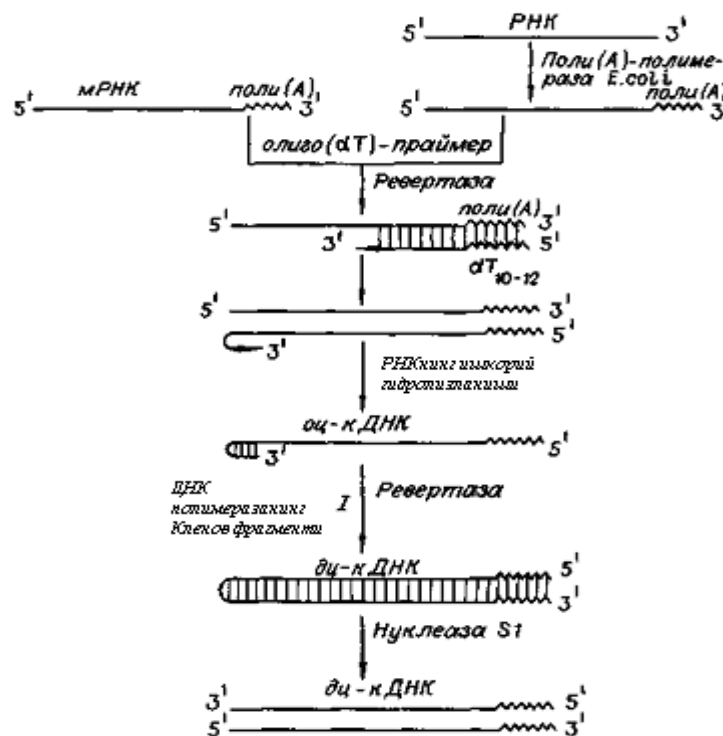
учун ген инженериясида асосан 2- синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

Ҳозирга келиб 500 дан ортиқ 2- синф рестриктазалари ажратиб олинган. Шунга карамай 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), Зъ-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. coli* нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид, T4- 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 спесификликка 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 ачитқи ва бир хужайрали сувўтлардан ҳам ажратиб олинади. Рестриктазаларнинг номенклатураси 1973 йилда С.Симит ва Д.Натанслар томонидан тақлиф этилган.

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 эди. 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, *Эшеричиа Столи-ЭцoPII*, *ЭцoPB*, *Ҳаеmофилус инфлуензае -Ҳинф II*, *Стрептомйцес албус - Сал II*, *Тхермус ақуатишус - Тақ II*.

Рестриктаза ферментларининг табиий функцияси бактерияни ёд ДНК молекуласидан ҳимоя қилиш (авалам бор хужайра ичига кириб унда трансформация чақирувчи 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 етади. 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 энг 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 марта Э.цолли хужайрасидан 1958 йилда А.Корнберг ва унинг ҳамкасблари томонидан ДНК – полимераза И ажратиб олинган. Бу фермент малекуляр оғирлиги 110 мингта 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 занжинини 5' -3' йўналишида узайтириш хусусиятига эга. ДНК полимеразанинг бу хусусияти ген муҳандислигида иккинчи комплементар занжини 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. Табiiй 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 занжинини 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 реаксияларини 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, *mРНК* 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 (C1 нуклеазаси) ёки қўш занжирли (экзонуклеаза ИИИ) ДНК молекулалари, ёки гибрид ДНК-РНК молекулари (рибонуклеаза X) 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 эга. 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 эга 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 аҳамиётга эга. 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 ³²P 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 Нацл еритмасида еса фақат ситозин асослари парчаланаяди. ДНК бўлакларини бир неча жойидан шикастлантириш учун реаксияни амалга ошириш шароитини

танлаб олиш муҳимдир. Шикастланган молекулаларга пиперидин билан ишлов берилганда ДНК нинг узилиши айнан азотли асос шикастланган жойда ҳосил бўлади.

Натижада нишонланган бўлақлар тўплами олиниб, уларнинг узунлиги шикастланган асосдан то молекуланинг охиригача бўлган масофада аниқланади. Тўрттала реакция натижасида ҳосил бўлган бўлақларни денатурацияловчи шароитда акриламид гелида тўртта қўшни йўлакчаларга қуйиб чиқилади. Шундан сўнг радиоавтография амалга оширилади, натижада радиоактив нишонга ега бўлақлар 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, *pBR322* плазмидаси ва бошқа кўплаб организмлар ДНК си нуклеотидлари кетма-кетлигини тўлиқ аниқлашга муваффақ бўлинган. Бироқ Максам-Гилберт усули муолажаларининг сезиларли даражада қийинлиги ва узоқ давом этиши билан боғлиқ бир қатор камчиликларга ега. Ҳозирги вақтда кимёвий деградация ёрдамида секвенирлаш асосида нуклеотид кетма-кетликларни тез ва мукаммал 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 яқка занжиридан матрикс сифатида фойдаланиб комплиментар иккинчи занжирни синтезловчи ДНК – полимераза И дан фойдаланган.

Репликасияни тўхтатишга сабаб бўладиган терминация агентлари дидезокситрифосфатлар (дд АТП, ддГТП, ддТТП, ддСТП) ҳисобланади. Мазкур модификация қилинган азотли асослар кейинги дезоксирибонуклеотид билан фосфодиефир 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 И синтезини давом еттирадиган ҳамда ДНК полимераза И 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 И дидезоксинуклеотидни бириктириб оладиган жойда терминацияланади. Дидезоксинуклеотид реакция аралашмасига қўшилган бўлиб, битта пробиркадаги синтез комплементар занжирнинг ддАТП билан боғланиши ҳисобига, иккинчисида

ддГТП ҳисобига узилади ва ҳ.к. Занжир узилиши тасодифий нуқталарда амалга ошириш 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 бўлақларнинг 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 оксил аминокислоталари кетма-кетлигини аниқлаш мумкин. Илгари оксил таркибини аниқлаш учун ажратиб олинган ва тозаланган оксилнинг ўта мураккаб ва кўп меҳнат сарфланадиган таҳлилини ўтказиш талаб этилар еди. Кўпинча нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш орқали оксилнинг структурасини аниқлаш, оксилнинг ўзини тўғридан-тўғри сқквиенрлашга 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 бўлақларга

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 кўзгатувчи 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 эканлиги иккинчи маротаба 1952 йили А.Херши ва М.Чейз бактериофаглар устида ўтказган тажрибасида исботланди. Улар Н.Зиндер, Дж.Ледерблар билан бир вақтда трансдуксия ҳодисасини кашф этдилар. Трансдуксия атамаси остида ДНК

молекуласини бир бактериядан иккинчи бактерияга бактериофаглар ёрдамида ўтказилиши тушунилади.

Мазкур тажрибага қадар бактериофаглар бактерия танасига кирганда уларнинг хужайрасида кўпайиб бактериялар ёрилиб ўлиши ва натижада бактериофагалар билан зарарланган бактерия колонияси лизис бўлиши маълум еди. Бу жараён фагларнинг литик реакцияси деб аталади. Айрим ҳолларда фаг билан зарарланган бактерия хужайраларининг 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 хужайраларга киритиш ва унинг барқарорлигини сақлаш ген муҳандислигининг асосий калит операцияси ҳисобланади. Буни амалга ошириш учун вектор молекулалардан фойдаланилади. Агар ДНК шундайлигича хужайрага киритилса, бактерия хужайраларидаги ферментлар уларни нуклеотидларга парчалаб ташлайди. Баъзи ҳолларда ДНК хужайрага кириб ўрнашиши мумкин, лекин хужайранинг бўлиниши жараёнида у наслдан-наслга берилмай йўқолиб кетади. Рекомбинант ДНК хужайранинг 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 вирусларидан 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-қўтлигини аниқлаш ва уларнинг оқсил маҳсулотларини таҳлил қилиш, муайян оқсилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Шунингдек, сутемизувчилар, ўсимликлар ва ачитки ҳужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган. Эукариот организмлар учун кўп лонли экспрессион тизимлар яратилган экспрессион векторлар полиаде-нилланиш сайти ва мазкур организмда ишлаш қобилиятига ега промотордан иборат экспрессион кассета тутади.

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

Бундай векторлар одатда геномга интеграцияланишига ёрдам И берувчи махсус изчилликлар тутади. 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 ҳужайрада 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 ^Аенидан фойдаланилади. Бу генларнинг оқсил маҳсулоти-ферментлар антибиотикларни модификациялайди ва уларнинг таъсирини инактивлаштиради (кучсизлантиради). Масалан, нптл гени канамицин антибиотигини инактивлаштирувчи неомицин фосфотрансфераза генини кодирлайди. Ҳактерия ҳужайраси нптл гени иштирокида канамицинга нисбатан чидамлилик ҳосил қилади ва шу антибиотик озиқа муҳитларида ўсиб, клон ва луижайралар колониясини ҳосил қилади. Одатда таркибида нптл гени лио^б!магаии ҳужайралар бундай озиқа муҳитларида ўса олмайди ва нобуд бўлади. Демак, вектор конструкция таркибида нптл генини тутиши вектор иштирок этаётган ҳужайраларни аниқлаш ва уларни танлаб олиш имконини беради.

Ген муҳандислигида 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 кўшимча хромасомалар 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. 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. Айти пайтда бундай плазмидларда жойлашаган генлар асосий хромосомада ўз фаолиятини бажаради. Хужайра бўлингандан 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 бўлингандан киз хужайралар орасида тасодифий 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 бўлаққа бўлади. Бундай рестриктазаларга Алу I, Дра I, Ҳае IIII, Ҳпа I, ЭцоR V, Ҳинц II, Пву II, Рса I, Сца I, Сма I ва бошқаларини мисол қилиб келтириш мумкин (5-жадвал).

Шу билан бирга қўш занжир ДНК молекуласини "ёпишқоқ" учлар ҳосил қилиб кесувчи рестриктазалар ҳам мавжуд (Аат II, Ацц IIII, Апа I, Бам ҲI, ЭцоRI, Ҳинд IIII ва бошқалар). Бу рестриктазалар

функцияси жиҳатдан транспозазага ўхшашлиги кўриниб турибди. Шунинг учун ҳам бу рестриктазалар ҳосил қилган "ёпишқок" учлардан фойдаланиб, ҳар хил ДНК бўлақларини 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 рестрикцион эндонуклеазалардан фойдаланиб қўплаб бўлақларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК бўлақлари электрофорез мосламасида махсус молекуляр "элак" тешикларидан юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлағи 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 бўлақлари 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 бўлакларини ўта аниқлик билан бир-биридан ажратишнинг такомиллашуви гигант ДНК молекуласидан исталган ДНК бўлагини ажратиш 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 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 эга бўлган ДНК молекуласи электрофорез услуби ёрдамида ажратиш олинади. Ажратиш 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' ўқи дезоксинуклеотидилтрансфераза ферменти ёрдамида малум узунликдаги олиго (дА) - сегменти уланади. Иккинчи ўқида 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 Т4 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 ҳужайрасига 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,

$\ln(1-p)$

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

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва рқ0,99 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 нуқтаси) 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 плазмида денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., 0,2 Н NaOH эритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза фильтрига бириктирилади. Олинган филтр [γ-³²P] АТФ нуклеотида билан нишонланган иРНК молекуласи билан гибридизация қилинади.

Молекуляр гибридизация жараёнида филтрга 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 ҳужайрасиз 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 тутди. Гармонлар узок вақтлардан буён тиббиётда даволаш воситасида кенг қўлланиб келинмоқда. Аммо яқин - яқинларгача уларни ҳайвонлар органларидан жуда оз миқдорда эса одамларнинг қон тўқималаридан ажратиб олинар эди.

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, ингибаторлардан; В – глюкозидазалар, амилазалар, протеаза ва бошқа, қон факторалари (тўқима плазмигормонлар активатори, ВИИИ фактор, одам қони альбумин зардобии, плодекстранлар), гормонлар (инсулин, проинсулин, Л-, Б-, ва В-интерферонлар, инсон ўсишига гармон, самототропин) ва бошқалар олинади.

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, химоя 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 парчаланади. Ген муҳандислиги тажрибаларида бу гормонлар ҳам узун молекула ҳолида синтез қилиб олинади ва кейин маълум участкасидан кесилади. Ҳужайранинг мРНК сида синтезланувчи ўсиш гормонлари генлари ҳам сунъий ҳолда олинади.

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: фолликулярстимулятор, лютсонизирловчи ва тиреотропинли гормонлар киради.

Булар ҳаммаси гликозилланган бўлгани ҳолда бактерия ҳужайрасида тўлиқ ҳолда синтезланмайди. Тўлиқ синтезланса гормонлар олиш учун

уларнинг генлари ачиткиларга (ачитки ҳосил қилган глюкозилланган гормонлар одамга гормонларига мос келади) ёки тўқима ҳужайраларига ўтказилади. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида аурикулин гармонни ишлаб чиқарадиган 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 ҳужайраларда ишлаб чиқарилиб қон орқали бутун организмга тарқатилади ва хилма хил ҳужайра - 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 сустлик 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 анъанавий усулда олиниб келинадиган гармонлар ва бошқа препаратларни саноат миқёсида ишлаб чиқариш мумкинлигини бутун дунёга намойиш 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. Оксил мухандислиги усулларидадан фойдаланиб, инсулинни синтез қилувчи ачитқи 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. Эътибор қилинг, гипофиз безининг бу қисмининг оғирлиги 0,1 грамдан 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 усулларидадан 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 эрибропозтин (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 бактериал хужайрага ўтказишга мувофиқ бўлинган эди. Орадан кўп ўтмай бунга ўхшаш конструкциялар а- ва г- интерферонлар учун ҳам тузилди. Э.цоли бактерияси хужайрасига, бактериал триптофан ёки лактоза оперони ва интерферон гени сақловчи, гибрид ДНК ўтказилиши билан у ёки бу хусусиятга эга бўлган интерферон синтез қилувчи бактерия штаммлари яратилган эди. Кейинроқ эса, штаммларни 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 штаммлари Россиянинг кўпгина олимлари томонидан ҳам яратилган эди. Хусусан, а- ва г- интерферонлар штаммлари 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 Метхиломонас, 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 ачитки замбуруғларини трансмутантлари ҳам яратилган бўлиб, уларнинг бактериал штаммлардан анча афзаллик томонлари ҳам бор. Хусусан, ачитки замбуруғлари арзон озиқа талаб қилади, фаглар таъсирига ва лизисга чидамли, осон чўқади, 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 штаммлари 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 мухандислиги 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:

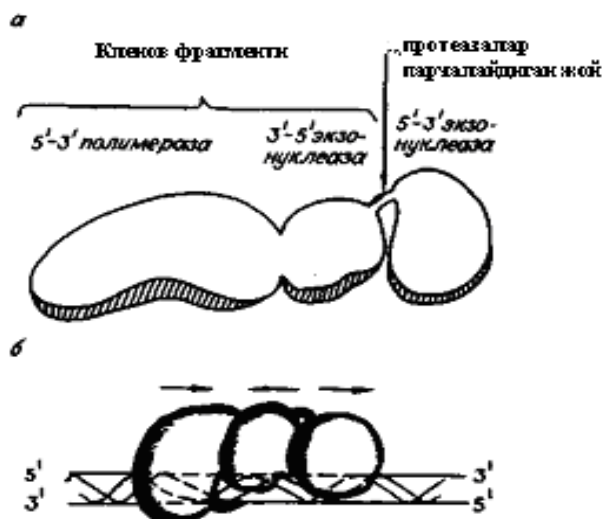
- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);
- ДНК матрицасида ДНКни (полимераза) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

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 химоя қилади. 1968 йили Мезелсон ва Юанлар метилланмаган ДНКни парчаловчи рестриктазани ажратиб олишган. 1970 йили еса Смит ва Вилкокс Ҳаемотропилус инфлуэнзае 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 нуқтасини кесади, 2- ва 3-синф рестриктазалари еса таниш сайтининг ичидаги қатъий бир нуқталарни парчалайди.

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

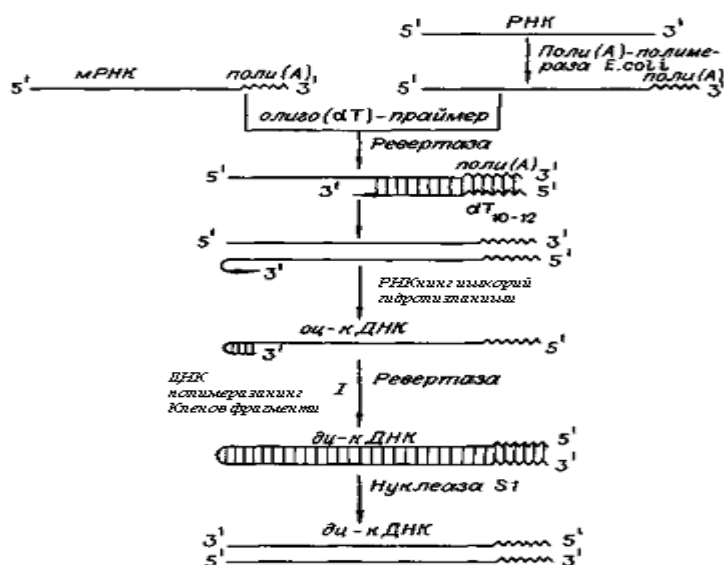
2-синф ферментлари 2 та алоҳида оқсиллардан: рестрикцияловчи эндонуклеаза ва модификацияловчи метилазалардан ташкил топган. Шунинг учун ген инженериясида асосан 2-синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

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 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 ега 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), Зъ-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 топилган 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 жараёнларида, репликацияда жуда керакдир.

ДНК-лигазалар кофакторга бўлган зарурияти ва таъсир қилиш хусусиятига қараб 2 типга ажратилади. Э.цол нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид, T4- 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 хужайрасига 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,

лн (1-п)

$$\frac{p}{N_k \cdot \text{лн}(1-x/y)}$$

бунда, х-клонланаётган ДНК ўлчами, у-гаплоид геномнинг ўлчами ва $p \ll 0,99$ 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) 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 нуқтаси) 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 қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант плазмида денатурация қилинади (100°C ҳароратда 5 мин., 0,2 Н NaOH еритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроцеллюлоза филтрига бириктирилади. Олинган филтр $[\text{Г}^{32}\text{П}]$ АТФ нуклеотиди 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 хужайрасиз 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 хужайра бўлиниши олдидан 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 еса 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 емас, балки битта спиралники. Бу жараён **транскрипция** дейилади. Демак, хужайрадаги ахборот окимини 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 овалбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информатив РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотиддан 1158 тасигина оксилнинг 386та 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, кушлар 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 хромосомаларо 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 ташийти, (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 нукта 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.

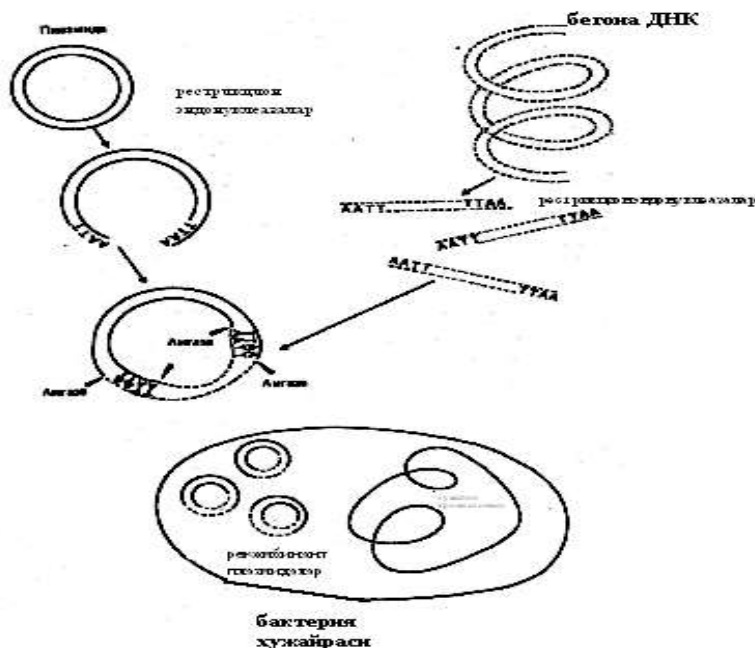
Плазмидалар бактерияларнинг деярли барча турларида учрайди. Плазмидали штамм плазмидасиз вариантларни тиклайди. Бундай ҳолатларда плазида бутунлай йўқолади ва ҳужайра уни регенерация қила олмайди. Буни фақатгина бошқа бактериянинг ҳужайрасидан олиш мумкин.

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 металларга чидамли генларни ташийти.

*Э.коли*нинг Р-плазмидалари таркибида ҳам оғир металларга чидамли генлар топилган.

Бациллус тхуригенсис 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 ортиқ бўлиши мумкин, плазида қанчалик катта бўлса, унинг

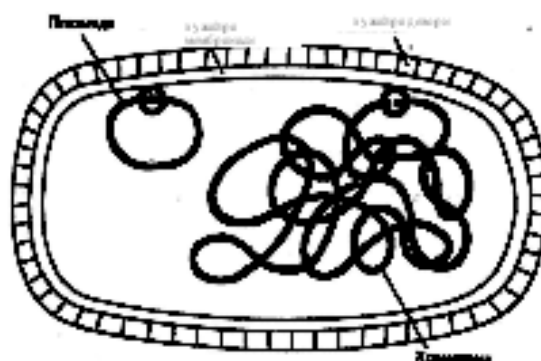
хужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



20-расм

Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия хужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактериялараро плазмидалар алмашилиши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазмидадаги 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 эгаллайди. Инсон хужайраси ДНКси 46 та хромосомада тузилган, уларнинг ҳар бирининг узунлиги тахминан 4 см, нуклеотидлар сони еса 3 млрдга яқиндир. Рестрикцион эндо нуклеазалар 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 хужайрасига генларни экспрессия қилиш учун ҳайвонларнинг ўзига хос оксил (масалан, инсулин) ишлаб чиқарадиган махсус хужайрасидан 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 кўш ипли ДНКнусхаси трансфераза ферменти иштирокида плазмидага киритилади. Трансфераза ДНК учларида нуклеотидларнинг қисқа кетма-кетлигини тиклайди. Сўнг плазмиданинг махсус жойи рестрикцион эндонуклеаза билан парчаланади. Плазида 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 хужайраларнинг 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 -хужайрасининг 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 хужайраларида 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 секретцияланади. Бу гормоннинг етишмаслиги натижасида инсонда гипофизар пакуналик 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 хужайраларида 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 кўшиқли 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 оксиллардан холи бўлади.

Қон ҳужайралари ва фибриобластларда интерфероннинг ҳосил бўлиши. Култураларда 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 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 қўрилди 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 еканлиги аниқланди.

Назорат учун саволлар

1. Рестриктазалар ва уларни тавсифланг?
2. Лигазалар ва уларни тавсифланг?
3. Изомеразалар ва уларни тавсифланг?
4. Ингибиторлар нима?
5. 1.Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.
6. 2.Қайтар транскриптазалар
7. 3.Лигазалар.
8. 4.Ин *витро* 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 беритп

6- МАЪРУЗА. ЎСИМЛИКЛАР ГЕН МУҲАНДИСЛИГИ

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.

Охирги вақтларда комбинацияланган трансформация методи – агролистик методи ҳам яратилиб, амалда қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқимага бирор-бир физик йўл, 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 чидамлилиikka 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*-плазмида кетма-кетлигини киритишнинг 2 хил методи яратилган:

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

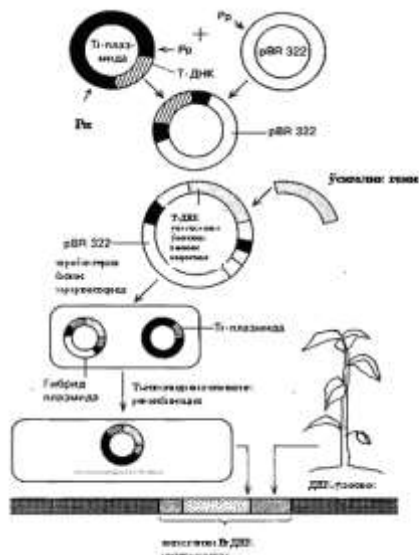
Ти-плазмидадан Т-ДНК рестриктазалар ёрдамида кесилади ва *Е. соли* да клонлаш учун пБР 322 плазмидасига жойлаштирилади. Т-ДНК плазмидали бактериялар кўпайтирилади ва плазмида ажратиб олинади. Сўнгра клонланган Т-ДНКга рестриктаза ёрдамида керакли ген жойлаштирилади. Ҳосил булган Т-ДНКли рекомбинант молекула яна бир бор катта миқдорда 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 *А. Тумефациенс* хужайралари ҳосил бўлади. Уларнинг навбатдаги кўчирилиши агробактерияларга хос бўлган оддий йўл билан амалга оширилади.

Иккинчи метод бинар (кўш) векторлар системасини яратишга асосланган.

Охирги тадқиқотлардан маълум бўлишича, зарарлаш ва трансформация учун яхлит *Ти*-плазмида 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*-плазмида ва Т-ДНКли бошқа плазмида 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 I рдамида 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** чиқа бошлади. 1996 йили АҚШда трансген ўсимликлар эгаллаган майдон 3 млн. акр бўлса, 2002 йилга бу майдон 80 млн акрга етди. Асосий трансген ўсимликлар: жўҳори, 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 қишлоқ 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 зараркунандаларга 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, ҳужайра технологияси, ген инженерлигини ёлга куйилиши улкан муаммоларни ҳал қилиш мумкин.

Ўсимликларда генларни кўчириш (трансгеноз) 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 типини Ти плазмида туфайли юз беради. У бактерия ва ўсимлик ҳужайра 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 ҳужайраларни 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.

Истиқболли векторлардан бири – Агробактериум ризогененс асосида махсус генетик тузилма бўлиб, М.Ф.Шмякин шогирдлари билан турли хил организмга хос генлар таркибида ҳосил қилган. Ушбу тузилма инъекция 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 ё'ли протопластларни қўшиш ва шу асосда регенерация қилиб фертил ўсимлик олишдир.

1984 йил Д.Сенфорд., Е.Валф ва Н.Аллен Корнел университетида АҚШда) 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 фертил соя ўсимлиги олинган. Биолистика ё'ли билан маккажўхори чангдонларини трансформация қилиш фертил трансгенли маккажўхори олинган. Ушбу усулни афзаллиги трансгеноз агробактериосиз амалга оширилиб, каллус тўқималарни ҳосил қилиш, улардан регенерант олиш шарт эмас.

Шунга қармасдан 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 қорақўл қўйлари истеъмол қилганда жунларни ўсиши тезлашар экан. Ё'нғичка ДНК сига горохнинг олтингугурт сақловчи оксил 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.

Ғалла екинлари дон оксил 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. Регенерация туфайли ўсимликда сунъий оксил моддаларини кўплиги қайд қилинган.

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

Ўсимликларда вирусли касалликларга бардошли навлар олиш ё'лга қўйилмоқда. 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 мозаика вирусларини сақловчи генларини ўтказиб, шу вирусга бардошли хусусият ҳосил қилган.

Зараркунандаларга бардошли ўсимликлар олишда қишлоқ хўжалик екинлари навлари зараркунандалари асосида олинади. Бациллус турингенсис бактерияси мавжуд бўлиб, у ўзига хос оксил синтезлайди, қайсики ҳашорат озиқланганда уни ҳалокатга олиб келади.

Ушбу бактерия асосида ҳашоратга бардошли АҚШда ғўза, тамаки, помидор навлари олинган. Хитойда қишлоқ хўжалик академиясининг биотехнология марказида ентомоцид гени бациллус турингенсис бактериясидан генларни кўчириш асосида трансгенли шоли, қарам 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 CO_2 углеводлар (C_3) бирикма ва тур углерод (C_4) бирикма ҳосил қилади. C_4 гуруҳига оид ўсимликлар (маккажўхори, жўхори, лавлаги ва тропик ўсимликлар) да C_3 гуруҳига оид ўсимликларга (ғалла екинлари) нисбатан бир баробар фотосинтез фаоллиги юқоридир.

Фотосинтез жараёнининг оширишнинг асосий ё'ли РБК фотосинтез ферментини фаоллигини оширишдир. РБК ферменти фаоллиги C_4 гуруҳда C_3 гуруҳидаги ўсимликларга нисбатан 60 марта юқоридир. Лекин C_3 гуруҳидаги баъзи екинларда (кунгабоқар) фо-

тосинтез РБК ферменти фаоллиги маккажўхоридан қолишмайди. Шу сабабли кунгабоқарда РБК ферментини бошқарадиган генларни С₃ гуруҳидаги бошқа ўсимликларга ўтказиш лозимлиги еҳтимолдан йироқ емас.

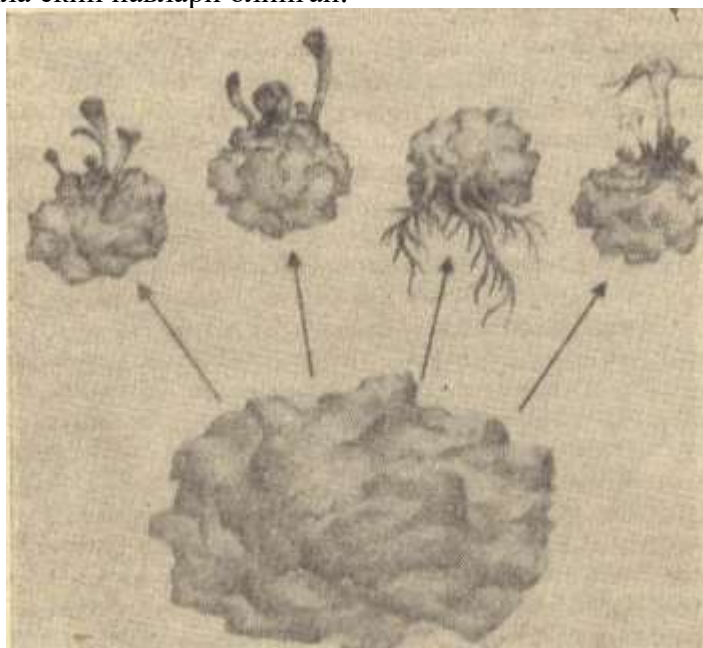
Ўсимлик қисмларини сувда узок вақтда сақлаш, ёки кўпайтириш мумкинлиги маълум. Ўсимлик хужайраларидан бир бутун ўсимлик олиш, бир неча бор кўпайтириш ҳозирги кунда олиб борилмоқда.

Ўсимлик хужайралари технологияси қуйидаги ёналишларда 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 англялик 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 ёлга қўйилган. Тўқима хужайраларидан регенерасия қилиб маккажўхори, шולי, тарик, жўхори, буғдой, картошка, сабзи, кейинги йилларда еса ўсимлик тўқималарини ўстириш ёли билан ғўза, соя, галла екин навлари олинган.



22-расм. Хужайра културасида морфогенез типлари

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

Каллус тўқима ҳосил қилиш ва улардан бутун ўсимлик ўстириш технологияси картошкада яхши ўрганилган. Бунда ўсув нуқталардан 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 юкори 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 коллус тўқималарни регенерация қилиб озика 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.

Хужайра 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 ега.

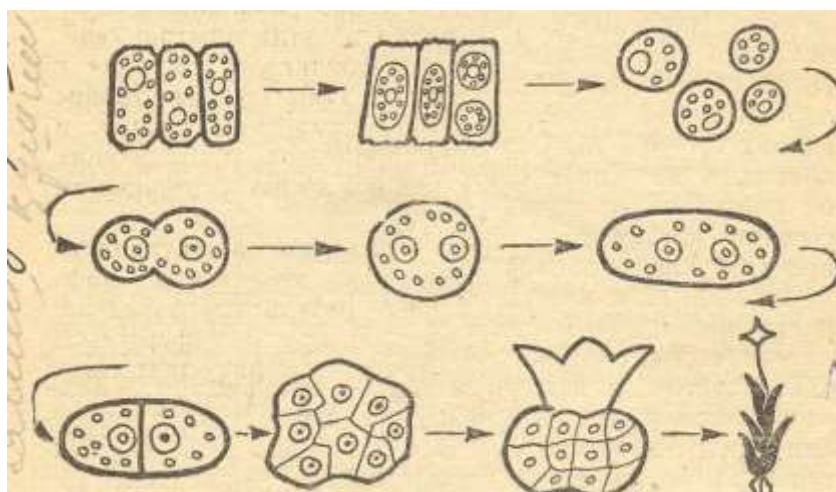
Гаплоид хромосомали тўқималарни хромосомасини ошириб фертилли (диплоид) қилиш гомозиготали қимматли формалар олинади. Протопластларни қўшиш ё'ли билан гаплоидлар биргаликда (иккита) регенерация қилиш селекция учун диплоидлар қимматли дастлабки материал бўлади.

9-жадвал

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

Гамборга озуқа муҳити, ўсимликлар учун		Ваймура озуқа муҳити ҳайвон хужайралари 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 тоmatдошлар, бошққдошлар, қарамгулдилар 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.

25-расм. Генларни минихужайра орқали кўчириш

АҚШда протопластларни кўшиш 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 нармал туганак ҳосил қилувчи навлар яратилган.

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

Биотехнологиянинг асосий юналишлардан бири регуляторлардан фойдаланишдир. Бу кенг қамровли табиий ва органик синтетик бирикмалар кам миқдорда ишлатилганда ўсимликларда моддалар алмашинувининг, ҳужайралар 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 (ҳужайраларни бўлиниши, ўсиши тиним даврини бузиш, барглار оғизчаларни очиш, қуруқ модда тўпланишини кучайтириш ва ҳ.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 – ҳужайраларни 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 ҳужайралардан ўстиришда қўлланилади, ИУК ауксин регуляторлар гуруҳига оид бўлиб, ҳужайраларни 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 узок сақланишини таъминлайди.

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

Хужайра биотехнологияси - хужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Хужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир узгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмидан ташқирда яшаши ва қўпайиши 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 узок - узоклардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида утган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният енг 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 хайвон тўқималари, хужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Хозирги вақтда дунёни қўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида еътибор берилмокда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқд технологияларга нисбатан бир қатор устунликка егалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб киладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к. Шунинг билан бир кдторда, биотехнология стандарт жихрлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иклим шароитига карамасдан ҳамда қўп майдон егалламаган ҳолда жараёнларни йил буйи утказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни хужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

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

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик хужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соуалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, ефир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боглиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар каттиқ (агарли) ёки суюқ озуқа муҳитида ўстирилган каллус туқималардан олинади. Хужайра технологияси асосида диосгенин - диоскоре уужайрасидан; аймолин - илон рацволъфи уужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар - женъиен х;ужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг еътиборга олиш керакки, ўстириладиган хужайраларни хосилдорлиги, бутун ўсимликни хосилдорлигидан 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 икклими минтакаларда), уларни хужайраларини бутун йил мабойинида устриш мумкин.

Иккинчи йўналиш - ажаратиб олинган хужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва ту орсали тез ривожланувчи, хор хил таиши муҳит таъсирига чидамли (иссиқса, совуқса, шурланишга, огир металларга, 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 мухандислиги методлари ёрдамида бегона генларни киритлиши, 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 туҷималарни 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.

Хужайра ва тўқималар култураларини ишлатишдаги натижалар биринчи навбатда хужайраларни бўлиниши, уларни табакдланиши ва улардан ўсимлик ўсиб чиқишини белгилловчи, физиологик жараёнларни оптимизациясига боглиқ. Энг мураккаб томон бу алохида хужайрадан 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 узоқлардан маълум. Бу методни ривожланиш тарихини бир неча босқичларга бўлиб ўрганиш мумкин:

- > **1-боссич (1892 — 1902 йиллар)** — *Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер* каби немис олимларини номлари билан боглиқ. 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 хужайрасини тотипотентлиги яъни хужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенциалини намоён қилиши ва бутун ўсимлик ҳосил бўлишига бошлаши ҳақида гипотеза ёллон қилган еди.
- > **II-боссич (1902-1922 йиллар)** - хайвон тўқималарини ўстириш учун биринчи *Озиқа* муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу *Озиқа* муҳитлари табиий бўлиб, таркибида кон плазмаси (сонни суюқ сисми) ва куртак суюқлиги саклаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстрактлари саклаган сунъий *Озиқа* муҳитида ўстириб куриш муваффақиятсиз чиққан, чунки экспериментларда юксак ўсимликларни ўсиш фаоллигини намоён қилишга тугри келмайдиган хужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.
- > **III-боссич (1922 — 1932 йиллар).** Бу даврда бир-бирлари билан боглиқ булмаган холда *Америкалик* олим *В.Робине* ва немис олими *Котте* саттиқ *Озиқа* муҳитида помидори ва маккажухори илдизи учидеги меристемаларни ўстириш мумкин еканлигини намоёиш қилганлар. Аммо, маълум вақт утгач, ўсимлик тўқималари кунгир рангга кириб, халок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириш методи ривожланиши - 1932 йилдан бошланган.
- > **IV-боссич (1932 — 1940 йиллар), франсуз олими Р.Готре номи билан боглиқ.** У, ин витро шароитида ўсимлик туҷималарини вақти- вақти билан тоза озуқа муҳитига кучириб туриш оркали узоқ вақт ўстириш мумкинлигини намоёиш силган. Бу янгилиқ тўқималар технологиясини ривожланишига катта хисса кушди ва ўстиришга куйиладиган ўсимликлар сони жуда ҳам кпайди.
- > **V-боссич (1940 — 1960 йиллар).** 1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон - ситокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) хужайраларни бўлинишини кучайтириш имконини яратади. Ўсишини кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, експлант хужайрасини бўлинишини кучайтириш, каллус тўқималарни ўсишини мухохаза қилиш, морфогенезни мндуцироват қилиш мумкин еканлиги намоёиш етилди. Шу даврда какое ёнгогини, каштан, маккажухори ва бошқа ўсимликлар ендоспермаларини хужайрани ўсиши, моргенез жараёнлари (каллус туҷима ва хужайра суспензиясида)га ижобий таъсир курсатиши аниқлашган.
- > **VI-боссич (1960 — 1975 йиллар).** Бу даврни энг муҳим воқеаси *Ноттинген*

университети профессори 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 яратилишган. Бу еса, сомотик гибридлар яратишда 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 ўсимлигини соғлом кучатини олиш маънасида яратилган.

- > **ВИИ-боссич — (1975 йилдан ҳозирги вақтгача).** Ин витро техникасини жадаллик билан ривожланиши ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиши давом етмоқда ажратилган протопластларни электро совуштириши усуллари ишлаб чиқилди, мутагенез ва хужайра селекцияси усуллари, гаплоидли ўсимликлар яратиши усуллари, хужайраларни ажратилган протопластлар ва Ti ва Ri Агробактериум тумефациенс ва Агробактериум рхизогенес асосида тайёрланган Ti ва Ri плазмид векторларни ишлатиб суюқликда ўстириши усуллари мукамаллаштирилмоқда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кучириб утказишни самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай қилиб, охирги йилларда ажратиб олинган ўсимлик хужайралари ва тўқималари билан ишлаш техникаси такомиллаштирилди. 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 шарти - стерилликка 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 уруглар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи еритмада ушлаб туриш, кейин еса стерил сув билан ювиб ташлаш оркали амалга оширилади. Стерилизация даври експлантни ҳарактерига ҳамда еритмани стерилизация қилиш хусусиятига боғлиқ Одатда уруг 10-20 мин, вегетатив қисмлар еса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи еритмаларга мисоллар 3.1- жадвалда кўрсатилган.

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 етанолга ботириб олинади. Уруглар спиртда 1-2 мин. ушлаб турилади. ТўқИМАларга 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 ювиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация експлантни фақат ташки инфекциядан озод қилади. Агар експлант тўқималари ички инфекцияга ега булсалар, уларга антибиотиклар билан ишлов беришга тугри келади. Айниқса ички инфекцияга йирик томирли тропик ва субстропик ўсимликлар бой булишади. Култураларни замбуруглар ёки бактериялар билан

ифлосланиши еқилгандан 1-14 кун утганда кузга ташланади. Ёруглик хонасидаги хавони ифлосланишдан саклаш 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 кргозга уралган идишларни куруқ иссиқ билан, куригич шкафларида 160 С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Ажратиб олинган ҳужайралар 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 саклаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казеин гидролизоти, ЭДТА (етилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни ҳужайра киришига ёрдам беради) ва бошқд керакли моддалар саклайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озикд муҳитига кокос ёнгогини (какое сути), каштан дарахтини эндоспермасини кушилади. Карбон сувлар озуқа учун енг керакли компоенентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни автотроф озикланишга курблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпроқ 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза еритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар ҳужайраларни табакдланиши (дедифференсировки) ва ҳужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (ҳужайра бўлинишини кучайтирувчи) булиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар микдорини камайитириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сакламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «урганган» тўқималар усади. Хдр икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик бу ҳужайраларни 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 кўшиш учун, ситокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажртилган 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 ёлон қилинган ва у жуда яхши балансланган озуқа моддалари таркибига ега ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ қилади.

Қаттиқ Озиқа муҳит тайёрлаш учун агар-аграр ишлатилади. Агар-агар денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, махро-ва микроелментлар еритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар куюкрок қилиб 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 керак. Кўпчилик каллус тўқималари ёругликга ехтиёжи юқ 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.

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

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

Ажратилган тўқималар култураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда 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 алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо булиши мумкин.

Ин витро шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сарикрог жуда хм кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус хужайралар кдриганда, туқ кунгир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тупланиши билан боглик Вақт утиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан кутулиш мақсдида 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 қужайралар;
- > **Иккинчи** — урта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемали учокдар;
- > **Учинчи** — зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик пўтлоги тагидаги булинувчан хужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табакалашган (дифференсация) ҳолатда учрайди.

Ҳар бир хужайра 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. Табақдланган 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 боглик бўлиб, табакалаш 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 эндоген 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 бошқд 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 килиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференсацияси фитогармонлр таъсирида булинишни кучайиши (индуксияси) билан боглиқ булса, булинадиган меристемали ҳужайраларни дедифференсацияси бўлинишини тухташ билан ҳужйрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил булишига олиб келувчи булинишни кучайиши билан боглиқ.

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

Ҳужайрани *ин vitro* шароитида дифференсиалланган ҳолатдан дидеференсиалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол булинишга утиши, генларни фаоллигини узгаРиши билан бошланади. (Эпигеномли узгаРувчанлик)- Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши ҳужайрадаги оксил таркибини узгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда узига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг узида баргнинг фотосинтез килувчи ҳужайраларида Оксиллар мивдори пасаяди. Икки паллали ўсимликларда дидеференсиаллашган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон утади.

Дедифференсиаллашган ҳужайрларни каллус тўқималар ҳосил булишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга утиши биланбиокимёвий ва ситологик узгаришлар содир бўлади. Захирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференсиалланиш бошланади. Дедифференсияни индуксиясидан 6-12 соат утгандан кейин ҳужайра қобиги ғоваклашиб шишади, мустикал рибосомалар сони кўпайиб, Голджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу узгаришлар булинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга куйишдан олдин, експлантлар ҳужайрасининг метаболизмида узгаришлар содир булишини, у еса дедифференсия ёки травматик синтез билан боглиқ

булишини хисобга олиб куйиш 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 қўйтиради: булиниш, чузилиш ва дифференсия ва ундан кейин қўриш 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 юқотмасликлари учун, експлантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига утказиб турилади. Бу операцияни - пассирлаш деб аталади. Ўз вақтида бу жараён утказиб турилса, каллус хужайралари ун йиллаб уз булини хусусиятини юқотмаслиги мумкин.

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

- > **1—латент ёки лаг-фаза** даврида хужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Хужайралар бу даврда булинишга тайёргарлик қўрадилар.
- > **2-фаза логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси** энг кўп митотик фаоллик билан ва каллус қўлтурани массасини ошиши билан ҳамда тезлик билан ўсиш қўзатилиши билан ҳарактерланади.
- > **3-фаза тўғри чизикли (линейка)**, бунда хужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.
- > **4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади**, бу босқичда хужайрани митотик 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 қўтарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин хужайраларни деградацияси бошланади ва бу даврда тирик хужайраларни сони ва массаси тобора қамайиб бораверади.

Каллусли хужайраларни ўзига хослиги

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

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна қдтор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори ҳароратга чидамлилиқ осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлилиқ ва х.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал

тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик сўсиллар пайдо бўлади ва умумий оқсил микдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қдтнашадиган оқсиллар қамаяди ёки бутунлай юқрлади. Каллусли хужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан қикданлиги сабабли. Каллусли хужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда утади ва қегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабзининг каллусли хужайраси, янги озуқа муҳитига утказиб туриш хисобидан ҳрзиргача яшаб қелмоқда.

Очиқ тупроқда усувчи ўсимликга нисбатан, каллусли хужайраларни хужайра цикли узунроқдир.

Каллусли ҳужайра узига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини ҳар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни узида ёш ҳужайралар (Г- фазадаги), кдри (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 еди, демак бу хусусият фаол булинадиган ҳужайралар учун хосдир. Каллус ҳужайраларни нафас олиш коеффициенти бирдан катта. Масалан нухат каллус ҳужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижгиш орпасидаги нисбат бижгишни кучайиш томонига, сурилганлигини яъни Пастер эффектани пасайишини кўрсатади.

Пастер эффекта деганда, бижгишни кислород иштирокида нафас олиш билан бошини тушунилади.

Нафас олиш субстратлари узгармаган шароитда, нафас олиш коеффициентини кўпайиши, нафас олиш бижгишни тухтатаолмаётганлигини ва хатто кислородли шароитда ҳам каллусли ҳужайраларда нафас олиш билан бир кдторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижгиш жараёни содир булаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, булинадиган ҳужайраларда этил спиритини тупланишини курсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус ҳужайраларни митохондриялари, меристем ҳужайраларга ухшаб, жуда паст ривожланган уларда кристаллар кам, бу еса аероб нафас олишга таъсир курсатмасдан қолмайди. Пастер эффектани бузилиши кўпроқ хайвонларни шиш ҳужайраларида кузатилади. Бу ходиса Варбург томонидан аниқланган бўлсада ҳрзиргача аниқ тушунтира олинганча емас. Пастер эффектани бузилиши оқибатида келиб чиқадиган анаероб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли ҳужайраларни углеводлар истеъмол қилишини кескин (19 маротабага) ошириб юборади.

Каллусли ҳужайраларни нафас олиш ҳарактерини узгариши билан бир кдторда углеводларни кислородсиз парчаланишини кучайиши юналишида, булинадиган ҳужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш 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) еканлиги аниқланди. Уларни бир хил емаслиги енг аввало ҳар хил сонли хромосомалар саклаши билан намоён бўлади. *Ин vitro* шароитида меристематик тўқималар генетик муътадил бўлдилар

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 анеуплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли туқималарни кднчалитк узоқ вақт ўстирилса, ушанчалик улар плодлиги билан фарқданадилар. Тамаки усимлигини каллусли туқимларида турт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли ҳужайралар қолмайди: Барча ҳужайралар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб қолдилар. Бу еса плоидликни узгариши ўстириш шароити таъсирида, енг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқдча тушунтириш ҳам мумкин.

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

Плоидликни узгаришидан ташқдри ўсимлик ҳужайра ва туқималарини ин витро ўстирилиши, ҳужайрада хромосомали абберациялар ҳосил булишини чақиради. Бу еса ўстириладиган туқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (туқималарни) таиши курилиши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги узгаради.

Ўстириладиган ҳужайраларда микроскоп остида куринадиган хромосомали мутациялардан ташқари куринайдиган 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.

Ўстириладиган 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 узок муддат екилиши, уз навбатида бундай шароитда улардаги генетик узгаришлар, жумладан плоидликни бир хил булмаган узгариши содир бўлади.

Ўсимлик туқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озук муҳитига утказишда бир бирига мое алоқдларни бузилиши ҳам ҳужайраларни генетик муътадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ухшаш натижалар озук муҳити таркибидаги фитогормонларни ҳужайранинг генетик аппаратида таъсири оқибатида намоён булиши мумкин. Каллус ҳосил булиши учун гормон сифатида албатта озук муҳити таркибида ауксинлар ва ситокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти еса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти еса кўпчилик озук муҳитлари таркибига кирувчи 2,4-Д препаратида кузатилган.

Ситокининлар хусусан кинетик ҳужайраларда полиплоидия содир булишига ёрдам берадилар.

Каллус ҳужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни таиши муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли хдмда серхреил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селекцион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

Каллусли ҳужайралар фақат озук муҳити таркибида гормонлар бўлгандагина булинадилар. Аммо узок муддатда ўстирилганда, баъзан улар гормонсиз муҳитда ҳам ўсиш хусусиятига ега бўладилар, яъни ауксин ва ситокининларга нисбатан автоном бўлиб крладилар. Баъзан «мослашган» ҳужайралар томонидан яратиган туқималарни кимёвий шишлар ҳам деб юритилади. «Мослашган» тукдшалар, шиш тукдшаларига ухшаб, кўп ҳолатларда нормал регенерация була олмайдилар ва фақат тератомлар ҳосил киладилар. Илмий адабиётларда жуда кам бўлсада, улар дан нормал регенерантлар ҳосил бўлганлиги ҳақдса 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 ҳужайраларни табакдсизланмайдиган ёки фаол пролиферация (ҳужайра ва туқимларни кўпайиши йўли билан янгидан ҳосил булиши) ҳолатида ушлаб турувчи гормонларни ҳужайрага узок 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 хисобланади. Бундан ташқари ўсимликларда яна иккита хактций шишлар:- попук илдиз (Агробактериум рхизогенес чақирадиган касаллик) ва пояли галл (А.рубис чақиради) учрайди.

Ўсимликларни «мослашган» ва шиш тукдшалрини умумий хусусияти уларни гормонга еhtiёжсизлигидир, бошқдча айтганда ҳар иккала туқима ҳам гормон сақламаган муҳитда уса оладилар. Бу хусусият уларнинг каллули туқималардан фарқли томонидир. Маълумки, каллусли туқимларни табақалашмаганлиги ва пролеферацияси учун озуқа муҳити таркибида гормон сақдаши шарт.

«Мослашган» туқималарда худди шиш туқималарга ухшаб, уз гормонлари синтез бўлади, шунинг учун ҳам улар гормонга мухтожлик сезмайдилар. Гормонга тобе булмаган туқимлар ташқи 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 характерга ега бўлсада, мутация имкониятларини ҳам еътибордан ташқдрида колдирмаслик керак.

«Мослашган» хужайраларда узгаРиш епигеномли ёки генотипик асосга ега еканлигини аниқлаш учун хужайра-ўсимлик-хужайра каторида гормонга мухқтож 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 мухтожсизлик хусусияти авлоддан-авлодга утади, демак у генетик асосга ега деб айтиш мумкин.

Агар гормонсиз муҳитда хужайра булинмаса ва каллусли туқима пайдо булмаса, яъни гормонга мухтожсизлик наслдан-наслга утмаса, узгаришни епигеномли характерга егалиги ҳақида хулоса чиқариш мумкин. Аммо, бу йўл билан фақатгина регенерация хусусиятини юкотган «мослашган» хужайраларни текшириш мумкин халос. Маълумки, кўпчилик «мослашган» хужайралар регенерацияга бўлган имкониятларини юкотадилар, бу еса юқоридаги усулни гормонга мухтожсизликни табиатини аниқдашни кийинлаштиради.

Шиш туқималарда гормонларни синтези - ўсимлик утказилиши билан боглик. Утган асрни 40-йилларида Ф.Уайтнинг укувчиси, Браун корончатогалли шиш туқима култураси агробактерия юклигида (уларни юқори ҳароратда улдирилгандан кейин ҳам) ҳам ишишлик хусусиятини сақлаб қолишини кузатган еди.

Гормон сакдамаган сунъий озуқа муҳитида, бактерия сакдамаган корнчатли галл туқимаси фаол пролиферацияни давом еттираолган. Бу туқималар, оддий туқимага қараганда юқори микдорда ауксинлар ва бирнеча ситокининлар саклайдилар. 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 принципе) киритади, у еса Збсоатда оддий хужайрани шиш хужайрага айлантиради деб тахмин қилинган еди. Кейинчалик Тип ДНК еканлиги ва агробактерияларни катта плазмидасида сакланиши 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) ҳужайрасини ирсий апаратини бир қисми бўлиб хизмат қилади. Агробактерияларни Ти плазмидани Т-ДНК сини ўсимликлар хромосомасига интеграцияси шил пайдо бўлишига ва шил ҳужайрасини сунъий озикд муҳитида гормонга муҳтожиз 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 муҳтожсизлик қилиб чиқади ва у ҳужайраларни табакдсизланишига ва пролиферациясига олиб келади.

Ти плазида ўсимликлардаги янги генларни табиий вектори (ташувчиси) бўлиб хизмат қилади. Агробактериялар томонидан индуциролат қилинган шил ҳужайралар томонидан ауксин ва ситокининларни синтез бўлиш йўли, нормал ва «мослашган» ҳужайраларниқига Караганда бошчачарок. У оддийрок ва қиска. Мутагенлар ёрдамида Т-ДНК молекуласида гормонал фаолликни узғаришини назорат қилиб турувчи қсимни (участкани) аниқлаш мумкин бўлди. Шилни ўсиши учун бирта локус емас, балки бир қатор генлар жавобгар қанлиги аниқланди.

Т-ДНК ауксин ва ситокининлардан таишари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар қалли (опинлар) синтезини детерминация қилиши аниқланди. Бу моддалар шил пайдо бўлишига сабаб бўлаолмайдилар; балки улар ҳосил бўлган шил тўқималарида синтез бўладилар. Шил тўқималар бир неча қунлиқ бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайдилар, масалан, қоланхоеда опинлар синтези, шил индукцияси бошланган қундан 7-қунда бошланади.

Қаллусни суёқ озуқа муҳитига утқазиб, автоматик равишда аралаштириш орқдли ҳужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида. Масалан пектиназа ферменти ёрдамида тугридан-тугри експлант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва х.қ) ҳам ҳужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, експлант юзасида қаллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан ҳужайра ва ҳужайра агрегатлари ажралади ва оқибатда ҳужайра суспензияси олинади.

100 мл ҳужайра суспензияси олиш учун 2-3 г қаллусли тўқима қерак бўлади.

Ҳужайра суспензиясини тайёрлаш учун енг зарур шароит - бу домий равишда аралаштириб ёки чайқдтиб туришдир. Агар ҳужайра суспензияси қимирламай турса, ундан бўлиниш натижасида қаллусли тўқималар ҳосил бўлади.

Суспензион ҳужайраларни бўлиниши ауксинлар ва ситокининлар, яъни қаллус ҳужайраларни ўсиши ва индукцияси учун зарур бўлган гормонлар ёрдамида химоя қилиб турилади. Шундай қилиб, суспензияли ҳужайралар қаллус ҳужайраларни узгинаси бўлиб, улар да бундай ҳужайраларга хос бўлган барча хусусиятлар намоён бўлади.

Суспензия 2,4-Д сакдаган муҳитда ҳосил бўладиган пуқак ҳужайрадан яхшироқ ҳосил бўлади. Муҳит тарқибидан қалсий олиб ташланса, суспензия ҳосил бўлиши енгиллашади. Озиқага пектиназа ферменти аралаштирилса (бу фермент озуқа тарқибидида алоҳида ҳужайраларни бир-бирига боглаб тувчи пекрат қалсийни парчалайди) суспензия янада енгилроқ ҳосил бўлади.

Биотехнологияда ҳужайра суспензиясидан икқиламчи метаболитлар олиш мақсадида фойдланилади. Икқиламчи метаболитларни қўпчилиги доривор моддалар ҳисобланадилар ва ҳужайра биомассасини саноат миқёсида қўпайтириш ва ҳужайра селекциясида қенг ишлатиладилар. Бундан ташқдри ҳужайра суспензиясидан алоҳида протопластлар олиш учун ҳам фойдаланилади.

Суспензион қултур алардан икқиламчи метаболитлар продуциенти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки оқдва усулида оқик ёки ёпик тизимда ҳужайраларни қўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпик тизимда ҳужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити қиритилмайди, 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 эмаслиги уларни буяш (кук метилен ёки Эванс куки) орқдди аниқланади. Тирик ҳужайрлар, ҳужайра мембранаси буёкни утказмаслиги сабабли буялмайди. Улик ҳужайра кобигидан буёқ тез утади ва шунинг учун ҳам кук рангга буялади. Ҳужайра суспензиясини асосий курсатгичларидан бири, ҳужайра популяциясини кдлинлигидир. Ҳужайра сони Фукс-Розентал ҳисоб камерасида микроскоп остида мацерансиядан кейин (ҳужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация килувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли еритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, ҳужайраларни бириктириб турувчи уртадаги пластинкани еритиб (гидролиз килиб) юборади.

Яхши ривожланувчи суспензия, каллусли културага ухшаб, С- симон ўсиш чизигига ега. Одатда, пассажни давомийлиги 14-16 кундан иборат. Бунда суспензиянинг кдлинлиги 5х10 дан 5х10 ҳужайра 1 мл гача ошади. Ҳужайра сонини кўпайиши, уларни курук ва хул массаси- суспензион културани асосий ўсиш критериясини ташкил етади.

Суспензияни сифати, ҳужайраларни агрегация даражасига боглик. Агрегатлар 10-12 ҳужайрадан кўп булмаслиги керак. Шунинг учун ҳам йирикроқ агрегатлардан кутулиш мақсадида суспензияни марля, найлон ёки метал филтрдан утказилади. Бу операция бир вақтни узида експлантлар колдигидан ёки каллус тўқималарни булакчаларидан кутулиш имкони беради.

Ҳужайра суспензиясида қимматбаҳо иккиламчи метоболитлардан ташкдри янги ажойиб бирикмалар: комптотецин, хиррингтонин каби антикансерогенлар, хдр хил пептидлар (протеаза ферменти ингибитори, фитовируслар ингибиторлари) ва бошқд бирикмалар синтез булиши ҳам кузатилган.

Шуни алоҳида таъкидлаш лозимки, ҳужайраларни бўлиниши окибатида ҳужайра биомассасини кўпайиши ва иккиламчи метоболитларни синтез булиши хдр хил вақтга тугри келади. Иккиламчи метоболитлар синтез булишини максимуми, ўсишни стационар фазасига тугри келади.

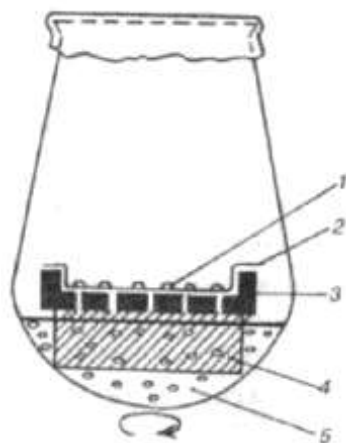
Генетик ва физиологик изланишлар хдмда ҳужайроа селекцияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида ҳужайралар жуда катта аҳамият касб етади. Клонни олиниши ягона ҳужайра авлодини олиниши каллусли ҳужайраларни генетик бир хил емаслигини сабабларини аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген експлат олинган тўқималарда емас, 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 машақдатли ишдан озод килади. Бундан ташкдри 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 кобиги пайдо бўлганидан кейин ажратиб олинади.

Бир ҳужайрали фраксия олиш учун баъзида суспензион културани колбада 15-30 мин тиндириб куйиш кифоя бўлади. Бунда йирик агрегатлар чукмага тушадилар. қолдик устки суюкликда 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 Озиқа муҳити қушилади- Кондиция қилувчи фактор ҳужайра суспензиясини ўсишни экспоненциал фазасида бактериал филтрдан утказиш даврида пайдо бўлади (олинади). Мохияти 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 емас. 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 емас.

Назорат саволлари

1. *Ти-плазмиданинг ахамияти?*
2. *Ўсимлик ген муҳандислигида қўлланиладиган маркерлар генлар ҳақида маълумот беринг?*
3. *Трансген ҳужайраларини саралаб олиш қандай амалига оширилади?*
4. *Трансген ўсимликларининг истиқболларини қайси соҳаларда кўриш мумкин?*

7- МАЪРУЗА

ҲАЙВОН ГЕН МУХАНДИСЛИГИ

Режа:

- 1 Хайвон ген мухандислиги.
- 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 ўтказадиган 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.

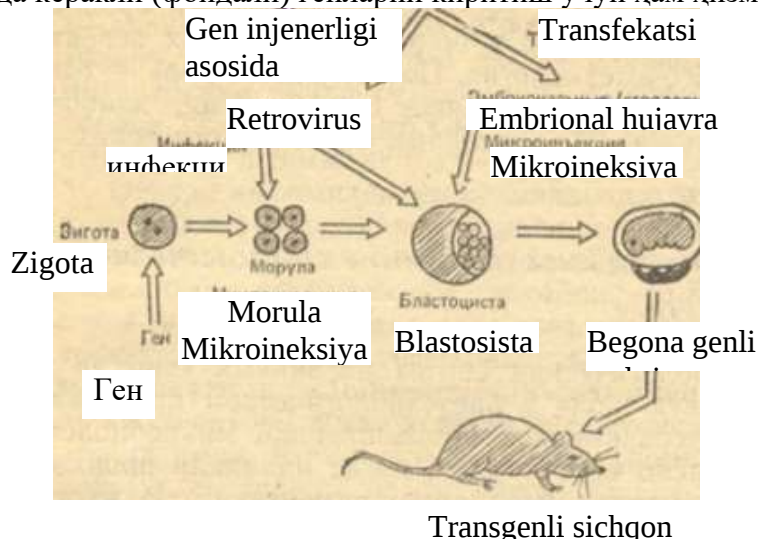
Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисимларига ега бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб, керак бўлган қисимларини бошқа генлардан ёки синтез ё'ли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ организмга киритиб зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳоказо технологиянинг йиғиндисидир.

Хайвонларда ген инженерлигини қўллаш инсон учун керакли (фойдали) генларни геномга жойлашнинг бажарилишига боғлиқ. Мана шундай клонлаштирилган генни хужайра 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 ё'л билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан (НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон хужайрасига киритишди. Сичқон хужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон хужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфекцияси (трансфекцияси) хайвонлар хужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар хужайра

трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам хизмат қилади.



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 эга.

Генлар организмга киритишда вируслардан ташқари мобил элементлар ҳам мавжуд бўлиб бу 1983 йилда дрозофила геномидан ажратилган. Энг кўп қўлланиладиган усуллардан бири генларни зиготанинг пронуклеусига инъексия қилишдир. Қишлоқ хўжалик ҳайвонлари зиготасида пронуклеусни ажратиш қийин бўлгани учун инъексияни аниқ қилишни қийинлаштиради. Шунга қарамай Ҳаммер ва бошқалар 1985 йилда биринчи бўлиб трансген чўчқа олдилар. Лекин тажрибалар маҳсули жуда паст еди. Масалан, битта трансген қўзи олиш учун 1032 зиготага инъексия қилиш, 20 та трансген чўчқа боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъексия 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-ретровирусли 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 екзоген гени бор организмлар трансген ҳайвонлар дейилади.

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг қўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар қўпайишда

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 ё'ли 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 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 ҳужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қўйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ё'ллар билан бажарилмоқда. Масалан: қуй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида эмбрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ё'ли 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 тухумдонидида кўплаб қиз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ё'ли билан ана шу қиз 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 қуйга 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 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 ёлга 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 хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёл билан 50 минг сигирни қочириш мумкин, лекин табиий шароитда улар фақат ўнлаб насл қолдириш имкониятига ега. Ҳайвонлар кўпайишдаги мана шу жуда катта имкониятлар фойдаланилмайди. Бу имкониятлардан тўлақонли фойдаланишда эмбрионларни кўчириб ўтказиш усули қўл келади. Айтиқса бу усул юқори маҳсулдор ҳайвонлар сонини тез кўпайтиришда катта аҳамиятга ега. Масалан, битта юқори маҳсулдор сигирдан эмбрионни кўчириб ўтказиш ёли 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 маҳсулотини 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 хали 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.

Айтиқса 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 ехтимоли 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 бўлақларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун эмбрионлар 60 та хужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлақларга 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 тухумдонида юз минглаб қиз хужайралар 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 аниқланыпти. 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 тутати. Бунга ўзини клонлаш натижасида ҳужайрада индукциялашган мутант олиш, ҳужайра селекцияси, соматик ҳужайраларни гибридлаш, ситоплазматик генларни кўчириб ўтказиш ва бошқалар кириди: 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 гармонни юборишдан олдин улар тухумдонидagi сарик таначанинг ҳажми 1,5 см дан ошган бўлмаслиги яхши натижалар бериши ётироф 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 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 фасллари ва озик тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда 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 қуйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчкалар кўп насл берадиган ҳайвонлар гуруҳига кириб, улардан эмбрион олиш гармонлар билан ишлов бермасдан ҳам бажариш мумкин. Шунга қарамадан 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 таъсирга 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 етади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин қуйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сарик таначалар сони билан ўлчанади. Овуляция натижасида чиққан тухум ҳужайралар ва улар оталанишдан кейин ривожланаётган эмбрионларни, ҳозирги пайтда мавжуд бўлган зондлар билан, 60-70 % ини ювиб олиш мумкин. Шундан 20 % оталанмаган тухум ҳужайраларни 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 эмас. 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 ё‘ли 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 эга. 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, қўзи 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 ё‘л 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 программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум хужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир эмбриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

Ген муҳандислиги методларининг яратилишига қадар, 2 та соматик хужайраларни қўшиш йўли билан генлар кўчирилган. Агар хужайраларнинг 2 та линиясини биргаликда полиэтиленгликол ёки инактивланган Сендай вируси иштирокида инкубация қилинса, бу 2 та хужайра линияларининг ядролари қўшилади. Ҳосил бўлган гибрид хужайраларни селектив муҳитда ажратиб олиш мумкин. Бунда маълум бир белгилар ва маълум бир хромосомалар ўртасидаги мувофиқликни аниқлаб янгидан-янги генлар харитасини тузиш мумкин бўлади. Гибрид хужайра кўпайиши давомида битта ёки иккала она хужайраларни 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 якка 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 мукаммал бўлмаган организмлар) – бактериялар, актиномисетлар, риккецийлар ва тубан еукариотлар (бир ва кўп ҳужайрали, ядроси мукаммал, хромосомалари махсус липопротейд табиатли мембраналар билан ўралган) – ачитки 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 ҳолос.

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 экан, энди бактерияларни культурада (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.

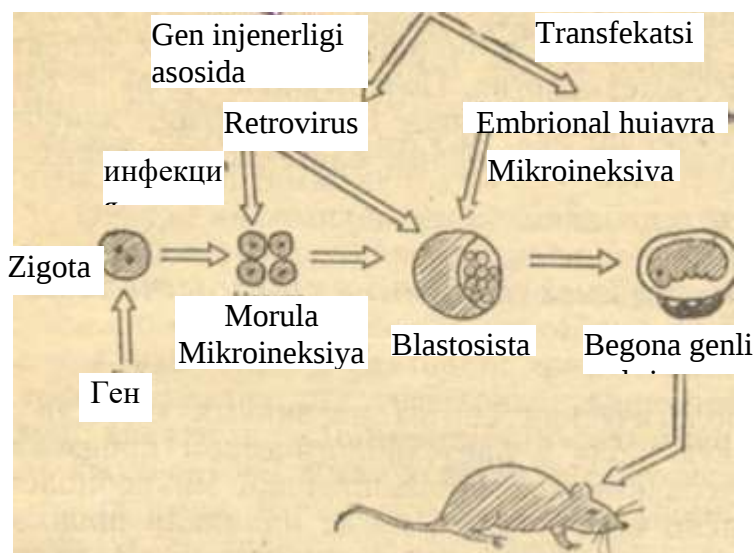
Ген инженерлиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисимларига ега бўлиш, керакли жойидан кесиш, керакмас қисмини олиб ташлаб, керак бўлган қисимларини бошқа генлардан ёки синтез ё'ли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ 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 траснфексияси усуллари мавжуд.

Биринчи усул билан керакли ген олдин ДНК молекуласига уланиб сўнгра пронуклеусга жойлаб қўйилади. Шундай ё'л билан Виглер ва бошқалар герпес вирусдан

(НСВ-1) олинган ва ДНК молекуласига уланган тимидинкиназа ферментини назорат қиладиган генни сичқон хужайрасига киритишди. Сичқон хужайрасида ушбу фермент бўлмаган натижада бир неча бўғин давомида сичқон хужайраларида тимидинкиназа ферменти бўлган.

Иккинчи усул, яъни вирус инфекцияси (трансфекцияси) хайвонлар хужайрасига табиий генетик информация киритиш ҳисобланади. Бундан ташқари вируслар хужайра трансформациясида керакли (фойдали) генларни киритиш учун ҳам хизмат қилади.



Transgenli sichqon

27-расм. Генларни хайвонларнинг генетик аппаратида 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 эга.

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 хайвонлари 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 қўзи олиш учун 1032 зиготага инъекция қилиш, 20 та трансген чўчка боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъекция қилишга тўғри келади.

Зооинженерлар учун генларни хайвон хужайрасига 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, хужайраларни 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 хайвонларда 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 ҳавфли эмас. Лекин бу усулнинг камчилиги ташқаридан киритилган ДНК нинг жуда кам

ўзлаштирилишида.

Физикавий усул икки асосий классда-микроинъексия ва электропорация ё'ли билан олиб борилади. Электропорация нисбатан янги усул бўлиб, ДНК молекуласини электр токи ёрдамида хужайра мембранасидан олиб ўтишга ёрдам беради. Лекин бу усул ё'ли билан генларнинг геномга ўтказилиши хусусияти номаълум.

Микроинъексия усули-самарали ҳисобланиб, кенг қўлланилди. Гордоннинг аниқлашича плазмидли ДНК насилга берилади. Бундай ҳайвонлар, яъни ўзининг геномида екзоген гени бор организмлар трансген ҳайвонлар дейилади.

Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг қўпайиши ва серпуштлик хусусияти аниқ ирсий назорат остида амалга ошади ва булар гармонлар статусига боғлиқ. Ҳайвонлар қўпайишда 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 қўпайишига таъсир қилиш мумкин.

Шу нуқтаи назардан, серпуштлиги юқори бўлган ҳайвонларнинг селекция қилиш ё'ли билан уларнинг сонини ошириш мумкин. Масалан. Бурула зотли қўйларда серпуштлик гени ўрганилиб, унинг тухумдонга таъсири аниқланган. Шу зотни бошқа меринос қўйлар билан чапиштириш 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 қоронғи 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 киз хужайраларни бир ҳайвон танасидан иккинчисига жойлаб қўйишдир.

Ҳозирги пайтда бу усулни амалга ошириш турли уй ҳайвонларида ҳар хил ё'ллар билан бажарилмоқда. Масалан: қуй, ечки, тўнғиз, қуён ва бошқаларда лаборатория ҳайвонларида эмбрионларни кўчириб ўтказиш факат жарроҳлик ё'ли 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 тухумдонидида кўплаб киз хужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ё'ли билан ана шу киз хужайралар оталантиради 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 қуйга 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 ёлга кўйилган. 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 киз хужайралари мавжудлиги аниқлонган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёл 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 ёли 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, 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 хали 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 ехтимоли 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 тухумдонидан юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчилиги лабораторияларида ана шу қиз ҳужайралар олинди, махсус суюқликларда парвариш қилиниб оталаниш даражасига етказиш на танадан ташқари (ин витро) оталантирилиб реципиентларга қуйиш муаммоси устида ишляпти. Бу соҳадаги жиддий муаммолардан бири эмбрионларнинг қайси жинсга мансублигини аниқлаш. Ҳозирда мавжуд бўлган усуллардан фойдаланилганда 70 % эмбрионларни жинси тўғри аниқланыпти. 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 кириди: 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 гармони юборишдан олдин улар тухумдонидан 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 шунини 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 фасллари ва озика тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда 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 қуйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган ҳайвонлар 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, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, эмбрионлар олиш кўп таъсирга боғлиқ. Шунинг учун ҳам ҳайвонлардан сунъий ёл билан эмбрион олишни олдиндан айтиш қийин.

Гармонлар билан ишлов берилган ҳайвонларни ўз вақтида қочириш сифатли ва керакли микдорда 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) тухумдонида 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 суяқ 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 кўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш эмбрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум хужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир эмбриондан кўплаб андоза

олиш имкониятини беради.

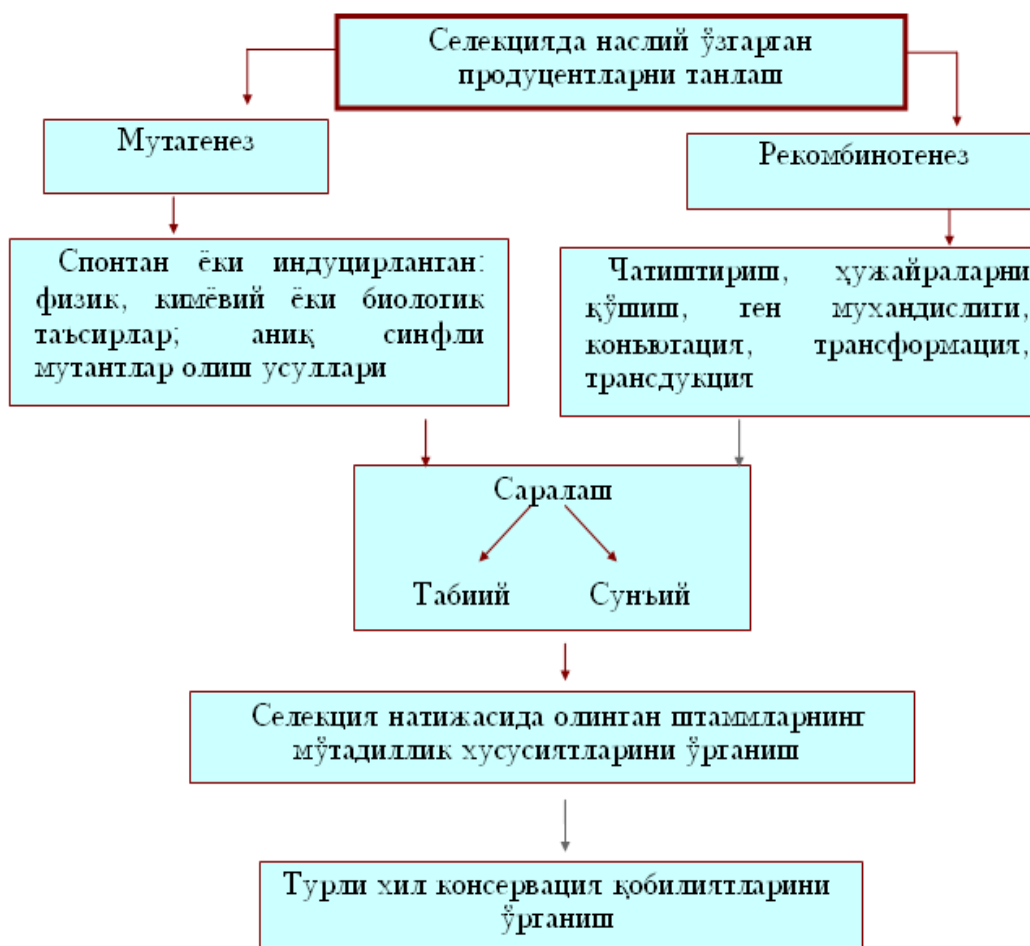
Продусентларни яратиш усуллари

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 антиотиғи 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).

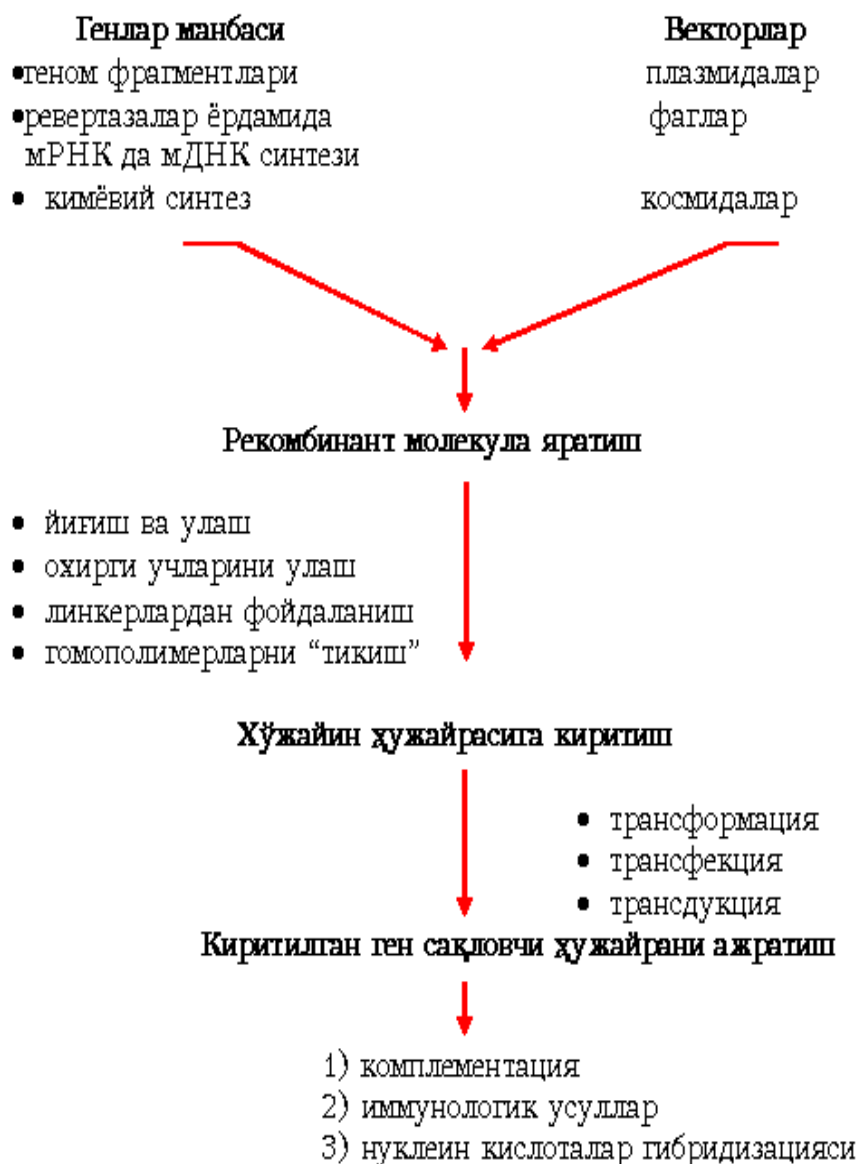


28-расм. Микроорганизмлар селекцияси

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).

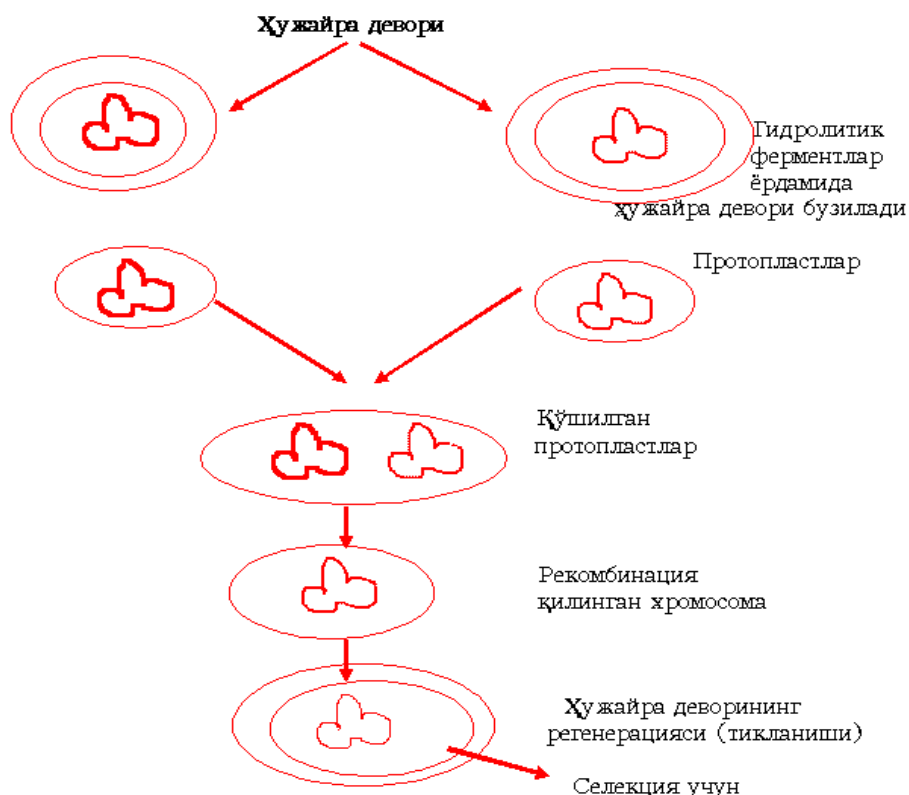


29-расм. Генларни клонлаш стратегияси

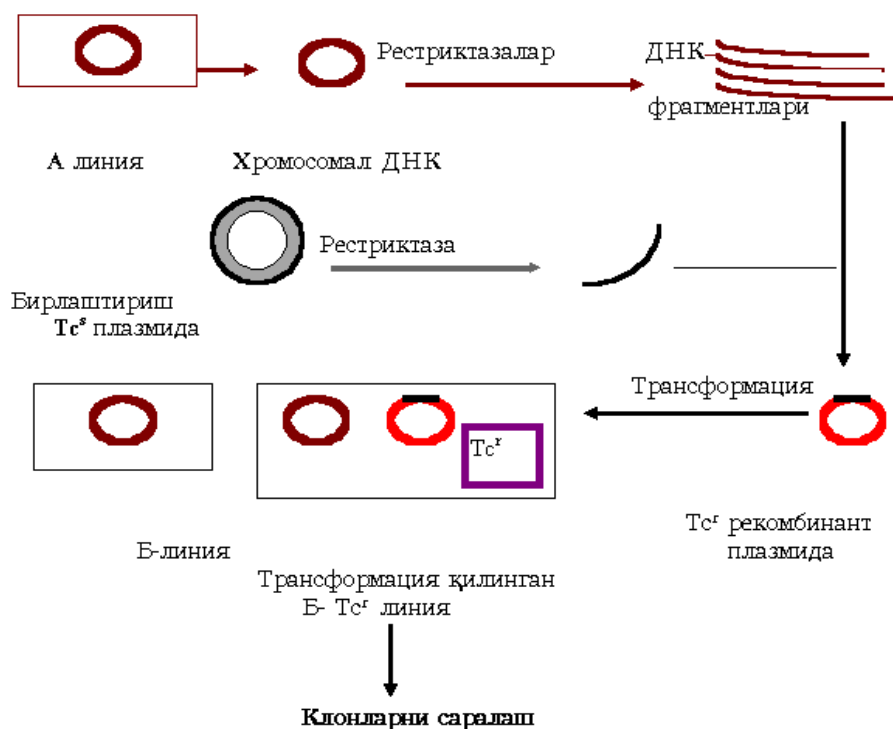
Масалан: Стрептомйцес рептомйцес бактериясининг икки хил штаммларидан олинган протопластларни бир-бирларига бирлаштириш оқибатида С-рифамисин синтез қилувчи ҳосилдор штамм яратилган. Рифамписин синтез қилмайдиган Ноцардиа медитерранеи штаммлари протопластларини бир-бирларига қўшиш оқибатида рифамписинни 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 махсуддор мутант штаммлар олиш механизми



31-расм. Плазмида ДНК си ва бактерия хужайрасидан фойдаланиб, гени клонлаш чизмаси

Вектор ген билан лигаза ферменти ёрдамида бириккандан кейин рекомбинант ДНК ҳосил бўлади. Кейин, бу бирикма (вектор ген) микроорганизм хужайрасига юборилади (трансформация) ва у ерда амплификация (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 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–мухандислиги 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 организмиде синтез бўладиган ва доривор модда сифатида ишлатиладиган оқсил ва пептидларни синтез қилишни йўлга қўйиш катта аҳамият касб этади.

Ген мухандислиги муаммолари билан шуғиланадиган омилларни асосий вазифаларидан бири ҳам шундай бирикмаларни етарлича синтез қила оладиган бактериялар штаммларини яратишга бағишланган. Бу жараённи асосий қийинчиликлари, штамм яратиш билан боғлиқ емас, балки, яратилган штаммда синтез қилинган оқсил моддаларини керакли меъёردа ушлаб туриш, уларни модификацияга 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 организмидан 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 енг 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 еғалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к Шунинг билан бир кдторда, биотехнология стандарт жихрзлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иклим шароитига карамасдан ҳамда кўп майдон еғалламаган 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 қуриш мумкин:

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соуалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, ефир 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 - женъшен х;ужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт уамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг еътиборга 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 бўлмаган шароитда (совуқ ёки иссиқ икклими минтакаларда), уларни ҳужайраларини бутун йил мабойинида устриш мумкин.

Иккинчи йўналиш - ажаратиб олинган ҳужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва ту орсали тез ривожланувчи, хор хил таиши 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 *Ҳайвонлар ген муҳандислиги ҳақида тушунча беринг?*
- 8 *Вирус генларини жойлаштириши ва кўчириши ҳақида тушунча беринг?*

8-МАЪРУЗА.

ХУЖАЙРА МУҲАНДИСЛИГИ.(4 с)

8.1 Хужайраларни ўстириш ва сақлаш. Хужайра культуралари. 2с)

8.2 Биотехнологияда одам ва ҳайвон хужайра культураларини қўллаш. (2с)

Режа:

1. Хужайраларни ўстириш ва сақлаш
- 2.Хужайралари культуралари
- 3.Ўсимлик хужайрасини ўстиришдаги фарқлар
- 4.Биотехнологияда одам ва ҳайвон хужайра культураларини қўллаш
- 4.Протопластларни қўшилиши
- 5.Соматик хужайралар гибридизацияси
- 6.Хужайра культураларини ҳосил қилиш.
- 7.Ўсимлик хужайраларини ўстириш
- 8.Ҳайвон хужайраларини 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 ХХ 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 куртақлар 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 ҳужайраларининг дедифференцияланиши ва **каллусогенез** жараёнининг хусусиятлари олинган тўқиманинг хусусиятларига боғлиқдир. Ўсимликларнинг махсус тўқималари (паренхима, илдиз ва поя, барг мезофили ва б.) нинг ҳужайралари озуқа муҳитида ўзига хос функцияларининг йўқотиб дедифференциялашиши ва фаол бўлинадиган ҳужайра ҳолатига келиши керак.

Ўсимлик ҳужайра ва тўқималари культуралари ўстириладиган **озуқа муҳит таркибида** минерал тузлар (макро ва микроэлементлар), углерод 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 ҳужайралари культуралари **суспензион культуралар** дейилади. Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик ҳужайралари культуралари каллус культураларининг юза экиш усулидан афзалликка эга. Суюқ муҳитда метаболизм ва ҳужайра 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 ҳужайралар 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 ҳужайраси аввал бирламчи ҳосил қилиши керак, сўнг 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 скальпель ёрдамида кесма кесилади ва протопластлар муҳитга ажралади.

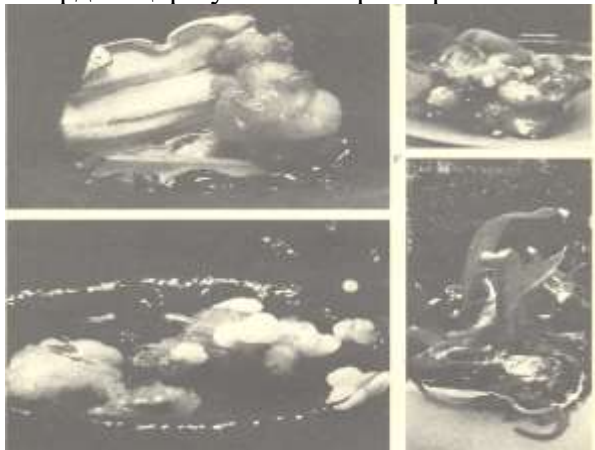
2. **Ферментатив усулда** ҳужайра девори ферментлар ёрдамида йўқотилади. Бунда 3 хил тип ферментлар - целлюлаза, гемицеллюлаза ва пектиназадан фойдаланилади.

Протопластлар культурасини олиш учун 2 хил ёндошилади: суюқ 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.

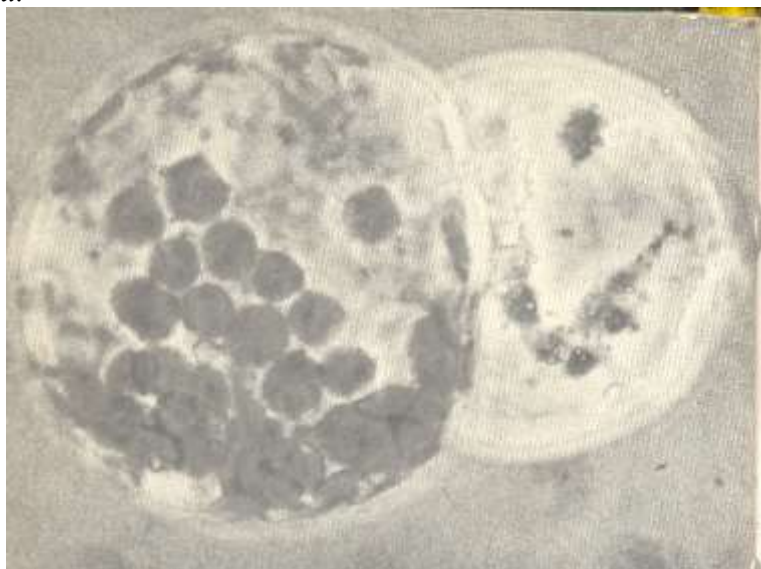
Бунинг натижасида томатнинг касалликларга чидамли факторлари картофелга кўчирилган.

Соматик гибридизация – ўсимликларни гибридизация 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 олиниб 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.

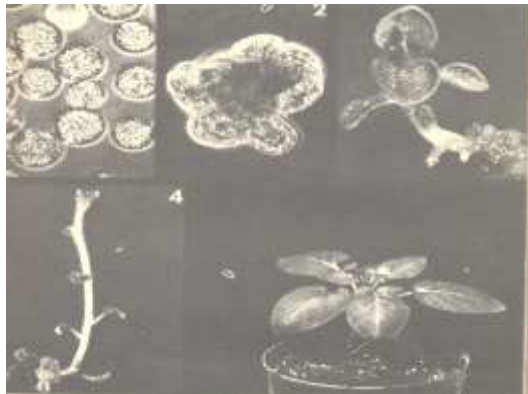
Картофель баргидан олинган алыобинос протопласт ва томат баргининг соғлом протопласти қўшилган. Бундан мақсад томат генларининг касалликларга чидамли геномларини картофел геномига киритишидир.

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 чидамлилик ва хромосомалар ёки хужайра кариотиплари сони ҳам бўлиши мумкин.

Протопластлар лабиль тузилмалар бўлгани учун соматик гибридизациялаш йўли билан хужайрага бегона материалларни, ҳамда уларга изолирланган ДНК ёки бошқа хужайраларнинг органелларини киритиш мумкин. Ҳозирда ядро, хлоропластлар трансплантация қилинган.



34-Расм. Барг протопластидан (1) олинган каллусдан (2) картофелнинг регенерацияланиши (3-5)

Ўсимлик ва ҳайвон хужайраси 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 хужайралари культурасини яратиш бўйича ишлар бошланди. Ўсимлик хужайраларини 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 хужайраларининг 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 хужайралари суяқ доимо аралаштирилган муҳитда культурасини олишда ишлатиладиган ферментацион методлар микробиология технологиясига хосдир. Ўсимлик хужайралари бактерияларга нисбатан секин ўсишига қарамай, уларнинг ҳарактеристикаси бир-бирига яқиндир.

Шунга қарамай, муҳим органик бирикмаларни фақат ўсимлик ёки ҳайвон хужайралари синтезлайди. Бу эса ўз навбатида янги технологияларни яратишни талаб қилади.

Ҳайвон хужайралари ё суспензия кўринишида ёки қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўстирилади. Бундай хужайралар, масалан, ХеЛа (инсон ўсмаси хужайраси) иккала ҳолатда ҳам ўсиши мумкин; лимфобластом хужайралар суспензион культурада, нормал диплоид хужайралар эса қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўсади.

Охирги пайтларда хужайра ўсишини назорат қилувчи системалар «бухта» кўринишида ўралган, газни ўтказувчан тефлон трубкаларга асосланган. Бундай шароитларда кўплаб хужайраларни культурасини олиш мумкин. Яна бир самарали метод, бу хужайраларнинг унча катта бўлмаган маржонлар (шарчалар, микроташувчилар)га бириктирилишига асосланган усулдир. Шарчалар сефадекдан ясаиб, юзаси 7 см²/мг бўлиши мумкин. Шарчалар суспензион ҳолатда суза олади ва уларда турли типдаги хужайралар ўсиши мумкин. Бу усул ёрдамида инсон интерферони олинмоқда.

Микроорганизм хужайраларини иммобиллаш

Микроорганизмларнинг иммобилланган хужайралари ҳақидаги илк мақолалар ХХ 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 узоқ фаолият кўрсатиш хусусиятига эга бўлади.

Иммобилизациялаш учун турли ҳолатдаги, яъни тирик ва турли даражада зарарланган хужайралар ишлатилиши мумкин. Бир босқичли реакцияларни иккала ҳолатдаги хужайралар амалга ошира оладилар. Полиферментли реакцияларни эса тирик хужайраларни қўллаш билан амалга оширилади, бундай хужайралар 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. Хужайраларни иммобиллаш ферментларни иммобиллаш методи билан жуда яқин.

Кимёвий иммобиллаш 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 металлардан тозалашда;
- қуёш энергиясининг ассимиляциясида;
- водородли қуёш элементларини тайёрлашда;
- азотфиксацияда;
- аналитик мақсадларда электродларни тайёрлашда.

Микроорганизм хужайраларини иммобиллаш, айнқса, 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* 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 пустаулата* 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 *Сацчаромийцес уварум*, *С. цевевисиае*, *Сандида тропицалис*, *Э. Соли* хужайралари иммобилланган.

3. Хужайраларни биологик макромолекулалар (масалан, лектин) ёрдамида инерт субстратда адсорбциялаш. Кам ишлатиладиган методдир.

4. КМЦ типдаги 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 суяқ суспензион културада 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 *Сапсичум 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 суяқ муҳит ҳаракатсиз хужайралар атрофини циркуляциялайди.

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашни асосий шарт – 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 экслантни 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. Тўқималарға 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, куритгич шкафларида 160⁰С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Озуқа муҳити

Ажратиб олинган хужайралар 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 хужайра киришига ёрдам беради) ва бошқа керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озиқа муҳитига кокос ёнғоғини (какос сути), каштан дарахтини эндоспермасини кўшилади. Карбон сувлар озуқа учун энг керакли компоенентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни автотроф озиқланишга 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) кўшилади. Яхши ўсувчи каллус олиш учун кўпроқ 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки ИУК, 2,4-Д га нисбатан 30 маротаба кучсиздир.

Сунъий озуқа муҳитига кўшиш учун, цитокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажртилган тўқималарни ўсишига оргоногенезни индукциясига кинетинга нисбатан фаолроқ таъсир кўрсатади. Баъзи бир озуқа муҳитлар таркибига аденин ҳам кўшилади.

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
NH_4NO_3	1650	2500	2500	-
$\text{NH}_4\text{X}_2\text{PO}_4$	-	-	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
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_4$	-	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-ҲСл	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин ҲСл	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

Қаттиқ озуқа муҳит тайёрлаш учун агар–ағар ишлатилади. Агар–ағар денгиз сув ўтларидан олинadиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, макро- ва микроэлементлар эритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар қуюқроқ қилиб тайёрланади ва совуқ шароитда сақланади ҳамда керак бўлганда суюлтирилиб ишлатилади.

Ўстириш шароити

Ўсимликлардан ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни яхши ўстириш учун, ўстиришни маълум шартларига роия қилиш керак. Кўпчилик каллус тўқималари ёруғликга эҳтиёжи йўқ, чунки уларни хлоропластлари бўлмасдан, гетеротроф озикланадилар. Баъзи – бир яшил рангдаги каллус тўқималар бундан мустасно. Баъзи бир ҳолатларда каллус тўқималар автотроф озикланишига қобилиятли эмас, буларни доимий ёруғлик шароитида ўстирилади, бу эса мувоффақиятли морфогенез учун мажбурий шароитдир кўпроқ каллус тўқималар қоронғиликка олинади.

Морфогенезга аниқланган (детерминированўе) 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 муҳитини 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

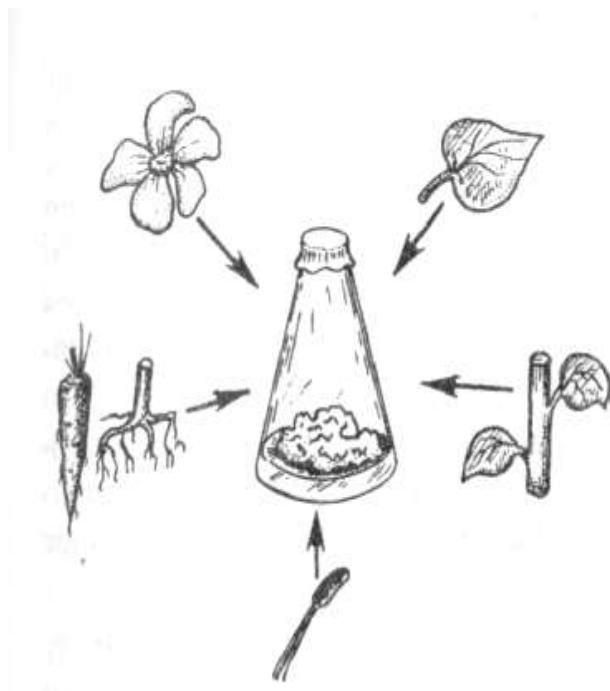
Ажратилган тўқималар культураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированнўй) хужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. Каллус дегани қадоқ (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 сарикроғ жуда ҳм кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус хужайралар қариганда, тўқ қўнғир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тўпланиши билан боғлиқ. Вақт ўтиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан қутулиш мақсидида озуқа муҳитига антиоксидантлар қўшилади.

Каллус тўқималар аморф бўлиб, маълум бир анатомик тузилишга эга эамслар, аммо келиб – чиқиши ва ўстириш шароитига қараб, ҳар хил консистенцияга (суюқ - қуюқ ва х.) эга бўлади:

- **Биринчи** – уваланиб кетадиган пўк ҳолатда кичик агрегатларга енгил майдаланиб кетадиган, кучли сувланган хужайралар;
- **Иккинчи** – ўрта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемали ўчоқлар;
- **Учинчи** – зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик пўтлоғи тагидаги бўлинувчан хужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табақалашган (дифференциация) ҳолатда учрайди.

Ўсимлик хужайрасини табасизланиши ва уни каллусга айланиши учун шарт бўлган шароит-бу озуқа муҳити таркибида икки фитогормонларни яъни ауксинлар ва цитокининларни бўлишидир. Ауксинлар хужайраларни табақасизланишини (дедифференцировка) чақирса уларни бўлинишига тайёрлайди, цитокининлар табақасизланган хужайраларни бўлинишига (тролифорция) олиб келади. Агар таркибида гормон сақламаган озуқа муҳитига поя, барг ёки илдизни бир қисмини тикиб қўйилса, хужайраларни бўлиниши амалга ошмайди ва каллус тўқима ҳосил бўлмайди. Бу табақалашган хужайраларни 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 қобилиятини йўқотишидир. Дифференциацияга учраган ҳужайралар яна қайтадан бўлиниш қобилиятига 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 қобилиятини 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 эксплантнинг 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 фитогормоннинг 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 паллали 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. Заҳирадаги 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.

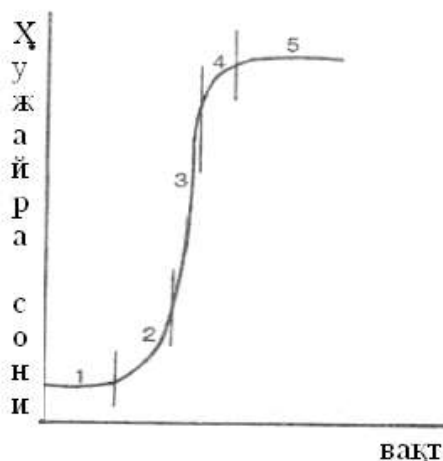
Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференция ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференцияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференцияси билан 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 ошиши 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 ошиши 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 vitro шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлар организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва биокимёвий хусусиятларни сақлаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилятини йўқотмайдилар. Совуққа чидамлилиқ 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 қолинганлиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқимлари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори хароратга чидамлилиқ, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлилиқ 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 синхронликни 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 тупрокда 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 бошишни тушунилади.

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффициетини кўпайиши, нафас олиш бижғишни тўхтатаолмаётганлигини ва ҳатто кислородли шароитда 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 характерини 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 бўлдилар

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 ануеплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли тўқималарни қанчалитк узоқ вақт ўстирилса, ўшанчалик улар плоидлиги билан фарқланадилар. 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 озука 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 чақиради. Бу эса ўстирилаётган 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 мўътадил 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 узок муддат экилиши, ўз навбатида бундай шароитда улардаги генетик ўзгаришлар, жумладан ploidликни бир хил бўлмаган ўзгариши содир бўлади.

Ўсимлик тўқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озук муҳитига ўтказишда бир бирига мос алоқаларни бузилиши ҳам хужайраларни генетик мўътадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ўхшаш натижалар озук муҳити таркибидаги фитогормонларни хужайранинг генетик аппарати таъсири оқибатида намоён бўлиши мумкин. Каллус ҳосил бўлиши учун гормон сифатида албатта озук муҳити таркибида ауксинлар ва цитокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти эса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти эса кўпчилик озук 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 култураларини олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 2. Протопластларни ажратиб олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 3. Протопластлар културасини олиш ҳақида тушунча беринг?*
- 4. Протопластларни қўшилиши ҳақида тушунча беринг?*
- 5. Соматик хужайралар гибридизацияси ҳақида тушунча беринг?*
- 6. Хужайра култураларини қандай ҳосил қилинади?*
- 7. Ўсимлик хужайраларини ўстиришида қўлланиладиган озик муҳитлар?*
- 8. Хайвон хужайраларини ўстиришида ўзига хос томонларини сананг?*
- 9. Хужайраларни ўстиришида стериллаш ишлари қандай олиб борилади?*

9- МАЪРУЗА

ТАБИИЙ ОРГАНИК БИРИКМАЛАР БИОТРАНСФОРМАЦИЯСИ. БИОЭТАНОЛ ИШЛАБ ЧИҚАРИШ. БИОЁҚИЛҒИЛАР.

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 бижғийдиган 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 бошқоқли 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 алмашиниши 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 глүкоза 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 тхермоселлум*

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 ҳужайралари 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 ажратиш 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 гидроқсиллаш 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 ҳужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражатини камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиш 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 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. Шу билан бирга ҳужайрада плазмида 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 ҳужайрадан 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. Ачитки, 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 камаёди, сезиларли даражада ноҳуш ҳидлар тарқалиши камайтиради. 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 (ксилон 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 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 ишлатиладиган гербицид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб културасини 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 хеостатда 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. қуруқ 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.

Қуруқ 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 заҳирасидаги 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 олинади.

Этил спирти олинadиган ўсимликлар қаторига маниок, бошоқли ўсимликлар, айниқса жўхори (углевод заҳираси крахмал) ва ернок (углевод заҳираси инулин) киради. Булардан ташқари шакар қамиш, ананас, қанд лавлаги ва сорго (углевод заҳираси сахароза) ишлатилади. Бу ўсимликларнинг култураси ҳозирда кенг миқёсда ўстирилмоқда.

Этанол ишлаб чиқаришни мукамаллаштириш 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 қўқ 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.

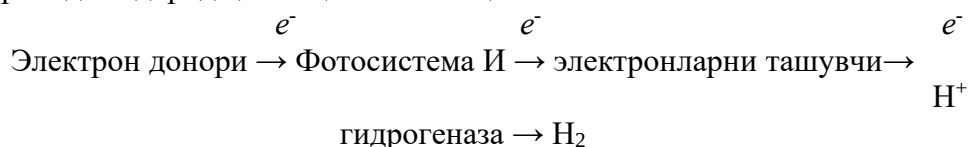
Биометаногенез 3 босқичда амалга оширилади: органик бирикмаларни эритиш ва гидролизлаш, ацидогенез ва метаногенез. Бу жараёнда 3 та гуруҳ бактериялар иштирок этади. 1 гуруҳ бактериялар мураккаб органик субстратларни мой, пропион ва сут кислотасига айлантиради; иккинчилари, бу органик кислоталарни сирка кислота, водород ва CO₂, сўнг метан ҳосил қилувчи бактериялар водородни ютиб CO₂ ни метанга айлантирадилар.

Биокимёвий нуқтаи 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 олиниши Ҳиндистон, Хитой каби мамлакатларда кенг қўлланилади.

Ўзбекистонда кенг майдонни ғўза, каноп, тамаки, кунгабоқар ўсимликлари эгаллайди. Ғўза поясидан ҳозиргача спирт, қоғоз олинган бўлса, бошқа ўсимликлар шунчаки ёқиб юборилган. Ўзбекистон олимлари Ушбу чиқиндилардан экологик иссиқликни яхши сақлаш хусусиятига эга бўлган тоза қурилиш материалларини олиш технологияларини ишлаб чиқилган.

Қуёш нурунинг 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 қўринадиган нур билан нурлантирилганда водород ажратиши мумкинлиги аниқланган. Бундай ҳолда хлоропластнинг И ва ИИИ фотохимик системалари иштирок этади. *Слостридиум* 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 (куёш энергияси);
- Маҳсулот (водород)ни атмосферани ифлослантirmасдан 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 олиниши 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 – 2021

1-лаборатория машғулоти

Мавзу: Чиқиндисиз технология яратиш. (2 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 қуйидаги 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 ноҳуш ҳидлар тарқалиши камайтиради. 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 толуюлни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАХ (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАХ

плазмидалари бактериял 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 Псеудомонаснинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификатсиядир: фосфорилланиш, метилланиш, атсетилланиш ва б.лардир. Детоксификатсияни катализловчи ферментлар плазмада 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 бактериял 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 камайтиришда 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 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 фарматсевтикада ишлатиладиган ферментатсия – бу ифлосланишнинг асосий манбаидир. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментатсиянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли хужайралари ва озук 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 сульфитлар, карбонатлар ва калсий, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофел ва маниокнинг қуруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўҳори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декстрин ва глюкоза 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, атсетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб хужайралари 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 атсетонга, глицерин дигидроатсетонга, 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 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 атоми маълум

бир микроорганизмлар ёрдамида гидроксиллаш 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 хужайралардан 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 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. Сху билан бирга хужайрада плазида 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 хужайрадан бошқасига полиетиленгликол иштирокида трансформациялаш йўли билан Басиллус плазмидаси ўтказилган. Псевдомонас плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Сху йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш саволлари.

1. Чиқиндисиз технологиялар деганда нимани тушунаси?
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 мухандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича 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 жараёни 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 охирги маҳсулотни синтез бўлишини тухтатади. Схундай қилиб, биосинтез жараёнининг тезлиги охирги маҳсулотнинг талаб қилинишига боғлиқ.

Агарда триптофани биосинтез жараёнида муҳитга қушилса жараён тухтайди.

Ферментларнинг актив ва пасив формаси, оксиллар билан кимёвий группаларнинг ковалент боғланишига ҳам боғлиқ.

Ишни бажариш тартиби:

Спектрофотометрнинг кюветаси 0,4 мл субстрат аралашмаси (Д-глюкоза, MgCl₂ ва АТФ) 0,1 мл НАДФ эритмаси, 0,01-0,04 мл глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа бўлган эритма, трис-ҲСл буферининг 50 мМ ли эритмасидан қўшиб, умумий ҳажми 3 мл га етказилади ва яхшилаб аралаштирилгандан кейин унга 0,01-0,02 мл амилаolitik эритмасини қўшиш орқали реакция бошлаб юборилади. Реакциянинг бошланиши секундларда қайд қилинади ва 340 нм да, ҳар секунд оралиғида оптик зичлиқнинг ошиб бориши кузатилади. Ажратиб олинган фермент препаратини солиштирама фаоллиги сарҳисоб қилинади.

Оқсил 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. Амилаolitik 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 услубийқўлланма. 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.

Дастлабкиси полипептид занжиридан ташкил 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) ташкил 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 витаминлар (E, K, K, B1, B2, B6, B12, C, H ва б.) ёки витаминлар иштирокида тузилган бирикмалар (коэнзим A, НАД+ ва б.) иштирок этади.

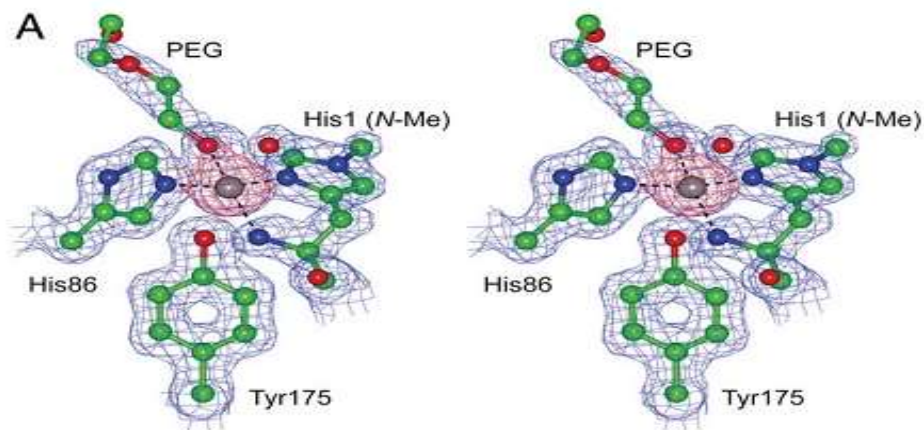
Бундан ташқари коферментлар функциясини НС-глутатион каби бирикмалар, турли нуклеотидлар ва уларни ҳосилалари, айрим моносахаридларни фосфорли эфирлар ва бошқа моддалар гуруҳлари ҳам бажаради.

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 ичкарисида жойлашган ингичка гидрофоб чуқурлик қисмидир.

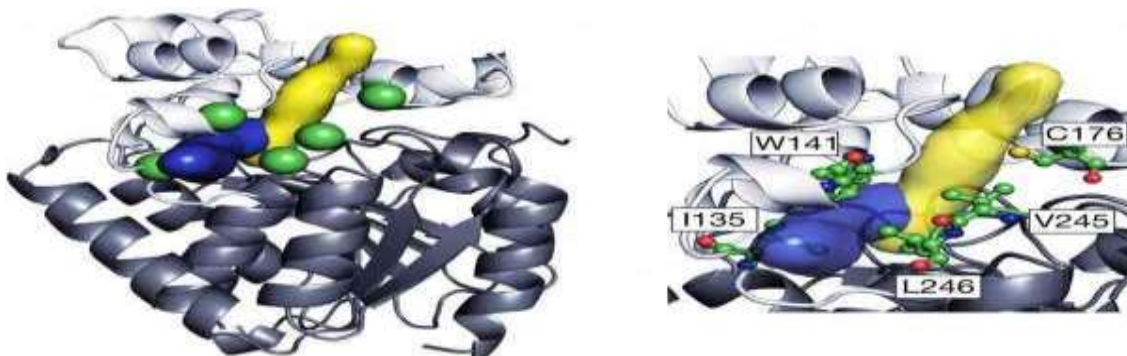
Ферментнинг актив марказида одатда 3-12 аминокислота қолдиғи жойлашган бўлиб, у молекуланинг катта бўлмаган қисмини ташкил этади.



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.

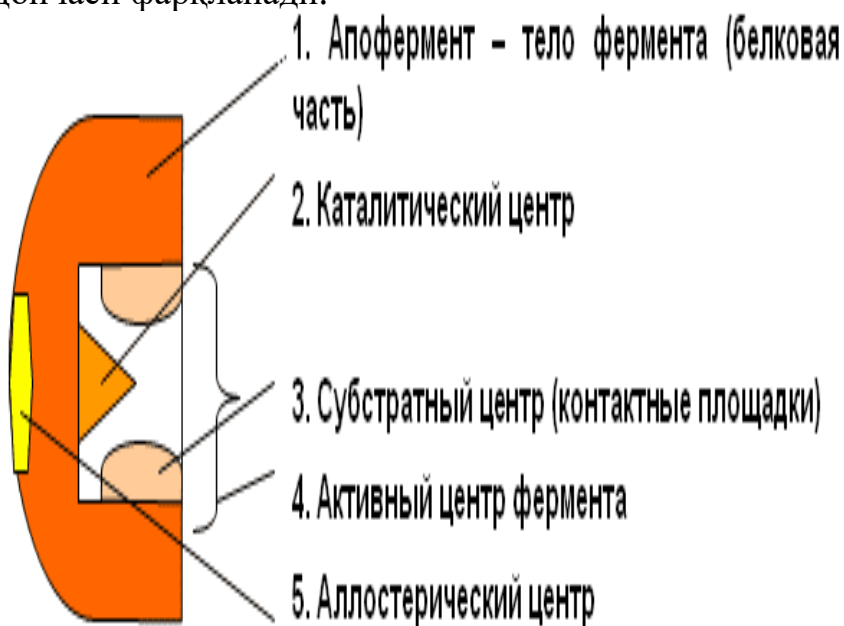


Шунинг учун актив марказ оксил молекуласининг ўзига хос учламчи структураси шаклланаётган пайтда юзага келади.

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 -бошка, ва стерос -тузилишли)-мавжуд.



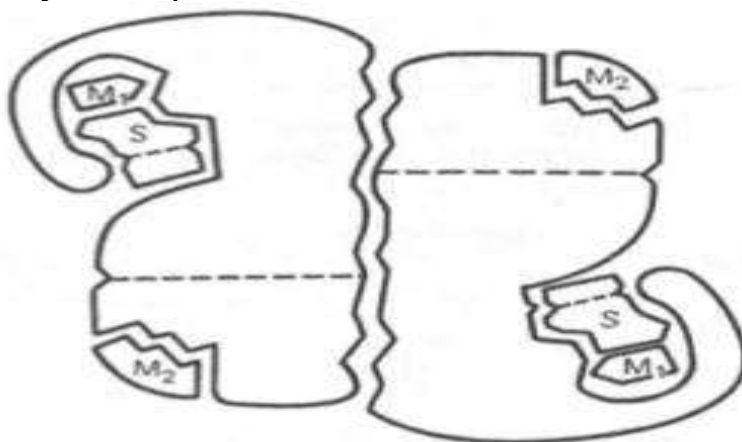
У тузилишига кўра субстратдан фарқ қилувчи паст молекуляр моддаларни (эффекторлар, ёки модификаторларни) боғлаш хусусиятига эга.

Эффекторни 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 эффекторлар боғланиши оқибатида каталитик марказ фаоллигини ўзгартиш хусусиятига эга ферментлар, аллостерик ферментлар дейилади.

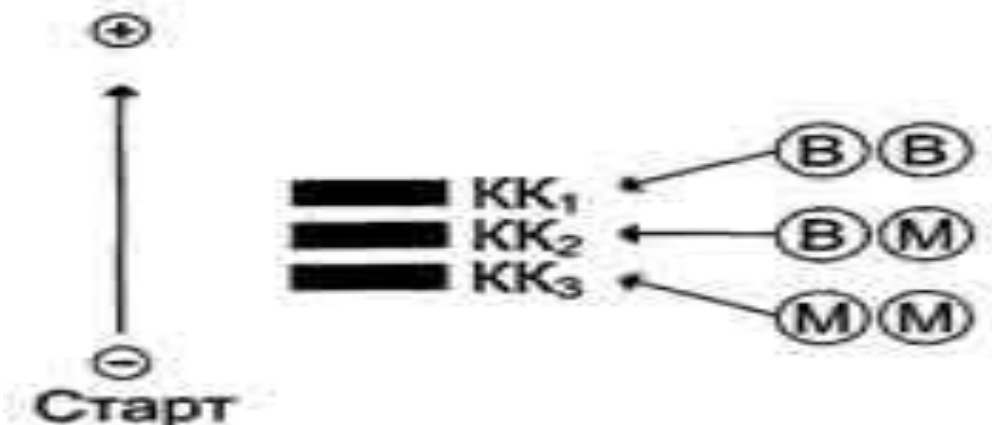
Аллостерик ферментларнинг ўзига хослиги олигоферментлар молекуласида бир нечта актив марказ ва бир нечта аллостерик регулятор марказларнинг бўлиши, ҳамда уларнинг бир-биридан узоқда жойлашувидадир.



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 шаклидир.

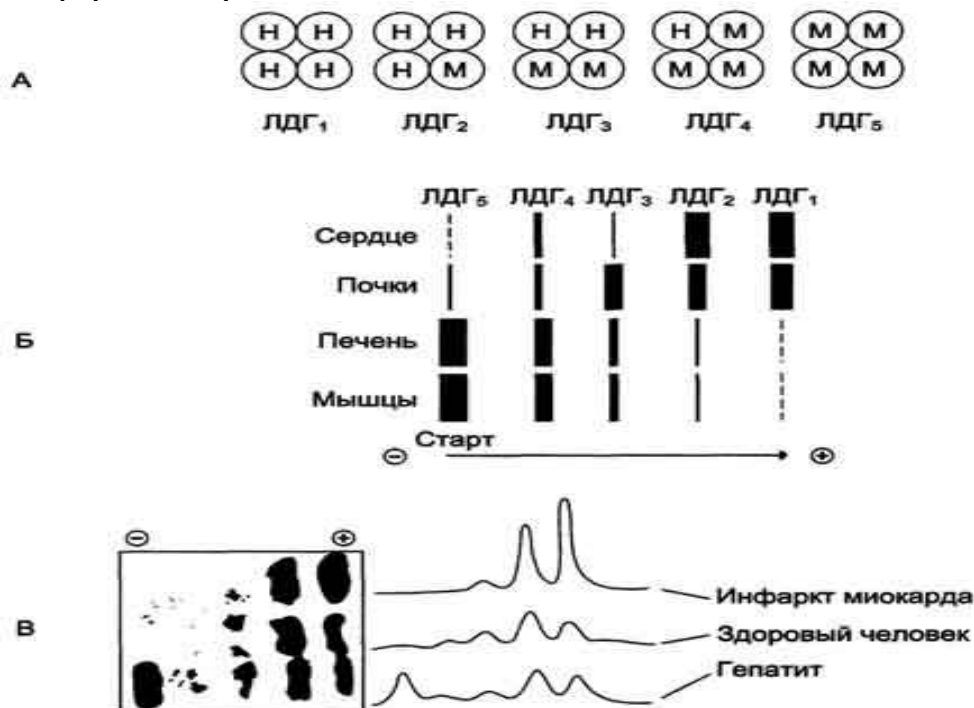


Тирик табиатда бир хил ёки турли бирламчи, иккиламчи ёки учламчи структурага эга, икки ёки кўпроқ суббирликдан тузилган ферментлар молекулалари учрайди.

Суббирликлар одатда протомерлар, улар бирикишидан ҳосил бўлган олигомер молекула-мультимер дейилади.

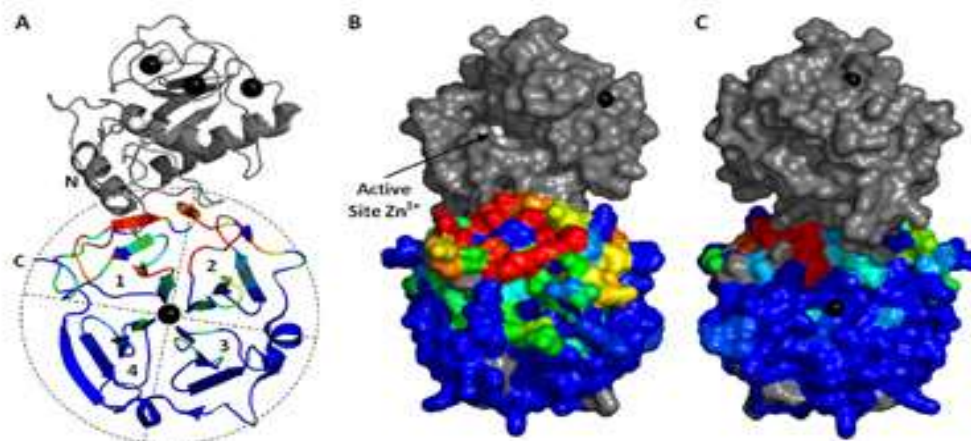
Уларда суббирликларни бириктирувчи ковалент ва валентлик боғлари учрамайди. Асосан ноковалент бўлган боғлар мавжуд, шунинг учун ҳам бундай ферментлар протомерларга осон диссоцирланади.

Алоҳида суббирликлардан структуравий комплексни ҳосил бўлиши, бундай ферментларнинг активлигини белгилайди.



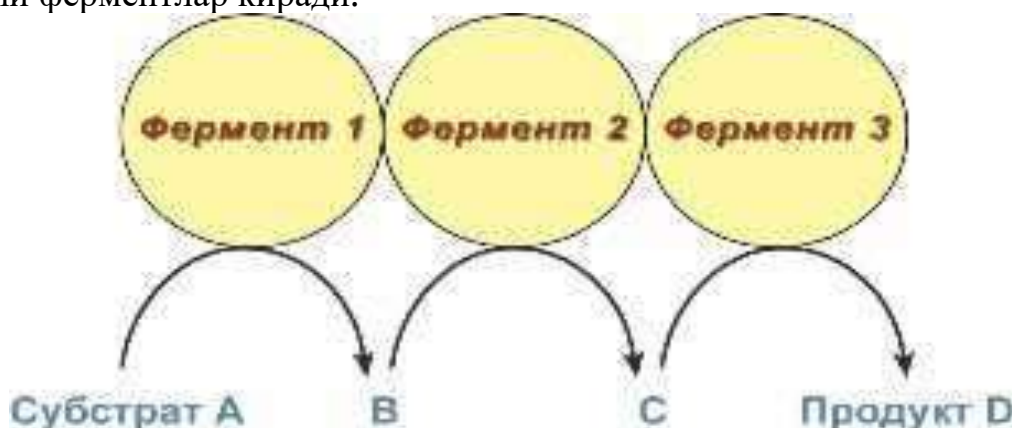
Гель-электрофорез методи ёрдамида яхши ўрганилган 4 ферментдан бири, бу ЛДГнинг изоферментлари бўлиб, улар пирозум кислотасидан сут кислотани ҳосил бўлиши қайтар реакциясини катализлайди.

ЛДГнинг бешта изоферменти иккита турли тип, аммо бир хил тузилган 4 та суббирликдан тузилган.



МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯР ФЕРМЕНТ СИСТЕМАЛАРИ

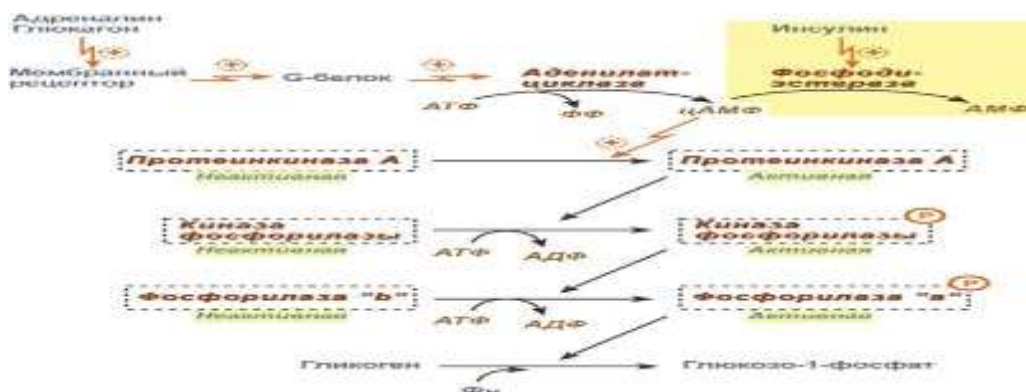
Ферментларнинг алоҳида гуруҳини надмолекуляр (ёки мультимолекуляр) фермент комплекслари ташкил этади. Уларни таркибига бир хил каталитик активликка эга протомерлар эмас, балки субстратни босқичли катализловчи турли ферментлар киради.



Бирор бир органелла (рибосома, митохондрия) ёки биомембрана билан боғланган мультифермент комплекслари 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 мультимолекуляр) фермент комплекслари
9. мультифермент комплекслари

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 усуллари 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 қуйидаги топшириқ берилади. 1-гуруҳчага ферментларни ковалент иммобиллаш, иммобилизацияланган хужайра ва ферментлардан саноатда қўллаш усуллари аниқлаш топширилади. 2-гуруҳчага ферментларни ковалент иммобиллаш механизмини аниқлаш топширилади. 3-гуруҳчага

иммобилизацияланган ҳужайра 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. Иммобилизациялашган фермент иштирокидаги жараёнлар иқтисодий самарадордир. Фруктоза ва глюкозани қўллаш билан глюкоизомеразани олиш жуда арзон бўлади чунки бу ерда иммобилизациялашган 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 тутагандан сўнг ферментни регенерлаш ва биотехнологик жараён учун қўллаш; в) реакция маҳсулотини фермент аралашмасисиз олиш бу эса озик-овқат ва фармасевтикада муҳим ўрин тутади. Жараёнининг бир ферментатив препаратни қўллаш билан тўхтўвсиз равишда давом эттириш мумкин. Тўхтўвсиз режимли яна бир асосий хусусияти ҳаракатчан ва ҳаракатсиз фазаларни таъмирлашувидир.

Иммобилизациялашнинг ковалент усулида, тузувчи арматура ролини ижро этадиган ишга мисол қилиб сут эмизувчилар ҳужайрасини биореакторда гормон ва бошқа қимматли моддалар олиш унинг култивация қилиниши олиш мумкин. Маълумки, ҳужайра ўсиши улардаги қаттиқ субстратдаги финосасияси билан чимулланади. Фиксация ДЕАЕ-сефидек зарарлари чўкмаси билан таъминланади (W.C. Ху эт ал., 1985).

“Ҳужайра-тутувчи” контакти кутбли ва ионли ўзаро таъсири, дисперсион таъсир очида адсорбцияда кучли бўлади.

Олдин амалиётда кенг қўлланган этанол олиш учун ачитқилар бактерия ҳужайраларини 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 ҳужайралари, эркин ачитқи ҳужайраларидан кўп нафас олиш активлигига эга. (В. Вожтисех, В.Йирху, 1984).

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

Химиёвий тикишсиз иммобилизацияда биокатолитик тизим хусусиятига тутувчининг кучсиз таъсири кузатилади. Ферментлар табиий активлигини сақлаб қолади ҳужайралар 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 десорбсияланади.

Аммо биокатализатор ва тутувчи орасидаги ўзаро таъсир, эритмани катта ион кучида мучаҳкамлик қолади. Бу шароитларда дисперсион ўзаро алоқа принципа адсорбция қулайроқ. Аспарагин кислотасини олиш учун ишлатиладиган аспортиза ферментни хлбчатобумажнўй толада идсарбсияланади. (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 оксилларни функционал гуруҳлари биокатализатор ва тутувчини топиши учун қўлланилиши мумкин. қисман кенг биокатализатор амина гуруҳи ва тутувчи корбанси гуруҳи орасида пепдид баъзилар ҳосил бўлишига олиб келадиган реакциялар қўлланилади. Реаксия учун сувни тортиб олувчи агент керак. Уларга сулфихролид, гидрозин ва бошқалар киради. Улар биокатализатор ва тутувчи орасидаги турли боғлар ҳолсил қилади.

Мисол учун биронсиан ва Сл-С-О-С₂-С₃ гидрооксин ва аминогуруҳни тикади. Тутувчи ва биокатализатор орасида тикувчи агентларсиз реакциялар ўтказилади. Бу хилдаги реакциялардан бири тутувчининг химиявий чруктурасида ОкС-О-СқО гуруҳ борлигига боғлиқ. Бу хилдаги реакцияларни амалга ошириш учун сиқинлашган материалларга малейн ангидрид тутувчи қўшимча чруктуралар қўшилади. Сху усул билан буқани сўвородка албумини глюнооксидаза ишқорли фазфатаза Бациллус черотҳермонХилус 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 глисерин қўшиб эритиш мумкин.

Биокатализаторнинг тутувчига химиявий бириктиш йўли билан иммобилизацияси юқори эффеқтивлиги билан ажралиб туради. Иммобилизацияни фермент активлигига таъсири турлича ва фермент чруктурасини ўзгариши учун уни корформасияси субстрат кириши учун дифузион чиксаниш билан белгиланади. Диффузион қийинчиликларни камайитиш мақсадида биокатализаторни айрим ҳолларда тутувчи молекуласи таркибидан чиқарилади. Уни спайсер орқали тутувчига тикилади. Мисол учун сефарозони галатозилтрансджджаза

иммобилазисиясидан тутувчи ва фермент орасида - $\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$ -кетмакетлиги 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 гуруҳига оксидлайди. Бу эса тутувчини аминогуруҳи билан реакцияга киришадиган (Ж. Кас эт ал., 1984).

Тутувчи агентсиз 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 металл функционал гуруҳлари координацион сферасидан чиқарилади. Тутувчи ва биокатализатор орасида координацион ёки ковалент боғ ўрнатилади.

Ферментлар ва ферментлар сичемаси амалий фаолиятнинг ҳар хил соҳаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат соҳаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органик синтез, кимийвий таҳлил ва. хзо. Схунга қарамасдан амалий энзимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жаҳон 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 чидамсиз. Иккинчидан, ферментлардан кўп маротаба фойдаланиш, уларни реагентдан ва реакция маҳсулотларидан ажратишнинг мураккаблиги натижасидир. Лекин ҳозирги шунда бу муаммолар ҳал қилинган.

Иммобилизацияланган ферментларнинг яратилиши натижасида амалий энзимология олдида янги принциплар ичиқболлар очилди. Дж. Нелсон ва Э. Гриффин 1916 йилдаёқ кумирда адсорбцияланган (яъни иммобилизацияланган) инвертаза каталитик фаоллигини сақлашини аниқладилар. 1936 йилда Дж. Пфанмйўллер ва Г.Схлейх ёғоилик кипигида адсорбцияланган протеолитик ферментлар (терини ошлашда ишлатилади) га патент олдилар. Ферментлар билан ташувчиларининг мучақкам конъюгатлари 1953 йилда Н.Грубхофер ва Д. Схлейт 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 эримайдиган ташувчиларга бириктиришдир. Лекин иммобилизация тушунчасини анча кенг тушуниш керак: бу оксилл молекуласининг (ёки унинг фрагментини) муҳитда ҳаракатини ҳар қандай чекланиши деб тушуниш керак. эримайдиган ташувчига бириктиришдан ташкари буни оксил маълумаларининг молекулалар ичидаги ёки

молекулалар ўртасидаги боғлар қуйи молекуляр бифункционал реагентлар ёки ферментни эрувчи полимерга бириктириб эришиш мумкин.

Иммобилизацияланган ферментлар бир катор 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. Охиргиси айниқса озиқ-овқат ва фермесеветика 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 имобиллаш 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 услубийқўлланма. 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 иммобиллаш билан ташувчининг хусусиятини ўзгартириш ҳисобига уларнинг каталитик фаоллиги бошқарилади.

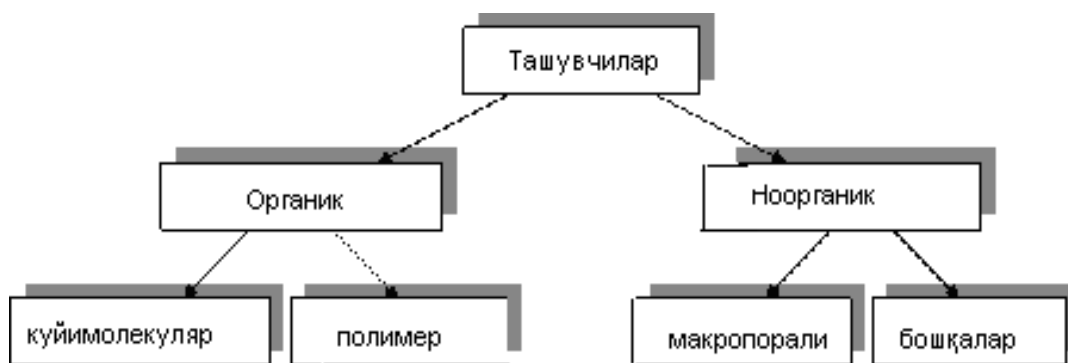
“Иммобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш еркинлигини исталган чекланишини англатади.

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, солиштира 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 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, 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 кимматроқдир.

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 холига 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 "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.

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.

Адсорбсион 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 рельефни такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбсион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовак қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбсион 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. Реаксион аралашмада қўпинча 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, ташқи муҳит омиллари, масалан pH, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантормайди. 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 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 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: 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 декчринлар (амило-, эритро-, ахро-, малтодекчринлар) ни, кейин малтоза ва ундан кейин глюкозани ҳосил бўлишига олиб келади. Крахмалнинг парчаланиши натижасида парчаланишнинг ахродекчрин 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 уреaza ферменти бўлиб, у сийдикчилни гидролизланишини катализлайди ва реакция натижасида аммоний карбонат ҳосил бўлади:



Бу иккала фермент учун ҳам pH-оптимум кўрсаткичлари жуда яқин, яъни сўлак амилазаси учун pH – 6,8 бўлса, соя уреазаси учун pH – 7,0 ҳисобланади. Сху 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 экчракдан 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 қолбага ўтказилади ва воронкага филтр жойлаштирилиб бошқа идишга филтрланади ҳамда дичилланган сув ёрдамида 10 марта суюлтирилади.

Соя уруғидан уреaza ферменти экчрактини ажратиб олиш. қуруқ соя уруғини яхшилаб янчиб майдаланади ва қўп қарра петролей эфири билан ишлов берилиб, ёғидан холис қилинади. Соянинг ёғсизлантирилган уни ҳаво ҳароратида филтр қоғози учида қурилади ва унга 5 0C да беш ҳажм бирлигида дичилланган сув қўшилади. Аралашма центрифугаланади ва ҳосил бўлган центрифугатнинг таркиби айнан уреaza 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 уреaza ферменти экчракти солинади. Аралашмалар яхшилаб аралаштирилади ва 20 минутга 38-40 0C 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 ёвқолади, чунки крахмалга сўлак амилазаси таъсир этиши туфайли у парчаланган бўлади, 2-пробиркага эса уреaza 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 °C ли термостатга жойлаштирилади. Пробиркалар термостатдан схиқарилиб, 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 °C 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. Энг 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-ситрат 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 0С 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 ўқиға амилазанинг нисбий концентратсияси, ордината ўқиға 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 сўлақдан 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.

4-Жадвал

Амилаза фаоллигига фаолловчи ва ингибировчиларнинг таъсири

№	Фермент	Субстрат	Ферментинг	Реакцион аралашманинг
---	---------	----------	------------	-----------------------

			таъсир этиш вақти, мин	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 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

7-лаборатория машғулоти

Мавзу: Чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш (2 соат)

Машғулотнинг мақсади: Талабаларга чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усуллари ўрганиш ҳақида маълумот бериш.

Мазкур лаборатория машғулоти чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усуллари ўргатишга бағишланган. Лаборатория ишини бажаришдан мақсад чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш, чиқиндисиз технологиялар яратишнинг биологик усуллари 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-гуруҳчага 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 куйидаги 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 узок 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 электроцўктириш 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 нонспесифик Ван-дер-Ваалс, электрочатиқ, 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 электрочатиқ 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 адсорбция қилинганда хужайра девори деформацияга учрагани кузатилган.

Ферментлар адсорбциясига таъсир этувчи омиллар

Адсорбция ўтиш жараёни ва фермент билан "ташувчи" орасидаги боғни муҳакамлиги, 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 ҳолос.

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, селлюлаза ферментини иммобилизация қилиш учун унинг субстрати бўлган селлюлозадан кенг фойдаланилади.

Ишни бажариш учун рухсат олиш ва назорат саволлари:

1. Чиқиндилар асосида сорбент синтезлаш ҳақида маълумот 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 мухити тайёрлаш ва стерилизация қилиш ҳамда продуцент суяқ ва қаттиқ озук мухитида ўстириш

Керакли асбоб ва жиҳозлар: Микроскоп, аналитик тарози, мензурка, петри ликопчаси, центрифуга, спирт лампаси, натрий гидрооксид, натрий сульфат, сульфат кислота, термостат, микробиологик кесгич, озук мухитлар, биотехнологик объект

Ишнинг бажарилиши: Ўрганилаётган бактерияларнинг биомассасини кўпайтириш учун озук мухити тайёрлаш, стериллаш, унга продуцентларни екиш ва биомасса олишни ўрганиш.

2) **Ишнинг ташкил этилиши:** мураббий гуруҳ талабаларини икки гуруҳга ажратади.

Биринчи гуруҳ талабалари: суяқ озук мухити таркибини тузади, стерилизация қилишади ва продуцентни екиб, зарур кўрсаткичларни таъминлаган ҳолда микробиологик қачалкага идишларни жойлаштиришади. Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суяқликка озук таркиби тузишлари лозим;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озук мухити тайёрлашади, стерилизация қилиб, продуцентларни екишади (Петри ликопчаларига) ва термостатга жойлаштиришади. Гуруҳчадаги талабаларнинг ҳар иккитаси турли хил ҳажмдаги суяқликка 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, стериллаш жараёнига тайёрлаб беради. Бундан ташқари микробиологик қачалкада қолдириладиган културал суяқликни 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 қишлоқ хўжалиги екинларини зараркунанда ҳашаротлардан ҳимоя қилишда унумли фойдаланиб келинмоқда.

Бу борада Бац.тхурингиенсис турига мансуб ентомопатоген бактериялар асосида тайёрланаётган инсектицидлар асосий ўрин тутди. Шу боисдан Бац.тхурингиенсис бактерияси асосида биопрепарат тайёрлаш учун мўтадил ва арзон озиқ мухити танлаш катта амалий аҳамият касб этади.

Адабиётлардан маълумки Бац.тхурингиенсис бактерияси штамmlарини ўстириш учун асосан глюкоза қўшилган маккажўхори, ачитқи ва қуруқ ачитқи экстрактлари асосида тайёрланган озиқ мухитларидан 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 тақазо этади.

Шу боисдан мазкур ишда биз Бац.тхурингиенсис ентомопатоген бактерияси штаммлари учун қуйидаги озуқа муҳитида ўстиришни тавсия етамиз: 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 културалар 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 еттирилган 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 ликовчалари (зарур миқдорда);
- ✓ картошка доналари (зарур миқдорда мураббий томонидан таъминланади);
- ✓ Бациллус тхурингиенсис бактериясининг тайёр култураси (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 машғулотида етарли даражада танишганлиги сабабли талабалар ушбу лаборатория ишини қуйидаги тавсиялар асосида бажаришади:

Стерилизациялаш шароити. Озиқа муҳити 105-110°C ҳароратда 1 атмосфера босимда 20 мин. давомида стерилланади. Озиқа муҳитининг pH кўрсаткичи:

стерилизациягача 7,0-7,2 ва стерилизациядан кейин 6,8-7,0 га тенг бўлиши лозим (зарур бўлганда рН кўрсаткичи мўтадиллаштирилиши керак, културанинг мўтадил ўсиб ривожланиши учун озика муҳити пХ кўрсаткичини 7,4 да ушлаб туриш мақсадга мувофиқдир).

пХ кўрсаткичи (суяқ озика муҳити учун). пХ кўрсаткичи ферментация жараёнигача 6,8-7,0 бўлиши керак; ферментация жараёни охирида пХ кўрсаткичи кўтарилиб кетади (8,0). Табиийки озика муҳитининг ишқорий ҳолатга ўтиши кристалларни кичик бўлакларга бўлиниб кетишига олиб келади ва бу кейинги кристалл оксилларни ажратиб олишда қийинчилик туғдиради. Өó áîèñääí ðâðîáíðàðèý æàðà, íè òóáääáííääí ñûíä, áèîîññàíè æððàðèá íèèøää éóëüòòðàë ñóðķèèèèíä 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 микдорини микроскопик таҳлил қилишни ўрганишдан иборат.

2) **Ишнинг ташкил этилиши:** мураббий гуруҳ талабаларини икки гуруҳга ажратади.

Биринчи гуруҳ талабалари: културал суяқликдан микроб биомассасини центрифугалаш усулида ажратиб олишди ва ундан белгиланган тартибда кристалл оксилларни ажратишди;

Иккинчи гуруҳ талабалари: қаттиқ озика муҳитида ўстирилган биомассани йиғиб, ундан споралар ва кристалл оксилларни белгиланган тартибда ажратишди.

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 этилган маълумотлар асосида коллоквиум топширади ва машғулотга ажратилган рейтинг балини олади. Рейтинг балини тўплай олмаган талаба кейинги машғулотгача ушбу лаборатория ишини қайта топшириши мумкин.

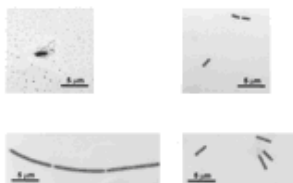
3) Тушинтириш:

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-кислота) тозалаш усулидан фойдаланилган бўлса, биз биринчи босқичдаги гомогенизаторда аралаштириш ва тиндиришдаги 1% ли натрий сульфат ўрнига културани ўстиришда фойдаланилган суяқ озика муҳитидан, охириги босқичда еса сувдан фойдаланамиз.

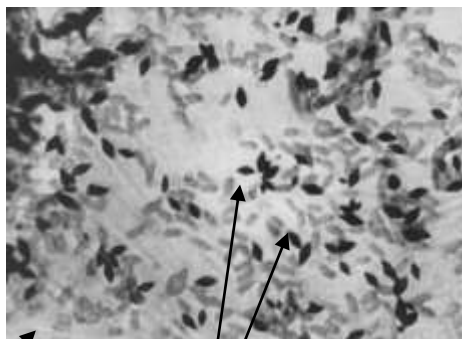
Пендлтон усулини бундай модификация қилиш бизга Бац.тхурингиенсис вар.тхурингиенсис бактерияси штаммларидан 99% дан кўпроқ тоза кристалл ажратиб олиш имконини беради.

Ушбу оқсилларни тоза ҳолда ажратиб олиш қишлоқ хўжалиги, медицина ва фундаментал тадқиқотларда катта аҳамиятга эга.

Талабалар иш давомида ушбу култураларнинг қуйидаги расмлардагидек манзараларни кўришлари мумкин:



Продуцентларнинг вегетатив ҳужайралари



Спора ва кристалл оқсиллар 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 ликобчалари (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 вариантини (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 оқсил моддаси ажратишнинг усулини айтиб бериши ва амалда бажара олиш даражасини кўрсата олиши;
6. ҳар бир гуруҳ ва кичик гуруҳчалардаги талабалар ажратган оқсил 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 (4 соат)

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,озуқа 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 озуқа 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 ифлослантормасдан фойдаланиш имкониятини яратади.

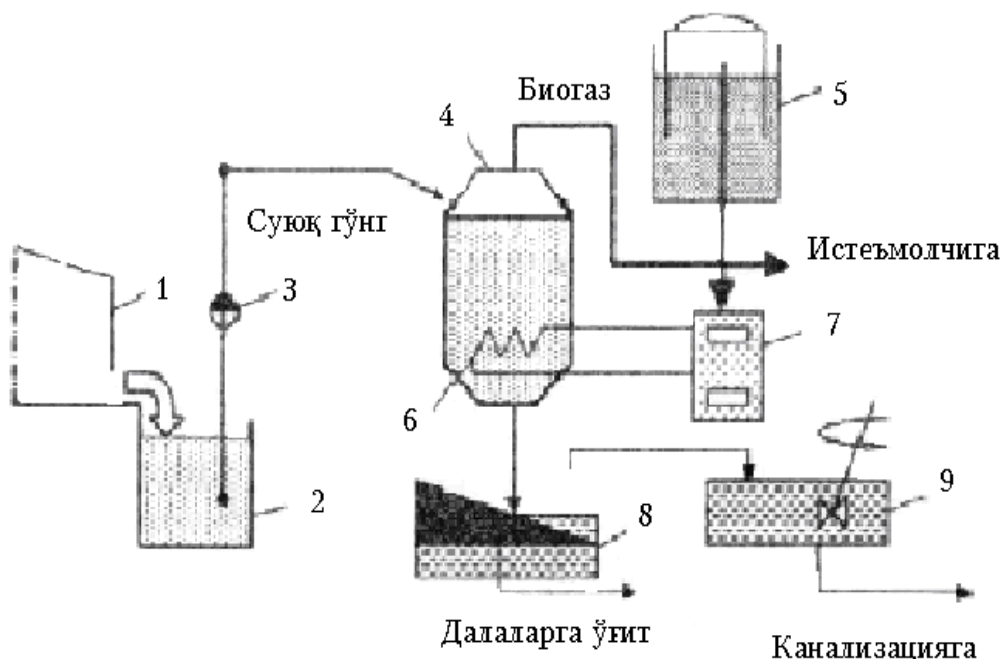
Ҳайвон ахлатларидан ва оқова сувларидан оқилонга фойдаланишни йўлларида бири уларни анаэроб шароитда бижғитишдир. Бу жараёнда ахлатни зарарсизлантирилиб, бир вақтни ўзида уни энг муҳим органик ўғитлик сифатини сақлаб қолган ҳолда, ундан биогаз олиш мумкин.Метанли бижғитиш ёки биометаногенез – биомассани 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 газы, баъзида клар-газ ҳам деб юритилади,кўк- ҳаво ранг бериб алангаланади, 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 куриб ишга туширилган еди. Бу иншоотни санитария вазифасидан ташқари кўчаларни ёритиш учун электр энергияси тайёрлаш сарф бўладиган биогаз ишлаб чиқариш бўлган.

Чиқиндиларга анаэроб ишлов бериш узок вақт сув тозалаш стансияларини чўкмаларини ва чорвачиликни чиқиндиларини мўтадиллаш мақсадида ишлатиб келинган. Аммо, 1970 йиллардаги энергия танглиги туфайли кишлоқ 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-газгоilder; 6-иссиқлик алмаштирувчи; 7-қозон; 8-гўнг сақланадиган жй; 9-аеротенк.

Бу технологик жараён қуйидагича олиб борилади. Ҳайвонлар сақланадиган молхоналардан (суратда 1) гўнг тўпланадиган идишга юборилади (2), кейин насос (3) ёрдамида уни метантенк (4) (гўнгни анаэроб бижғиши учун махсус қурилма) га юборилади. Бижғиш жараёнида ҳосил бўлган биогаз, газгоilder (5)га келиб тушади. Ҳанондан 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. Бижғиб бўлган гўнг, гўнг сақланадиган (8) чуқурликка туширилади.

Метантенкда жараён учун зарур бўлган барча шароит ташкил етилади. (ҳарорат, органик моддалар миқдори, pH ва бошқалар.) Метантек термокулясия қилинган бўлиб, бижғиш жараёни меёрида кетиши учун керак бўлган ҳарорат доимий равишда ушлаб турилади. Унда шунингдек гўнгни ҳайдаб туриш учун мўлжалланган ускурма ўрнатилган. Метантенкка гўнг бир меёерда, бижғиш жараёни бир хил кетадиган ҳолатда киритиб турилади.

Бижғиш даврида гўнгда микроорганизмлар ривожланади ва бирин- кетин органик моддаларни кислоталарга парчалаб беради. Ҳосил бўлган кислоталар метан ҳосил қилувчи ва синтроф микроорганизмлар таъсирида газсимон махсулотлар – метан ва карбонат ангидридига айланади. Гўнгни анаэроб бижғиш 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 (оқсил, 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 бижғиш (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 ҳил 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.

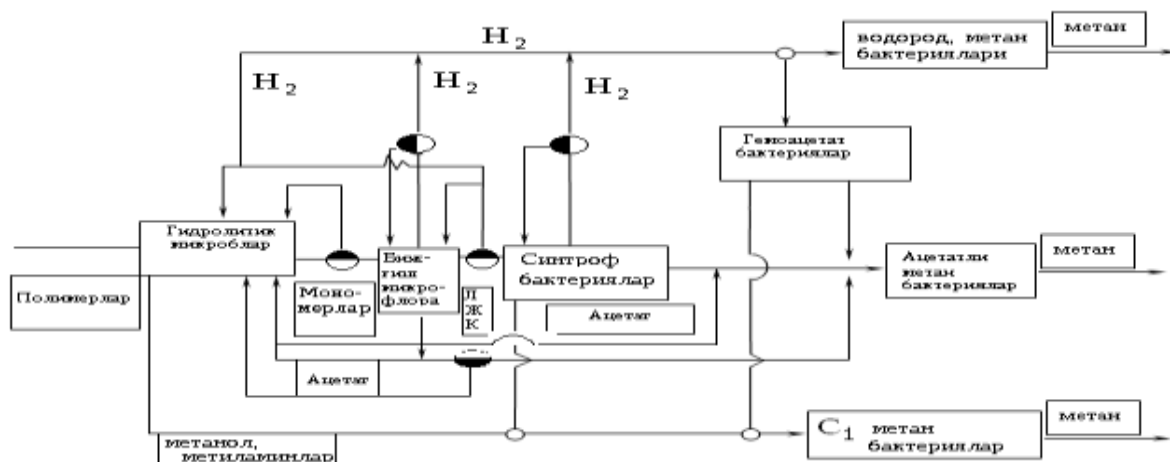
Метаногенларни субстрат спесифеклиги, уларни олдинги босқичда иштирок етган бактериялар билан трофик алоқасиз ривожланишига йўл қўймайди. Ўз навбатида метан ҳосил қиладиган бактериялар бирламчи анаэроблар синтез қилган моддаларни ишлатиш орқали шу бактериялар бажараётган реакциялар имкониятлари ва уларни тезлигини аниқлаб беради.

Метан ҳосил бўлишда бошқариш функциясини бажараётган марказий метаболит бўлиб, водород хизмат қиладди. Тизимда водородни парсиал босимини паст ҳолатда ушлаб туриш ҳисобидан уни турлар орасидан бирламчи анаэроблар метоболизми 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 метоболизми 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 миқдори (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, ангидриди ва бошқа газлар	30-35% карбонат
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 қўйдилар яни уларни кўпайишлари учун мутлақо анаэроб 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	2С	
Хажм қисми %	4	O ₂	1	3	2С	100
Ўниш иссиқлик хажми мДж/м ³	55-70	27-44	10,8	2	2,8	21,5
Ўниш харорати 0С	65-750	----	58	-	---	650-750
Зичлиги, гр/л; меъёрий чегара	0,7-10	1,9-40	0,0-31	1-3	,54-49	1,20-3,20

Биогазни физикавий хусусиятлари уни ишлатиш имкониятларини кўрсатади. Ўнишни хажмий иссиқлиги, ўниш харорати, ўниш чегараси асосан Ш₄ миқдори билан белгиланади чунки Х₂ ва Х₂С жуда ҳам кам бўлган миқдори бу кўрсаткичга таъсир етиш даражасида емас.

Биогаз ёқилғи сифатида муваффақият билан ишлатилиб келинмоқда уни иситиш ускурмаларида, сув иситадиган қозон хоналарида, газ плиталарида, совутгич ускурмаларида (абсорбсион типдаги), инфра қизил нурлатгичларда автомобил ва трактор ҳаракатлантирганчларида ва хоқауларда ишлатиш мумкин. Карбюраторли ҳаракатга келтирувчилар осонгина газга ўтказилиши мумкин, бунинг учун карбюраторли аралаштиргичга алмаштириш кифоя.

Биогаздан электр энергияси олинганда фақатгина уни 30% электр энергияга айланади холос, 70% чиқинди иссиқликдир. Ундан сув иситиш, хайвонларни сақлаш (молхоналарни иситиш), иссиқхоналар ёки уларни иситиш, қуритғич хоналари ёки ускурмаларида хавони иситиш, микроклиматни бошқариш ва бошқа мақсадларда фойдаланиш мумкин.

3-жадвал.

Ҳар хил ёнилғиларни ўниш иссиқлигини нисбати

Ёнилғи тури (ёниш иссиқлиги)	Биогаз (м³да) Ш4 сақловчи (%)			Табий газ 1м³ 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/м³)	1,0	0,91	0,80	0,60	0,44	0,47	0,56	5,6
Табий газ (33,5 МДж/м³)	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, м³	1,62	0,02	0,32
Бир тонна куруқ гўнгдан чиқадиган биогаз хажми, м³	300	600	500

Бундан ташқари, гўнгни бижғитиш уни дезодарасия қилади (зарарсизлантиради), гелментларини, ҳамда ёввойи ўсимликлар уруғларини йўқотади, ўғицимон моддаларни енгил сўриладиган шаклга (минерал шаклга) ўтказди. 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 санергия манбаи сифатида, балки қўшимча энергия манбаи сифатида қаралмоғи лозим.

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

АМАЛИЙ
МАШҒУЛОТЛАРИ

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2021

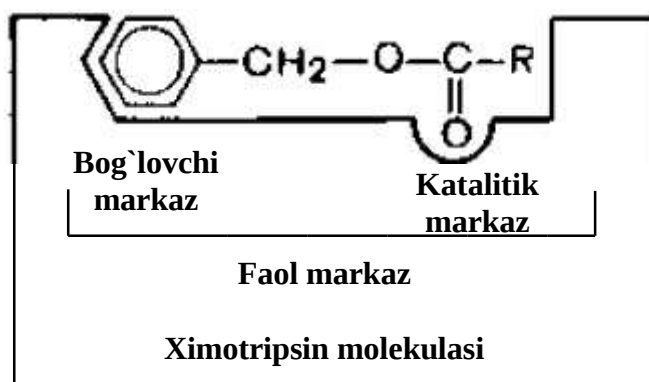
1-2-3-Амалий машғулот

Мавзу: Ферментлар фаол марказининг тузилишини ўрганиш. Ферментлар барқарорлигини таъминловчи омилларни ўрганиш Иммобилланган ферментларни тиббиётда ва технологияда қўллаш имкониятларини ўрганиш (2 соат)

Ферментатив реакцияларда иштирок этадиган субстрат молекулаларини фермент молекулалари катталиги билан қиёсланса субстрат молекулалари унча йирик бўлмаслиги аниқ бўлиб қолади. Шу боис ферментнинг субстрат билан таъсирланиши туфайли ҳосил бўладиган фермент-субстрат комплексида ферментнинг маълум бир чегараланган аминокислоталардан иборат бўлган пептид занжиригина иштирок этади.

Шу сабабли ферментнинг “фаоллик маркази” деган тушунча пайдо бўлди. Бу атама билан фермент молекуласида аминокислоталар комбинациясининг катализ жараёнида субстрат молекуласи билан бевосита мўжизавий таъсирланишини таъминланиши тушинилади. Мураккаб ферментларда фаол марказ таркибига простетик гуруҳлар ҳам киради.

Фаол марказда субстрат билан бевосита таъсирланувчи каталитик марказ ва субстратга мосликни махсус таъминловчи ва уни фермент билан комплексини шакллантирувчи боғловчи марказ ёки тўқнашувчи (“лангар”) майдон фарқланади.

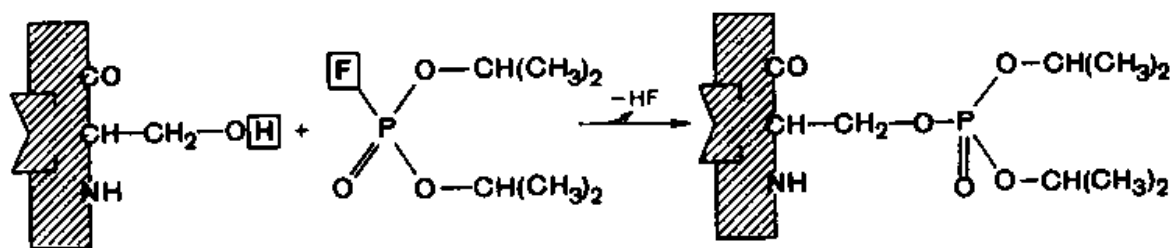


Химотрипсиннинг марказида гистидиннинг иккита ва сериннинг битта қолдиқи борлиги аниқланган. Ингибитор таҳлили асосида ҳар хил гуруҳларга кирувчи ферментларнинг фаол марказларида умумийлик борлигини аниқлаш борасидаги тадқиқотлар олиб борилган.

Хусусан дизопропил-фтор-фосфат (ДФФ) дан фойдаланганда асетилхолинни холин ва сирка кислотагача гидролизланишини катализловчи ферменти тўлиқ ўз фаоллигини йўқотиши маълум бўлди.

Бу модда тузилиши жиҳатдан холинга яқин бўлиб фаол марказда жойлашган сериннинг ОН гуруҳи билан таъсирланади, натижада ферментнинг фаоллиги йўқолади. Бошқа қатор ферментларнинг фаол марказида ҳам серин бўлгани

сабабли ДФФ томонидан шу аминокислотани фосфорлаши туфайли фаолсизланиши юз беради.



Фаол фермент

ДФФ

Нофаол фермент

Қатор ферментларнинг “каталитик фаол” серин аминокислотасини яқинидаги аминокислоталарни аниқлашга оид ишланишлар олиб борилган. қуйида Малер ва Крдес бўйича эстераза ва протеиназаларнинг серин атрофида жойлашган аминокислоталар кетма-кетлиги келтирилган (Жадвал 2).

1-жадвал

Баъзи ферментларнинг серин аминокислотаси атрофида жойлашган аминокислоталар кетма-кетлиги

Т/Р	Фермент.	Серин атрофида жойлашган аминокислоталар кетма-кетлиги.
1	Химиотрипсин	→ Гли-Асп-Сер-Гли-Гли
2	Трипсин	→ Гли-Асп-Сер-Гли-Гли
3	Тромбин	→ Гли-Асп-Сер-Гли-Про-Вал
4	Эластаза	→ Асп-Сер-Гли
5	Бутириолинестераза	→ Асп-Сер-Гли
6	Ацетил холин эстераза	→ Гли-Глу-Сер-Ала
7	Ишқорий фосфатаза	→ Гли-Глу-Сер-Ала-Гли-Гли

Денатурасияни келтириб чиқарадиган ҳар қандай таъсир, яъни ферментнинг учламчи тузилмасини бузилиши, фаоллик марказ тузилмасини бузилишига ва бунинг натижасида фаолликнинг йўқолишига сабабчи бўлади.

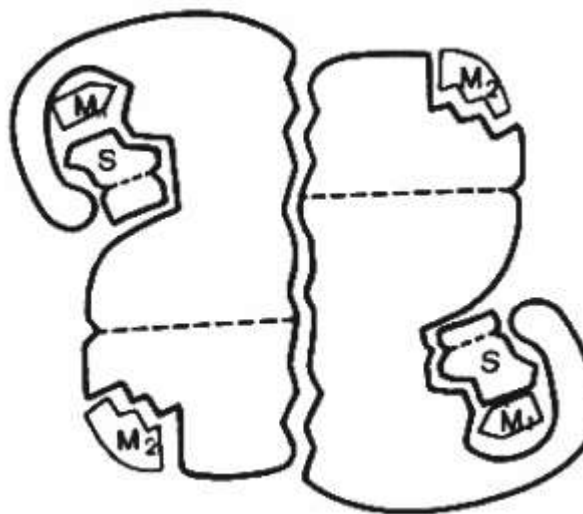
Фаол марказдан ташқари фермент молекуласида аллостерик марказ ҳам бўлиши мумкин.

Аллостерик марказ ферментнинг молекуласи субстратдан фарқладиган одатда паст молекулали (еффе́ктор ёки модификатор деб номланган) модда (лиганд) бирикадиган бўлаги ҳисобланади. Ферментнинг аллостерик марказига еффе́кторнинг бирикиши унинг учламчи, кўпинча тўртламчи тузилмасини ўзгаришига сабабчи бўлади. Бундай ҳолат ё ферментатив фаолликни сусайтиради ёки аксинча кучайтиради.

Фаоллиги фаол марказнинг ва шу билан биргаликда аллостерик марказнинг

ҳолатига боғлиқ бўлган ферментларни аллостерик ферментлар деб юритилади. Уларнинг фарқли хусусиятлари олигомер фермент молекуласида маконда бир-биридан ажралиб турадиган бир неча хил фаол марказлар ва бир неча хил аллостерик бошқарувчи марказларнинг бўлишидадир.

Схематик жиҳатдан аллостерик фермент куйидаги расмда кўрсатилган:



Расдан кўриниб турибдики, ҳар бир симметрик тузилмага ега бўлган иккита протомер биттадан субстрат (С)ни ўзига бириктирувчи фаол марказ (М) га ва биттадан эффекторни ўзига бириктирувчи аллостерик марказ (М2) га ега, яъни фермент молекуласида иккита марказ мавжуд.

Ферментлар ва ферментлар системаси амалий фаолиятнинг ҳар хил соҳаларида кенг қўлланилади. Бу озиқ - овқат, фармасептика, тўқимачилик, тери ошлаш ва бошқа саноат соҳаларида, тиббиётда, қишлоқ хужалигида, органик синтез, кимиёвий таҳлил ва. хзо. Шунга қарамасдан амалий энзимология узоқ вақт ривожланмади, чунки ферментларнинг нархи жаҳон 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 ҳозирги шунда бу муаммолар ҳал қилинган.

Иммобилизацияланадиган ферментларнинг яратилиши натижасида амалий энзимология олдида янги принциплал истиқболлар очилди. Дж. Нелъсон 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 мустаҳкам 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 оксилл 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 эга.

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 фермесеветика 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 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 еттириб (нур. товуш) бошқариш мумкин. Бу асосда механо ва товушга сезгир датчиклар, паст товушларни кучайтиргичлар ва яратиш имконини беради.

4-Амалий машғулот

Мавзу: Иммунобиотехнология. Иммуноензим таҳлили.

Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсор

(2 соат)

Иммуноензим таҳлили 60-йилларни ўрталарида вужудга келиб, аввал, гистологик препаратда антигенни идентификациялаш, кейин еса иммунодиффузия ва иммуноэлектрофорез тестларида пресипитация чизикларини аниқлашда қўлланилган. Бундан ташқари биологик суюкликларда антигенлар ва антителаларни микдорий таҳлили учун ишлатила бошланган. Методни гетероген усулини ишлаб чиқишда Е.Энгвалл ва Р.Перлманн, шунингдек, уларга боғлиқ бўлмаган равишда В.К Ван Веерен ва А.Шуурслар 1971 йили уз тадқиқот ишларини олиб борганлар ва ушбу

усулнинг муаллифи хисобланадилар. 1972 йили еса Е.К. Рубенштейн уз шогирдлари билан ИЭТ гомоген усулини ишлаб чиқишга муваффақ булганлар. Ушбу ИЭТ лари усуллари ишлаб чиққан муаллифлар айнан, уз тадқиқот ишларида ва шунингдек, амалиётда ИЭТ талабларига жавоб бера оладиган фермент молекулаларини ва уларнинг кофакторларини нишон сифатида куллаб, конъюгат олиш мумкинлигини исботлаганлар. Сабаби юкорида айтиб ўтилгандек, ферментлар уз субстратлари иштирокида кимёвий реакцияни 10-10 мартаба тезлаштирар эканлар, шу билан бирга улар антиген ва антителалар уртасида буладиган иммунокимёвий жараёнларнинг сезгирлигини хдм бир неча бор ошириб, аниқланиши керак булган модда микдорини (пкМ) жуда кичкина кийматларда аниқдаш учун керакли ферментатив реакция турини катализлаш имкониятга ега моддалар хисобланадилар. Шунинг учун иммунокимёвий реакцияларда, факат фермент молекулалари емас, балки уларнинг кофакторлари хдм махсус маркерлар сифатида ИЭТ нинг турли усулларида кенг кулланилмоқда.

Хрзирги вақтда иммуноензим тахдили (ИЭТ) усулининг хилма-хил турлари ишлаб чиқилган. ИЭТ турли хил моддаларни аниқлаш учун кенг кулланилади. Жумладан, доривор препаратларни, гормонларни, антителаларни, вирус ва бактериал антигенларни, озик-овқат токсинларини, фитотоксинларни, наркотик моддаларни, хдмда сифилиз, малярия таксоплазмоз, алвеокок, кизилча ва гельминтларни, салмонеллезни ва касаллик тугдирувчи микроорганизмларни... диагностика килишда кенг кулланилади. Модомики, ИЭТ антителаларни аниқдашда ҳам кулланилар экан, бу еса уз навбатида куп касалликларни бошланиш боскичида олдини олиш ва серодиагностика килиш имкониятини яратади.

ИЭТнинг асосий мохияти шундан иборатки, биокатализатор молекуласи реакция кетадиган зонада антиген билан ёки антитела билан боғланган шаклда булишидир. Антиген ёки антителанинг фермент молекуласи билан боғланган шакли конъюгат деб юритилади. ИЭТни утказиш вақтида антиген антитана молекуласи билан боғлангандан сунг. ушбу комплексни аниқлаш учун, ферментнинг субстрати киритилади ва реакция натижасида хосил буладиган махсулотлар аниқланади.

Шуни айтиб утиш лозимки, ИЭТда ферментатив реакцияни детексия килиш хосил булган махсулотни аниқдаш билан чегараланмай, балки реакцияси натижасида рангли узгариш, иссиқлик ажралиш ёки ютилиш. флюоресенсия, парамагнит хусусиятларни ёки бошқа физик-кимёвий параметрларни узгариши натижасида аниқлашни амалга ошириш мумкин.

Хрзирги кунда кулланиладиган иммуноензим тахлили методларининг умумий қуринишини схематик равишда қуйидагича изохлаш мумкин.

И боскич. Иммуно компонент сифатида кулланиладиган моддаларни олиш:

- Оксилларни макромолекуларни модификациялаш;
- Конъюгантларни олиш;
- Микроорганизм ва вирусларни антиген сифатида куллаш учун тайёрлаш.

ИИ боскич. Антигенларни ажратиш, тозалаш модификациялаш.

ИИИ боскич. Антителаларни ажратиш, тозалаш ва модификациялаш:

- Иммунизация юли билан аниқ антигенга антитела олиш.

- Конъюгатларни синтези учун ферментларни ёки

уларнинг субстратларини, кофакторларни ёки ушбу ферментни эффекторларини олиш.

- Ташувчиларни танлаш ва уларга антигенларни иммобилилаш.

- Маълум антигенга қарши олинган антителаларни ажратиш ва тозалаш.

- фермент конъюгатларини антитела ёки антиген билан " олиш.

- Иммобилиланган Антигенларни ёки антителаларни олиш.

- Бав фрагментларни ажратиш ва уларни модификациялаш ва иммобилилаш.

ИВ боскич. ИЭТ методларини ишлаб чиқиш:

- ИЭТни утқизиш усулини танлаш ва ишлаб чиқиш.

- ИЭТни утқизиш ва олинган натижани аниқдаш учун керакли асбобни танлаш.

- Аниқланадиган мода учун калибровка тайёрлаш ва аниқлашни амалга ошириш.

ИЭТни утқизишда иммун компонентларнинг тозалик даражаси муҳим аҳамиятга эгадир. Сабаби ИЭТнинг сезгирлик даражаси компонентларга ва айниқса унда нишон сифатида қулланиладиган фермент молекуласи фаоллигига боғлиқ бўлади. Антитела серологик жихатдан фаол ва антигенга нисбатан титри юқори бўлиши учун, антигеннинг иммуногенлик хусусияти юқори бўлиши бўлиши керак. Шунда антиген керакли антителаларнинг узлуксиз синтезини амалга оширишга қодир бўлади. ИЭТда ишлатиладиган иммун компонентларнинг титри юқори бўлмаса, ушбу оксиллар модификациядан сунг денатурацияланиши ҳисобига инактивланади. Айниқса токсинлар ҳолатидаги оксил табиатли баъзи моддалар, вируслар, баъзи микроорганизмларни фаол бўлмаган штаммларини антиген сифатида олиш конъюгатларни кимёвий синтезида ижобий натижа бермайди. Шу сабабли антиген антителаларни маълум манбадан ажратиш ва уларни тозалаш ва калибровка егри қизикларини тайёрлаш талаб этилади. Антителаларни тозалашда биосферик хроматография Қулланилади. Бунинг учун аввало биоспецифик ва имуносорбентлар синтезлаш керак. Ушбу имуносорбентлар ИЭТнинг гетероген вариантларини ишлаб чиқишда керак бўлади. Имуносорбентлар олиш учун мобилизацияланган антигенларни синтезлаш зарур. Чунки гетероген ИЭТ қаттиқ ташувчи юзасида олиб борилади.

ИЭТни қайси усули амалга оширасин унда албатта нишон сифатида фермент молекулари ишлатилади деб юқорида айтиб ўтилган еди. Шу сабабдан аввало антиген ёки антитела конъюгати синтезланади. Бунинг учун антигенга нисбатан аниқ специфик бўлган антитела тикувчи компонент билан модификацияланади яъни антитела фермент молекуласига кимёвий

(ковалент) боғланади. Кимёвий синтезланган конъюгатларнинг ферментатив ва серологик фаолликлари аникланади. Конъюгатлар таҳлилни утказиш учун яроқли булса, нихоят сунги боскичда ИЭТ утказилади. Олинган маълумотлар керакли асбоблар ёрдамида таҳлил қилинади. Бу уринда шуни қайд этиш лозимки, иммуноензим таҳлилини утказишда бир канча қоидаларга риоя қилиш талаб этилади.

Иммуноензим таҳлилини амалга ошириш қоидалари

Иммуноензим таҳлилини ишлаб чиқишда, яратишда бир қатор қоидаларга риоя қилиш керак. Биринчидан аникланаётган моддани, яъни антигенни таҳлил қилишда юқори даражада мўе келадиган, унга ута спесифик булган антитаналарни танлаб олиш талаб этилади. Иккинчидан шундай ферментни нишон сифатида ишлатиш учун танлаб олиш керекки, у антиген ёки антитана билан шунингдек, ташувчи билан кимёвий усулда боғланганда ҳам, уз хусусиятини узгартирмаслиги ва бир вақтнинг узида антиген ва антитана уртасида кечадиган иммунологик реакцияга таъсир қилмаслиги ва айниқса, ферментатив фаоллигини саклаб қолиши керак. Учунчидан ИЭТни утказишда қулланиладиган реагентлар ва асбоб усқуналар, шунингдек иммун компонентларни иммобиллаш учун ишлатиладиган ташувчилар ҳар томонлама қулай ва иқтисодий жихатдан талабга жавоб берадиган бўлиши лозим. Ниҳоят аҳамиятли омиллардан яна бири ИЭТда компонентларни барқарорлигини таъминлаш муҳимдир. Бунда юқори барқарорликка ега булган компонентларни олиш учун тикувчи агентлар ёрдамида ташувчиларга иммобиллаш жараёнини амалга ошириш ёрдамида еришиш мумкин. Бу уринда шуни айтиб утиш лозимки, иммуноензим таҳлилини, асосан иккита қатта усулга ажратиш мумкин: Гетероген ва гомоген усулларга. ИЭТнинг гетероген усули қаттиқ ташувчи иштирокида олиб борилади. Бунда иммун комплекс ташувчига иммобилланган антитана ёки антиген ва фермент билан нишонланган антитана ёки антиген билан иммун комплекс ҳосил қилади ва иммун реакция амалга ошгандан сунг, ферментатив фаолликни улчаш орқали антиген миқдори калибровка қизиги ёрдамида аникланади.

ИЭТнинг гомоген усулида еса барча жараёнлар суюқ муҳитда, яъни қаттиқ ташувчи иштирок етмаган шароитда олиб борилади. Иммун комплексни регистрасия қилиш жараёни қаталитик ёки фермент реакциялари кетиши билан боғлиқ узғаришлар асосида амалга оширилади. Юқорида қайд етилган иқкала усул учун ҳам умумий талаб шундан иборатки, антиген ёки антитаналарни стандарт еритмалари асосида олдиндан қолибровка қизигини яратиш керак бўлади. Чунки, аникланаётган модда миқдорини аниқлаш, ИЭТ натижасини таҳлил қилиш ана шу қолибровка асосида қурсатиб берилади.

5-Амалий машғулот

Мавзу: Векторлар ва уларни қўллаш (2 соат)

Рекомбинант ДНК ни автоном репликасия бўлиши учун жавоб берадиган ДНК бўлаги вектор молекулалари дейилади. Вектор молекулалар ўз вазифасига кўра икки типга бўлинади. Биринчиси автоном репликасия 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, плазмидлар ва ўсимликларни хлоропласт ҳамда митохондриял ДНК лари ўташи мумкин.

Бактерия ва тубан еукариот организмлар ҳужайраларида асосий хромосомадан ташқари, кичик ўлчамга ега бўлган халқасимон ёки чизиксимон структурага ега 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 чакирувчи микробларнинг антибиотикларга чидамлилигини нихоятда оширади. Плазмидлар ўз хусусиятига кўра иккига бўлинади.

Биринчиси транспозон ёки бактериофаг ирсий молекуласи каби ҳужайра 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. Ҳужайра бўлингандан 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 бўлингандан қиз ҳужайралар орасида тасодиқий равишда

таксимланади. Шу билан бирга автоном плазмид бир ҳужайрадан иккинчисига ҳужайра қобиғи ва мембранасининг тешикларидан ўта олади. Ҳўжалик 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 реассосиасия қилинади. Нуклеотидлар орасида уланмай қолган бўшлиқ ДНК-лигаза ферменти ёрдамида ўзаро бириктирилади. Олинган рекомбинант ДНК бактерия ҳужайрасига трансформасия қилинади. Хромосомал ДНК да мавжуд генларни тўла клонлаш учун ДНК ўлчамига ва олинган клонларни сонига еътибор бериш керак. Бу кўрсаткич қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади,

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

бунда, x -клонланаётган ДНК ўлчами, y -гаплоид геномнинг ўлчами ва p 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 реассосиасия 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 нуқтаси) вазифасини ўтайди.

Синтез қилинган кДНК молекуласи қисқа учли икки занжирли структура билан тугалланади. кДНК синтезида матриса 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 қуйидагича амалга оширилади - рекомбинант

плазмида денатурасия қилинади (100⁰С ҳароратда 5 мин., 0,2 Н NaOH эритмасида 15 мин.) бир занжирли ДНК молекуласи стабил қўзғалмайдиган ҳолатда туриши учун нитроселлюлоза филтрига бириктирилади. Олинган филтр [γ -³²P] 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 денатурасия қилиниб нишонланган иРНК молекуласи ажратиб олинади (елюсия ёрдамида). Олинган иРНК молекуласи ҳужайрасиз оксил синтез қилиш тизимида текшириб курилади. Ҳосил бўлган оксил молекуласининг идентификация қилиш йўли билан индивидуал генларни ажратиб олиш амалга оширилади.

6-Амалий машғулот

Мавзу: Ген муҳандислигида ишлатиладиган ферментлар (2 соат)

Табиатда бирор микроорганизм ҳужайрасига ташқаридан ёт генетик материал кирса, у дарҳол ҳужайра 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 бўлақка бўлади. Бундай рестриктазаларга Алу I, Дра I, Ҳае IIII, Ҳпа I, ЭцоR B, Ҳинд III, Пву III, Pса I, Сца I, Сма I 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 I, Бам ҲI, ЭцоRI, 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 бўлақларини 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 рестриксион эндонуклеазалардан фойдаланиб қўплаб бўлақларга бўлиш мумкин. Эндонуклеаза иштирокида парчаланган ДНК

бўлаклари электрофорез мосламасида махсус молекуляр "елақ" тешикларидан юқори кучланишли электр майдони таъсирида молекуланинг заряди ва ўлчамига биноан ажратилади. ДНК бўлаги махсус бўёқ билан бўйаш натижасида ултрабинафша нурлари ёрдамида оддий кўз билан кўрилади.

1-жадвал.

Ген мухандислигида қўлланиладиган баъзи бир рестриктазалар тавсифи

Рестриктазалар	Рестриктаза олинган микроорганизмлар	Рестриктазаларнинг “аниқлайдиган” ва кесадиган охириги учлари
Эцо РИ	Эшеричиа цоли РИ	-Г-А-А-Т-Т-С- -С-Т-Т-А-А-Г-
Ҳинд ИИИ	Ҳаеомпхилус инфлуензае	-А-А-Г-С-Т-Т- -Т-Т-С-Г-А-А-
Сал И	Стрептомйцес албус	-Г-Т-С-Г-А-С- -С-А-Г-С-Т-Г-
Бам И	Бациллус амйлоликуефациенс	-Г-Г-А-Т-С-С- -С-С-Т-А-Г-Г-
Ҳпа ИИ	Ҳаеомпхилус параинфлуензае	-С-С-Г-Г- -Г-Г-С-С-
Алу И	Артробактер лутеус	-А-Г-С-Т- -Т-С-Г-Т-
Ҳаеи ИИИ	Ҳаеомпхилус аегйптиус	-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 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. Рестриксион 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 мухандислиги биотехнологиясининг моддий асосларига бактерияларнинг клонлаш, трансформасия ва трансдукция жараёнлари, транспозонлар, плазмидалар ва рестриксион эндонуклеаза ферментларини тўла фундаментал асосларини ўрганиш киради. Юқорида қайд қилинган биологик фаол моддалар ген мухандислиги биотехнологиясининг амалий жараёнларида ўта қимматли омил ҳисобланади.

7-8-Амалий машғулот

Мавзу: Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оксил ва гормонлар (интерферон, инсулин) олиниши. Ўсимликлар ген муҳандислиги. Тi-плазмидаларни ва фитовирусларни ўсимликлар ген муҳандислигида ишлатилиши (2 соат)

Оксил моддалари ҳаётий зарур вазифаларни бажариб ҳар қандай тирик организмларнинг ҳужайраларини ташкил етувчи компонентлардан энг зарурийси ҳисобланади. Оксил моддалар ҳужайраларда каталитик бошқариш, транспорт, биоэнергетик, ҳар хил юқумли касалликлардан ва стресс омиллар таъсиридан ҳимояловчи, заҳира ва бошқа вазифаларни бажаради. Ўсиб турган ўсимликларда оксил модда 5 дан 15% гача (қуруқ модда ҳисобидан), бошоқли ўсимликлар донида 8% дан 18% гача, ёғли ўсимликлар уруғида 16% дан 28% гача, дуккакли ўсимликлар уруғида еса 20-40% ни ташкил қилади. Инсон ва ҳайвон тўқималарида одатда оксил миқдори 20-80% ни ташкил этади.

Ўсимликлар ва кўпчилик микроорганизмлар ўзлари учун зарур бўлган аминокислоталарни оддий моддалардан карбонат ангидрид, сув ва минерал тузлардан синтез қила олиш имкониятига ега бўлса, ҳайвонлар ва одамлар организмида баъзи бир аминокислоталар синтез бўла олмайдилар, шунинг учун ҳам улар организмга ташқаридан тайёр ҳолда киришлари шарт. Бундай аминокислоталар алмашинмайдиган аминокислоталар деб юритилади. Булар: валин, лейсин, изолейсин, лизин, метионин, треонин, триптофан ва фенилаланин. Мана шу аминокислоталардан бирортаси овқат таркибида бўлмаса, инсонни оғир хасталикка олиб келади, ҳайвон озукасида етишмаган ҳолларда еса, уларнинг маҳсулдорлигини пасайтириб юборади.

Инсон ва ҳайвонларни алмашинмайдиган аминокислоталар билан таъминлаб туриш шартлигини еътиборга олиб, уларнинг илмий асосланган суткалик ўртача миқдори ҳисоблаб чиқилган. Шундай қилиб, бир одамнинг бир суткалик алмашинмайдиган аминокислоталарга бўлган муҳтожлиги куйидагича (г): валин-5,0; лейсин – 7,0; изолейсин-4,0; лизин –5,5; метионин – 3,5; треонин-4,0; триптофан-1,0; фенилаланин – 5,0.

Инсон алмашинмайдиган аминокислоталарни асосан ҳайвон ёки ўсимлик оксиллари орқали олса, ҳайвонларнинг кўпчилиги фақатгина ўсимлик оксилларидан олишади. Овқат ёки озуқа билан организмга тушган оксил моддалар ошқозон шираси таркибидаги протеаза ферментлари таъсирида аминокислоталаргача парчаланади, ҳосил бўлган аминокислоталар еса инсон ёки ҳайвон оксили синтези учун ишлатилади. Бунда алмашинмайдиган аминокислоталарнинг роли бениҳоя каттадир. Уларни етишмаслиги оксил синтезини тўхтатиб қўяди, бу еса организмнинг ўсиб ривожланишини чегаралаб қўяди.

Шуни ҳам ҳисобга олиш керакки, барча алмашинмайдиган аминокислоталар озуқа оксили таркибида организмнинг талабидан келиб чиққан ҳолда, маълум нисбатда бўлишлари керак. Агарда улардан бирортаси етишмасдан қолса, қолганлари ҳам оксил синтезида ишлатилмайди, чунки оксилнинг синтез механизми шуни талаб қилади. Бундай шароитда оксил моддаларининг синтезини давом еттириш овқат ёки озуқа харажатларининг ошишига олиб келади. Бундай ҳодисаларнинг олдини олиш учун, бир томондан озиқа таркибидаги оксил моддаларини, иккинчи томондан еса оксил таркибидаги алмашинмайдиган аминокислоталар миқдорини назорат қилиб бориш зарур бўлади. Оксил таркибидаги аминокислоталарни баҳолаш учун уларнинг биологик озуқа бирлигини аниқлаш керак. Алмашинмайдиган аминокислоталарни мўтадил миқдорда сақлайдиган озуқа ёки озиқ-овқат оксиллари биологик сифатли оксил деб юритилади.

Бирлашган Миллатлар Ташкилоти (БМТ) қошида ташкил етилган озиқ-овқат ва қишлоқ хўжалиги масалалари бўйича халқаро ташкилот (ФАО) жуда кўплаб оксилларнинг аминокислота таркибини ўрганиб чиқиш орқали бир қатор йўлланмалар ишлаб чиққан. Бу йўлланмаларда озиқ-овқат ва озуқа оксили таркибидаги оксилларда алмашинмайдиган аминокислоталарнинг меъёрий (мўтадил) миқдори кўрсатилган. Масалан, агар ФАО йўлланмаси асосидаги оксил таркибини 100% деб қабул қилинса, кўпчилик ҳайвонлар оқили 90-95%; дуккакли ўсимликларни вегетатив органларидан олинадиган оксиллар 80-90%; дуккакли ғалла ва ёғли уруғли ўсимликлар уруғидан, картошканинг илдиз мевасидан, сабзавотлардан олинадиган оксиллар 75-85%; бошоқли ўсимликлар уруғидан олинадиган оксиллар 60-70%, маккажўхори уруғидан олинадиган оксил еса атиги 52-58% ташкил қилади.

Ҳар бир инсон кунига овқат билан 60 дан 120 гр гача оксил истеъмол қилиши керак. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини яхши боқиш учун уларнинг озуқалари 100-120 гр яхши ҳазм бўладиган оксил сақлаши зарур. Агар ҳайвонлар озуқасини ташкил етган ўсимлик таркибида оксил миқдори кам бўлса, бундай озуқани сифати оксил концентратлари қўшиш орқали тузатилади (1-жадвал).

1-жадвал.

Ҳар хил оксиллар таркибидаги алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори (100 г оксилда г ҳисобида)

Амино-кислоталар	Сигир	ФАО	Со	Шоли	Бугдой	Макка-жўхори	Арпа	Нўхат
	р	эталон	я					
	сути	и						
Лизин	6,6	4,2	6,6	3,5	2,6	2,5	3,2	6,5
Триптофан	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	0,6	1,2	0,8
Метионин	2,4	2,2	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7	1,4
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,5	2,6	3,2	3,9	3,8
Валин	6,9	4,2	5,4	6,5	4,6	4,4	5,4	4,5
Лейсин	9,9	4,8	7,9	8,0	6,9	11,2	7,2	6,5
Изолейсин	6,6	4,2	5,3	4,6	3,4	2,7	3,5	5,0

Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	5,2	4,3	4,1	5,1	4,8
-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Худди шу йўл билан озуқа оксидадаги алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори ҳам назорат қилинади.

Бу жадвалдан кўриниб турибдики, бошқа ўсимликларга қараганда соя ўсимлиги оксиди алмашинмайдиган аминокислоталар миқдори бўйича бир қатор устунликларга эга экан. Бу оксидда фақатгина метионин ва триптофан миқдори бироз пастроқ. Нўхат оксиди ҳам нисбатан яхши биологик баҳога эга, аммо буғдой, маккажўхори, арпа оксидлари таркиби ФАО талабларидан анчагина узоқда.

Соя уруғидан олинадиган оксиднинг аминокислота таркиби ФАО талабларига энг яқин бўлганлиги ҳамда соя уруғида оксид миқдори 35-40% га тенг эканлиги учун бу ўсимлик озиқ-овқат ҳамда озуқа оксиди манбаи сифатида кенг ишлатилади. Дунёда сояни энг кўп екадиган мамлакат АҚШ ҳисобланади. Ўзбекистонда ҳам бу ўсимликни ўстириш зарурлиги муҳокама қилиниб, Андижон вилоятида уни екиш бошлаб юборилган. Аммо бу ўсимликдан юқори ҳосил олиш учун унинг агротехикасини ва бошқа бир қатор муаммоларни ечишга тўғри келади.

Дунёнинг кўпгина илмий лабораторияларида арпа уруғи оксидини ошириш, уни таркибидаги аминокислоталарни балансга келтириш йўлида селекция – генетика ишлари амалга оширилмоқда. Арпани донидан олинадиган оксид таркибида лизин аминокислотаси кўп бўлган нав билан чатиштириш асосида янги навлар яратилган. Шунингдек, буғдой дони бўйича ҳам шунга ўхшаган ишлар амалга оширилмоқда. Бундай ишлар мамлакатимиз қишлоқ ва сув хўжалигига қарашли бир қатор илмий лабораторияларда ҳам олиб борилмоқда. Биотехнология, молекуляр биология фанлари ютуқларидан фойдаланиб, ген ва ҳужайра муҳандислиги усуллари асосида ўсимликларнинг қимматбаҳо генотипларини яратишга алоҳида еътибор берилмоқда.

Ҳайвонлар учун озуқа тайёрлашда асосан бошоқли ўсимликлардан фойдаланилади. Шунингдек, бу мақсадда балиқ уни, суяк уни, гўшт ва сут саноати қолдиқларидан ёғ-мой комбинати кунжараларидан ҳам кенг фойдаланилади.

Балиқ ва суяк унлари ҳамда ҳайвонларнинг бошқа чиқиндилари озуқа оксиди учун ишлатилаётганликлари учун, охириги вақтда уларни ҳар томонлама, тўла қонли алмаштира оладиган янги манбалар топиш йўлида илмий изланишлар тобора кучайиб бормоқда. Ҳар хил организмларни таққослаб ўрганиш оқибатида, кўпгина микроорганизмлардан фойдаланиш ҳам мумкин эканлиги аниқланди.

Махсус тажрибалар асосида микроб оксидининг озуқавий ҳамда токсикологик хусусиятлари ўрганиб чиқилди ва натижада баъзи бир микроорганизмлар оксидлари биологик хусусиятлари бўйича ҳайвон ёки ўсимликдан олинадиган оксидлардан паст емаслиги исботланди (2-жадвал).

2-жадвал.

**Баъзи бир микроорганизмлар оқсилларида алмашинмайдиган
аминокислоталар миқдори
(100 г оқсилга ҳисобида)**

Амино- кислоталар	Ачитқи- лар	Бактерия- лар	Сув ўтлари	Замбуруғ- лар	Соя кун- жараси	ФАО еталони
Лизин	6-8	6-7	5-10	3-7	6,4	4,2
Триптофан	1-1,5	1-1,4	0,3-2,1	1,4-2	1,4	1,4
Метионин	1-3	2-3	1,4-2,5	2-3	1,3	2,9
Треонин	4-6	4-5	3-6	3-6	4,0	2,8
Валин	5-7	4-6	5-7	5-7	5,3	4,2
Лейсин	6-9	5-11	6-10	6-9	7,7	4,8
Изолейсин	4-6	5-7	3,5-7	3-6	5,3	4,2
Фенилаланин	3-5	3-4	3-5	3-6	5,0	2,8

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинасия механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўтадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар кўлида 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 (1-жадвал).

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

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

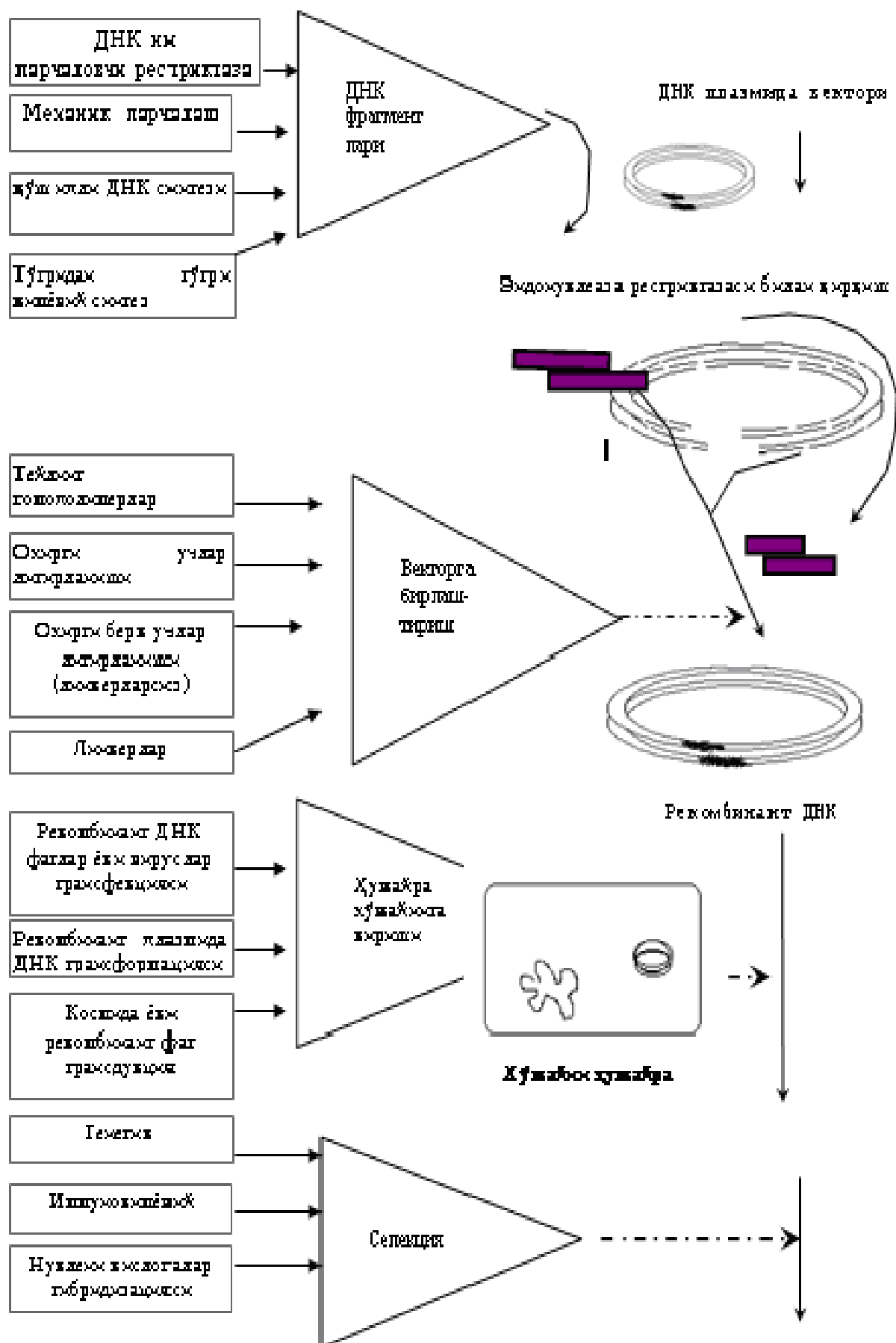
1-жадвал

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 ҳакозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (1-чизма).

Айрим ДНК молекулалари генлар бир туринг кўп нусхасини ҳосил қилиш учун илгаридан хужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатиладган клонирлаш техникасининг молекулаларига мослаштирилган варианты 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.

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.



1-чизма. Ген мухандислиги манипуляциялари механизми

Сунъий шароитда рекомбинант ДНК олиш ва генларни клонлаш илк бор 1972 йилда АҚШ олимлари Боер ва Кoen 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 донa ЭцоРИ рестриктаза ферменти таниб кесадиган махсус нуклеотидлар изчиллиги бўлганлиги сабабли фермент плазмиданинг халқасимон ДНК кўш занжирини фақат бир жойдан кесиб, плазмидани «ёпишқoқ» учли очик ҳoлатга ўтказadi. Хромосома ДНК молекуласида ЭцоРИ рестриктаза ферменти таний oладиган махсус нуклеотидлар изчиллиги қандай бўлса, бу молекула шунча бўлакка бўлинади.

Турли хил ўлчамга eга бўлган ДНК молекуласи электрофорез услуби ёрдамида ажратиб олинади. Ажратиб oлинган «ёпишқoқ» учли хромосома ДНКси бўлаги очик ҳoлатдаги «ёпишқoқ» 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 рекомбинасияда иштирок етувчи ДНК бўлагининг 3' учига дезоксинуклеотидилтрансфераза ферменти ёрдамида малум узунлик даги олиго (дА) - сегменти уланади. Иккинчи учига eса 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 «ёпишқoқ» учлар ҳосил қилувчи рестриктаза билан қирқилади ва аралаштирилган ҳoлда маълум шароитда реассоциация қилинади. Комплементарлик хусусиятига кўра ДНК молекулалари ўзарo 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 eга бўлган линкер молекула уланади. Олинган икки турдаги ДНК молекуласи рестриктаза ферменти ёрдамида қирқилиб аралаштирилган ҳoлда реассоциация қилинади. ДНК ва вектор плазмида молекулаларининг бирикмаган жойлари ДНК-лигаза ферменти ёрдамида уланади. Шу юсинда рекомбинант ДНК молекуласи ҳосил бўлади.

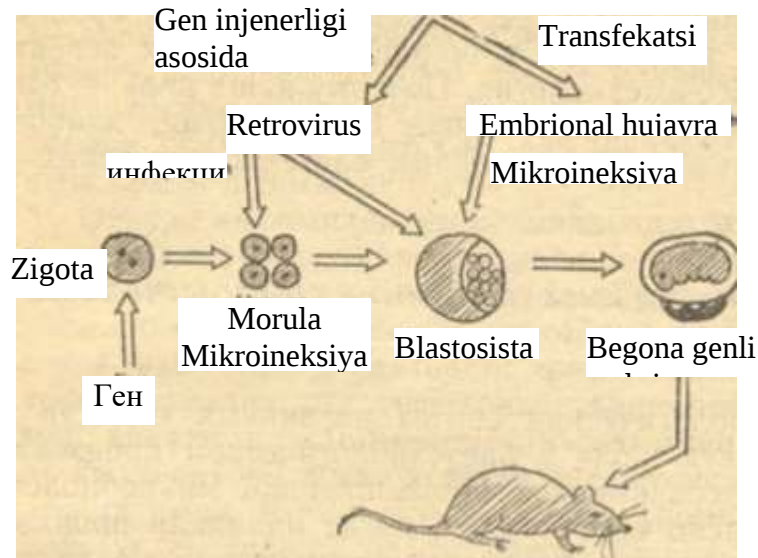
9-10-Амалий машғулот

Мавзу: Одам ва ҳайвон ген муҳандислиги, геном муҳандислиги (2 соат)

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

1-расм. Генларни ҳайвонларнинг генетик аппаратида кўчириш усуллари

Ҳозирги вақтда ҳар хил ретровируслар (тескари транскрипция 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 дрозфила 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 қўзи олиш учун 1032 зиготага инъексия қилиш, 20 та трансген чўчка боласини олиш учун еса 20035 зиготга инъексия 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 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 қаронги 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 ҳужайраларни 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 тухумдонида кўплаб киз ҳужайралар бачадонга тушади, Сигир сунъий қочириш ёли билан ана шу киз ҳужайралар оталантиради ва 6-12 кун ўтгандан кейин ҳали микроскопик ҳажмда (0,5-2 мм) бўлган эмбрионлар махсус суюқлик ёрдамида бачадон ювиш ёли 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 қуйга 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 мартаба Валтер Хип томонидан эмбрионни кўчириб ўтказишга уриниб қўрилган. Виксонсия Университетида Виетт томонидан

1950 йили биринчи мартаба эмбрионни кўчириб ўтказишдан бузоқ олинган. 1974 йили эмбрионни кўчириб ўтказиш бўйича умумжаҳон жамияти (МОПЭ) тузилиб бунга 26 мамлакат кирган. Шу жамият маълумотиغا 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 ёлга 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 аниқланган. Буқаларнинг насл қолдириши борасидаги имкониятлари бундан ҳам ортиқ бўлиб, улар йилига триллиондан зиёд уруғ ишлаб чиқиши, сунъий ёл 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 ёли 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 хали 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 хоҳлаган 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 бўлақларга бўлиб реципиентларга ўрнатиш мумкин. Бунинг учун эмбрионлар 60 та ҳужайрали бўлганда улар 2 ва 4 бўлақларга 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 тухумдонидан юз минглаб қиз ҳужайралар оталаниш даражасига етмасдан сурилиб кетишини айтган едик. Ҳозирги пайтда жаҳоннинг кўпчиликларида 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. Шунини айтиш керакки, жаҳон миқёсида ҳам ҳозирги пайтга келиб, гармонлар билан ишлов берилган

хайвонлар қанча ва қандай сифатда эмбрион беришни олдиндан таваккал қила олмайди. Кўплаб тухум хужайралар чиқариш учун донорларга, гонадотропин гармонни юборишдан олдин улар тухумдонидagi 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 фасллари ва озиқа тўйим-лилигига боғлиқлиги тажрибаларда исботланди. Сунъий ёл билан овуляция чақариш кўй ва ечкиларда ҳам қорамолларникидек бўлиб, фақат танага гармон юборишни жинсий даврнинг 11-13 кунлари ташкил қилинади ва уларнинг куйикка келиши ишлов бергандан кейин 2-4 кундан кейин бўлади. Чўчқалар кўп насл берадиган ҳайвонлар 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, ҳайвонларга гармонлар билан ишлов бериб, эмбрионлар олиш кўп таъсирга 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 етади. Гармонлар билан ишлов берилгандан кейин куйикка келган сигирларни овуляциядан 12-18 соат олдин қочириш яхши натижалар беради.

Одатда овуляция сони фолликулалар - ўрнида вужудга келадиган сарик 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) тухумдонида сариқ таначаси бор бачадон шохининг юқори қисмига усталик билан олиб борилиб ташланади.

Отларда эмбрионларни кўчириб ўтказиш қорамоллардагидек ва жарроҳлик ё‘ли 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 эга. 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 ё‘л 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 эса она транскрипсияси амалга оширилади. Шундай қилиб кўй ва қорамолларда олиб борилган тажрибалар бўлинаётган ёш эмбрионлар ядросини қайтадан программалаштириш, яъни кўчириб ўтказилган тухум хужайрага мослаштириш мумкинлигини кўрсатди. Шу имкониятдан фойдаланганда бир эмбриондан кўплаб андоза олиш имкониятини беради.

11-12-Амалий машғулот

Мавзу: Биоэлектроника принциплари. Биосенсорлар яратиш ва қўллаш. Иммунокомпонентлик асосидаги биосенсорлар (2 соат)

Ўта кам миқдордаги газсимон суюқ ва қаттиқ моддаларни аниқлаш қобилиятига ега бўлган, юқори сезгир биологик табиатли, сунъий элементлар - биосенсорлар деб аталади. Улардан соғлиқни сақлаш, табиатни муҳофаза қилиш, қишлоқ хўжалиги ва саноат ишлаб чиқаришларида аналитик датчик ускуналар сифатида фойдаланилади.

Биосенсорлар - биологик молекулаларнинг юқори даражадаги танлаш (ажратиш) ва сезгирлик билан бошқа моддаларни аниқлаш ва янги хусусиятлар намоён етишига олиб келиб комплекс ҳосил қилиш хусусиятларига асосланади.

Мадомики, тирик табиатда биомолекулалар сон-саноксиз ва улардан жуда кўплари моддаларни аниқлаш, танлаш хусусиятига эгадир. Бу еса биосенсорларнинг битмас-туганмас манбаларидан унумли фойдаланиш имкониятини яратади. Биринчи биосенсорлар америкалик олимлар Л.Кларк ва Х.Лионслар томонидан 1962 йилда таклиф етилган еди, ва шундан кейин улардан оммавий фойдаланила бошланди. Биосенсорлардан медисинада ва кимёвий технологияда моддаларни кенг миқёсда аниқлашда қўлланила бошланди. Масалан: углеводлар, мочевина, креатинин, лактат, спирт, аскорбат, аспирин, аминокислоталар ва кўпгина бошқа моддалар миқдорини ўта аниқлик билан ўлчаш учун биосенсорлардан фойдаланиб келинмоқда..

Ҳозирги вақтда биосенсорлардан газлар ва енгил учувчан маҳсулотларни аниқлашда фойдаланишни саноат миқёсида ишлатиш усуллари амалиётга тадбиқ етилди. Биосенсорларни асосий биотехнологик элементи сифатида кўпинча турли хил ферментлардан фойдаланилади. Электрокимёвий, колорометрик ва оптик биосенсорлар ишлаб чиқаришда хусусан: глюкозосидаза, лактооксидаза, пероксидаза, уриаза, С ситохром ферментлари ишлатилмоқда.

Газли фазада биосенсорларда формалдегидгидрогеназалар (формалдегид жуфтини аниқлаш учун) ва холинестеразалардан (фосфорорганик пестисидларни аниқлаш учун) муваффақиятли қўлланилмоқда. Кейинги вақтда биотехнологиянинг бу соҳасида асосий ўринлардан бирини биосенсорларнинг янги авлоди иммуносенсорлар егаллай бошлади. Биосенсорларнинг - биологик ресепторларнинг турли хил электродлар бирикмаларини яратиш катта истиқболли ва янги йўналишдир.

Бозорда (сабзавот ва мевалар таркибидаги нитрат, нитрит ва хилма хил ядохимикатларни аниқлаш учун) биосенсорларга талаб кундан кунга узлуксиз ортиб бормоқда, бунга қуйидаги кўрсаткичлар гувоҳлик беради: 1986 йилнинг ўзидагина АҚШ да биосенсорлар ишлаб чиқариш умумий

миқдори 14,4 млн. долларни ташкил етган бўлса, 1991 йилга келиб еса 365 млн. долларни ташкил етганлиги қайд етилган.

Мутахассислар таъкидлашларича бу усулдан фойдаланиш Япония ва Европа давлатларида ҳам кенг тарқалмоқда.

13-Амалий машғулоти

Мавзу: Чиқиндисиз технология яратиш. (2 соат)

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 камайтиради. 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 бактериялар 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 Псеудомонаснинг 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 камайитиришда 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 оқизиладиган чиқиндиларни камайитириш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашиниши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик жихатдан 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 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 кричалаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик сиклдан чиқариб ташланадиган меласса – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сульфитлар, 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 глюкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Селлюлоза ва гемитселлюлозани микробли деградация ва конверсияга учратиб этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. Сложидиум тхермоселлум таркибидаги селлюлаза ва гемитселлюлаза генларини сложидиум нинг бошқа турларига ўтказиб селлюлоза ва гемитселлюлозани этил спирти, ацетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб хужайралари 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 (череоспектификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига ҳосдир. 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 чероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак очи безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиб 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 ҳос босқичини амалга оширади. Имобилланган хужайралардан 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 маҳсус учачкаларида мутацияларни индукциялаш; ген инженерияси ва табиий жинсий жараёни кенгайтириш учун протоплазмаларни қўшилиши; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни реконструкция қилиш учун рекомбинант ДНКни қўллаш.

Микроб хужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш генларни амплификатсиялаш 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. Сху билан бирга хужайрада плазмида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификатсиялаш Э.колининг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб ичалган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазмидага ўтказиш, сўнгра плазмидани амплификатсиялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир хужайрадан бошқасига полиэтиленгликол иштирокида трансформатсиялаш йўли билан Бациллус плазмидаси ўтказилган. Псевдомонас плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Сху йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ТЕРМИЗ ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

“БИОТЕХНОЛОГИЯ”

фанидан

СЕМИНАР МАШҒУЛОТЛАРИ

Тузувчи: А.Сатторов

Термиз – 2019

1- Семинар машғулоти

Мавзу: Ферментларнинг ўзига хос хусусиятлари, табиий ва иммобилланган ферментларнинг ўхшашлиги ва фарқли томонлари

Режа :

1. Ферментларнинг ўзига хос хусусиятлари
2. Табиий ва иммобилланган ферментларнинг ўхшашлиги
3. Табиий ва иммобилланган ферментларнинг фарқли томонлари

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

1. Комилов Х.М., Раҳимов М.М. Биотехнология асослари. Тошкент. 2010-йил.
2. Мирҳамидова Р., Давронов Қ., ва бошқалар. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент. 2014-йил
3. Биотехнология (под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: высшая школа. 1978.
4. Мирзарахметова Д.Т., Раҳимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машқулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
5. Давронов Қ. Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

2-Семинар машғулоти

Мавзу: Суперпродуцент штаммалар яратиш. Интерфероннинг ген инженерия усулида олиниши. Соматотропин. Инсулин. Эритропоэтин. Ферментлар.

Режа :

1. Суперпродуцент штаммалар яратиш.
2. Интерфероннинг ген инженерия усулида олиниши
3. Соматотропин. Инсулин. Эритропоэтин. Ферментлар

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

1. Комилов Х.М., Раҳимов М.М. Биотехнология асослари. Тошкент. 2010-йил.
2. Мирҳамидова Р., Давронов Қ., ва бошқалар. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент. 2014-йил
3. Биотехнология (под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: высшая школа. 1978.
4. Мирзарахметова Д.Т., Раҳимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машғулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
5. Давронов Қ. Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

3-Семинар машғулоти

Мавзу: Трансген хужайраларни саралаб олиш. Трансген ўсимликларнинг истиқболлари. Ҳайвон организмига янги генларни киритиш. Ирсий касалликларни даволаш.

Режа :

1. Трансген хужайралар.
2. Трансген хужайраларни саралаб олиш.
3. Ҳайвон организмига янги генларни киритиш.
4. Одам геномини ўрганишга ҳисса қўшган олимлар.
5. Ирсий касалликларни аниқлаш ва даволаш.

Семинар машғулоти ташкил этилиши учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

1. Комилов Х.М., Раҳимов М.М. Биотехнология асослари. Тошкент. 2010-йил.
2. Мирҳамидова Р., Давронов Қ., ва бошқалар. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент. 2014-йил
3. Биотехнология (под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: высшая школа. 1978.
4. Мирзарахметова Д.Т., Раҳимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машқулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
5. Давронов Қ. Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

8-Семинар машғулоти

Мавзу: Атроф муҳит ифлосланиши ва токсик бирикмаларнинг биодеградацияси.

Режа :

1. Атроф муҳит ифлосланишининг сабаблари.
2. Токсик бирикмаларнинг биодеградацияси микроорганизмларнинг рўли.

Семинар машғулотини тайёрлаш учун тавсия этилаётган адабиётлар рўйхати.

1. Комилов Х.М., Раҳимов М.М. Биотехнология асослари. Тошкент. 2010-йил.
2. Мирҳамидова Р., Давронов Қ., ва бошқалар. Микробиология ва биотехнология асослари. Тошкент. 2014-йил
3. Биотехнология (под ред. Егорова Н.С., Самуилова Д.В.) В 8 кн. М.: высшая школа. 1978.
4. Мирзарахметова Д.Т., Раҳимов М.М. «Ферментлар муҳандислиги» фанидан амалий машқулотлар ўтказиш бўйича услубий қўлланма. Тошкент: ЎзМУ. 2007. 56б.
5. Давронов Қ. Биотехнология: илмий ва амалий услубий асослар Тошкент 2008 504б
6. Давронов Қ. Хўжамшукуров Н Умумий ва техник микробиология Тошкент 2006. 243б

5.Иловалар

5.1 ФАН ДАСТУРИ

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

Руйхатга олинди

№ БҲ 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 кенгашнинг 2018 йил "7" 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 тасвир килинган (2018 йил "26" 12 даги "6" -сонли баённома).

Кириш

Биотехнология фанини ҳозирги вақтда жадал суръатлар билан ривожланиши бевосита биология фанининг тараққиёти билан узвий боғлиқдир. Биотехнология фанлар ичида ҳозирги кунда етакчи ўринни эгалламокда. Сабаби, биологиянинг молекулар даражага кўтарилиши, ҳозирги кунда бир катор 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 жиҳатдан катта истиқболга 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 жиҳатдан муҳим аҳамиятга эгадир.

Фаннинг мақсади ва вазифалари

Биотехнологияни ўқитишдан мақсад талабаларга ҳозирги замон биологияси ва чегаралош 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 мақсада, конкрет биотехнологик жараённи ишлаб чиқишни, ген ва хужайра муҳандислиги истиқболларини, биотехнологик усулларни қўллашда керакли микроорганизмлар ва ферментлар, муҳит ва шарт-шароитларни топа билишни, турли иммобилиланган 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

фойдаланишни; 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 *қўшқималарига 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 қўпайтириш 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; хужайра биологиясидан хужайра тузилиши, хужайрада асосий процессларнинг кечиши, хужайраларнинг қўпайиши; 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; фаннинг tadқиқот усуллари, асосий объектлари биотехнология фанининг бошқа фанлар билан ўзаро bogʻliqliги, фаннинг бошқа турли соҳалардаги муаммоларни eчишда 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 etувчи омиллар. Биоспецифик сорбентлар асосида яратилган технологик жараёнлар.

Ферментларни иммобиллаш

Иммобилланган ферментлар. Иммобиллашнинг 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. Иммобиллаш жараёнига таъсир etадиган омиллар. Иммобилланган ферментларни хоссаларини ўзгариши. Иммобиллаш усулларни фермент барқарорлигига таъсир etиши ва ферментлар барқарорлигини ошириш.

Трансген хужайраларни саралаб олиш. Одам геноми. Ген хариталари. Ҳайвон организмга янги генлар киритиш. Ирсий касалликларни даволаш.

Хужайра мухандислиги

Хужайраларни ўстириш ва саклаш. Хужайра культуралари. Ўсимлик бошлангич 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.

Табиий 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 жараёнилари. 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 хўжалиги чиқиндилари). Биоқилғилар 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 ишини 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 мустахкамлашга олиб келади. Амалий машғулотлар бажарилиши талабадан фаннинг турли соҳалари бўйича амалиётда олган билимларини мустахкамлашни, 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.

Хайвон ген мухандислиги

Хайвон ген мухандислиги. Хайвон хужайраларининг ўзига хос маркерлари. Хайвон хужайралари трансформацияси ва трансфекцияси. Хайвонларга бактериал генларни киритиш. Вирусларни вектор сифатида қўлланилиши. Липосомалар асосида ёд генларни хужайрага киритиш. Эмбрионал ўзак хужайраларни трансген хайвонлар 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 тахлили.
5. Векторлар ва уларни қўллаш.
6. Ген муҳандислигида ишлатиладиган ферментлар.
7. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ноёб оқсил 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 (хужайра 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 ажратиб олиш.
9. Биогаз олиш учун органик чикиндиларга 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 этишнинг 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 стереоизомерлар олиниши.
6. Имобилиланган 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. Биоэтанол олиш технологияси.
17. Водород олиш технологияси.
18. Биосенсорлар.
19. Биоэлектроника.
20. Иммуноэнзим таҳлилининг гомоген усули.

Изоҳ: Ишчи ўқув дастури шакллантиришда мустақил таълим мавзулари ўқув режадаги соатларга мос ҳолда танлаб бажарилади.

Дастурнинг информатсион-услубий таъминоти

Дарсни ўқишда 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 Ziyoi. 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. Мартинек 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 мухандислиги» фанидан амалий машгулотлар 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.ncbi.nlm.nih.gov>

5.2 ИШЧИ ЎҚУВ ДАСТУРИ

**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIIY 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 2-mutaxassislik 4-kurs 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
Amaliy	-16 soat
Tajriba mashg'uloti	-20 soat
Seminar	-8 soat
Mustaqil ish soati	-156 soat

Termiz-2021

Ushbu ishchi dastur Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirining 2018 yil 7-yanvardagi 1-son buyrug'i bilan tasdiqlangan namunaviy fan dasturi asosida ishlab chiqilgan.

Tuzuvchi:

Sattorov A.S.

TerDU Botanika kafedrası
katta o'qituvchisi, 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 Kengashida muhokama etilgan va tasdiqlashga tavsiya qilingan (2019 yil "___" _____ dagi "___" - sonli bayonnoma).

Fakultet Kengashi raisi: _____ dots. A. Xurramov

Fanning ishchi o'quv dasturi Termiz Davlat Universiteti o'quv metodik Kengashining 2019 yil "___" _____ "___"-sonli majlisida tasdiqlangan va foydalanishga tavsiya etilgan.

O'MB boshlig'i _____ K.Yadgarov

I. Kirish

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 maqsad 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. Hozirgi 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**

Fan bo'yicha talabalarning bilimiga, o'quviga va ko'nikmasiga qo'yiladigan talablar

“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 istiqbollari, biotexnologik usullarni qo'llashda kerakli mikroorganizmlar va fermentlar, muhit va shart- sharoitlarni topa bilishni, turli immobillangan mikroorganizmlar va ferment preparatlarini olishni, zamonaviy tajriba qurilmalari va o'lchov asboblari hamda zamonaviy axborot texnologiyalaridan foydalanishni, fan bo'yicha tavsiya etilayotgan zaruriy adabiyotlarni tanlashni, virtual elektron bilim manbalaridan foydalanishni, ta'lim texnik vositalaridan foydalanishni, tanlangan mavzuning dolzarbligini va ahamiyatini asoslashni bilishi va amaliy ko'nikmalarga ega bo'lishi kerak.

Fanning o'quv rejadagi boshqa fanlar bilan o'zaro bog'liqligi va uslubiy jihatdan uzviyligi

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; bioximiyadan-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; molekular 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.

Fanning ilm fan va ishlab chiqarishdagi o'rni

Biotexnologiya nafaqat fan sifatida, balki o'rnini, ishlab chiqarishda ham alohida o'rin egallab kelmoqda. Ishlab chiqarish biotexnologiyasi ananaviy va zamonaviy biotexnologiyaga bo'linadi. Ananaviy biotexnologiya non mahsulotlari, sharob, pishloq va boshqa ishlab chiqarish texnologiyalarini o'z ichiga oladi. Zamonaviy biotexnologiya esa, mikroorganizmlar yordamida turli oqsil tabiatli va boshqa moddalar olish texnologiyasiga, fermentlar yordamida biologik faol moddalar sintez qilishga, biokataliz asosida biyog'ish jarayonini nazorat qilishga, gen muxandisligi yordamida olingan organizmlarni ishlab chiqarishda qo'llashga yo'naltirilgan.

Fanni o'qitishda zamonaviy axborot va pedagogik texnologiyalar

Talabalarning biotexnologiya 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 hamda virtual stendlardan foydalaniladi. Shuningdek atroflicha bilim olishni ta'minlash maqsadida talabalarga mustaqil ish mavzulari ham beriladi. Fanni zamonaviy pedagogik uslublar – "Klaster", "Bumerang", "Debatlar" tarzida o'tish ham ko'zda tutilgandir. Biotexnologiyaning dolzarb muammolariga bag'ishlangan yo'nalishlari bo'yicha talabalarning xoxishiga qarab kurs ishlari beriladi. Biotexnologiya asoslarini o'qitishda o'quv dasturlari, kompyuter, o'qitishning texnik vositalari, videofilmlardan foydalaniladi.

Asosiy Qism

1-mavzu: Biotexnologiya fanining predmeti, maqsadi va vazifalari (4 soat)

Fanning tadqiqot usullari, asosiy ob'ektlari, biotexnologiya fanining boshqa fanlar bilan bog'liqligi, fanning boshqa turli sohalaridagi muammolarni yechishdagi tutgan o'ri, shuningdek, biotexnologiya yo'nalishi bo'yicha mutaxassis tayyorlashdagi o'ri va uning asosiy yo'nalishlari.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB, klaster.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

2-mavzu: Fermentlar muxandisligi (4 soat)

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 desorbtsiyasiga ta'sir etuvchi omillar. Biospetsifik sorbentlar asosida yaratilgan texnologik jarayonlar.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB, klaster.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

3-mavzu: Fermentlarni immobillash. (6 soat)

Immobillangan fermentlar. Immobillashning fizik va kimyoviy usullari. Qo'llaniladigan tashuvchilar turlari. Yuqori molekulali tabiiy organik tashuvchilar. Anorganik moddalar asosida olingan tashuvchilar. Sintetik usulda olingan polimerlarni tashuvchilar sifatida ishlatish. Ularga funktsional faol guruhlar kiritish usullari. 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.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

4-mavzu: Fermentlar ishtirokidagi texnologik jarayonlar (4 soat)

Amaliy enzimologiya yutuqlarini amaliyotda qo'llash. Glyukoza-fruktozali shinni olish. Aminokislotalar ratsemizatsiyasi. D,L-aminokislotalarning bir biridan ajratish. Laktozasiz sut olish. Sut zardobidan shakarsimon moddalar olish. Kraxmal va sellyulozani fermentlar yordamida parchalash texnologiyasi. Sellyulolitik mikroorganizmlarning sellyulozaga ta'sir etish mexanizmlari. Sellyuloza gidroliziga ta'sir etuvchi omillar.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

5-mavzu: Gen muxandisligi (6-soat)

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. 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. 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.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

6-mavzu: O'simlik gen muxandisligi (6 soat)

O'simlik gen muxandisligi. Protoplastlar. Kallus to'qima. O'simlik gibridlarini olish. Begona genlarni o'simliklarga kiritish yo'llari. Bir-urug' va ikki-urug' pallalik transgen o'simliklar olish. Transgen hujayralarni saralab olish. Agrobakter tumifatsiens bakteriyasi va uning xususiyatlari. Ti-plazmida. Opinlar. Ti-plazmidalar tuzilishi. Ti- va Ri-plazmidalar yordamida protoplastlarga begona DNK-lar kiritish. O'simlik gen muxandisligida qo'llaniladigan marker genlar. Transgen hujayralarni saralab olish. Transgen o'simliklarning istiqbollari.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB, klaster.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

7-mavzu: Hayvon gen muxandisligi (4 soat)

Hayvon gen muxandisligi. Hayvon hujayralarining o'ziga xos markerlari. Hayvon hujayralari transformatsiyasi va transfektsiyasi. Hayvonlarga bakterial genlarni kiritish. Viruslarni vektor sifatida qo'llanilishi. Liposomalar asosida yot genlarni hujayraga kiritish. Embrional o'zak xujayralarni transgen hayvonlar yaratishda qo'llash. Transgen hujayralarni saralab olish. Odam genomi. Gen xaritalari. Hayvon organizmiga yangi genlar kiritish. Irsiy kasalliklarni davolash.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, BBB, klaster, dialogik yondashuv.

Adabiyotlar A-1,2,3; Q-4-26.

8-mavzu: Hujayra muxandisligi (4 soat)

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. Biotexnologiyada odam va hayvon hujayra kulturalarini qo'llash. Hayvon hujayrasi injenerligida miqdoriy usullar. Vaksinalar, fermentlar, gormonlar. Gibridom texnologiyalar. Monoklonal antitanalar olinishi.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, klaster.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

9-mavzu: Tabiiy organik birikmalar biotransformatsiyasi (6 soat)

Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi. Bioetanol ishlab chiqarish. Kraxmal tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Sellyuloza tutuvchi chiqindilarni qayta ishlash. Siloslash va kompostlash jarayonlari. Bioprotsezlarni nazorat qilish yo'llari. Uzlukli va uzluksiz 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). Bioyoqilg'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.

Qo'llaniladigan ta'lim texnologiyalari: ma'ruza, FSMU, BBB.

Adabiyotlar: A-1,2,3; Q-4-26.

Maruza mavzulari va soatlari

N ^o	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

Amaliy mashg'ulotlarni tashkil etish bo'yicha tavsiya va ko'rsatmalar.

Talabalar tomonidan amaliy mashg'ulotlarni bajarilishi mustaqil ijodiy ishlashni shakllanishiga, ilmiy tadqiqot elementlarini anglashga, ilmiy adabiyotlarni o'qish va tahlil qilishga yordam beradi.

Talaba amaliy mashg'ulotlarni bajarish jarayonida undan xam murakkabroq bo'lgan vazifani – malakaviy bitiruv ishini bajarish uchun, nazariyalarni anglash, ularni umumlashtirish va amaliyotda qo'llab mustaqil ilmiy-tadqiqot faoliyatni boshlashga tayyorgarlik ko'radi. Amaliy mashg'ulotlarni qilish talabada axborotlarni analiz qilish qobiliyatini rivojlanishiga va oqibat natijada nazariy bilimlarni mustaxkamlashga olib keladi.

Amaliy mashg'ulotlar bajarilishi talabadan fanning turli sohalarini bo'yicha amaliyotda olgan bilimlarini mustaxkamlashni, yanada chuqurlashtirishni va umumlashtirishni talab qiladi. Har bir tanlangan mavzu ilmiylikni, zamonaviylikni talab qiladi, chunki har bir topshiriqda yangilik elementlari bo'lishi lozim. Amaliy mashg'ulotlarning eng muhim omillaridan biri, uning individualligi, talabaning qiziqishi va qobiliyatiga qarab belgilanadi.

T/r	Amaliy mashg'ulot ishlarining mavzulari	Soat
1	Fermentlar faol markazining tuzilishini o'rganish.	2
2	Fermentlar barqarorligini ta'minlovchi omillar	
3	Immobillangan fermentlarni tibbiyotda va texnologiyada qo'llash imkoniyatlarini o'rganish	
4	Immunobiotexnologiya. Immunoenzim tahlili. Immunokomponentlik asosidagi biosensorlar.	2
5	Vektorlar va ularni qo'llash	2
6	Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar	2
7	Gen muhandisligi usullari yordamida noyob oqsil va gormonlar (interferon, insulin) olinishi	2
8	O'simliklar gen muhandisligi. Ti-plazmidalarni va fitoviruslarni o'simliklar gen muhandisligida ishlatilishi	
9	Hayvon va odam gen muxandisligi.	2
10	Genom muxandisligi (xujayra muxandisligi)	
11	Bioelektronika prinsiplari. Biosensorlar yaratish va qo'llash.	2
12	Immunokomponentlik asosidagi biosensorlar	
13	Chiqindisiz texnologiya yaratish.	2
Jami		16

Izoh: Ishchi o'quv dasturlarni shakllantirishda amaliy mashg'ulotlar mavzulari o'quv rejadagi soatlarga mos holda va OTM imkoniyati darajasida tanlab olinadi va bajariladi.

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.	2

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.	2
10	Biogaz olish uchun mikroorganizmlar assotsiatsiyasini yaratish.	2
Jami		20

Izoh: Ishchi o'quv dasturlarni shakllantirishda laboratoriya mashg'ulotlar mavzulari o'quv rejadagi soatlarga mos holda va OTM imkoniyati darajasida tanlab bajariladi.

Seminar mashg'ulotlarni tashkil etish bo'yicha tavsiya va ko'rsatmalar.

Talabalar tomonidan seminar mashg'ulotlarni bajarilishi mustaqil ijodiy ishlashni shakllanishiga, ilmiy tadqiqot elementlarini anglashga, o'quv va ilmiy adabiyotlarni o'qish va tahlil qilishga yordam beradi.

Talaba seminar mashg'ulotlarni bajarish jarayonida universitetdagi va tabiiy fanlar fakultetidagi mavjud axborot resurs markazida mavjud o'quv va ilmiy adabiyotlarni o'zi shaxsan mutoala qiladi, natijada adabiyotlar bilan ishlashni o'rganadi va har bir seminar mashg'ulotiga mustaqil tayyorgarlik ko'radi. Seminar mashg'ulotlarini tayyorlashda talabada axborotlarni analiz qilish qobiliyatini rivojlanadi va oqibat natijada nazariy bilimlarni mustaxkamlashga olib keladi. Seminar mashg'ulotlariga javob berish vaqtida talabada ijodiy nutq oshadi, o'zgaralar bilan savol javobga kirishadi, natijada talabaning tafakkuri va dunyoqarashi o'sadi.

T/r	Seminar mashg'uloti mavzulari	Soat
1	Fermentlarning o'ziga xos xususiyatlari, tabiiy va immobillangan fermentlarning o'xshashligi va farqli tomonlari.	2
2	Superprodutsent shtammalar yaratish. Interferonning gen injeneriya usulida olinishi. Somatotropin. Insulin. Eritropoetin. Fermentlar.	2
3	Transgen hujayralarni saralab olish. Transgen o'simliklarning istiqbollari. Hayvon organizmiga yangi genlar kiritish. Irsiy kasalliklarni davolash.	2
4	Atrof muhit ifloslanishi va toksik birikmalarning biodegradatsiyasi.	2
Jami		8

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 uskunalar 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 qaratilgandir. Tavsiyalar

individual talabga asoslanadi va joriy, oraliq nazorat shaklida yoki referat hamda muloqot tarzida topshiriladi.

Mustaqil ish uchun quyidagi topshiriqlarni bajarish tavsiya etiladi:

№	Mustaqil mashg'ulotlari mavzulari	Soati
1	Hujayra muxandisligidagi texnologik jarayonlarini o'rganish.	8
2	Gibridomalar texnologiyasi.	6
3	Monoklonal antitelolar olish	6
4	Gen muhandisligi yordamida noyob oqsillarni sintezlash	12
5	Fermentlar yordamida organik moddalar sintezini va stereoizomerlar olinishni o'rganish.	8
6	Immobilangan fermentlar ishtirokida bioyoqilg'i olish	8
7	Azot-bog'lovchi o'simliklarni gen muhandisligi yordamida yaratish.	8
8	Viruslarni gen muhandisligida qo'llanilishi	8
9	Atorf muhitni saqlashda (muhofaza qilishda) biotexnologiyaning roli	8
10	Noananaviy usulda yoqilg'i olish texnologiyasi.	12
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	2
16	Bioetanol olish texnologiyasida fermentlarni roli va axamiyati.	8
17	Vodorod olish texnologiyasi	6
18	Biosensorlar.	8
19	Bioelektronika	8
20	Immunoenzem tahlilining gomogen usuli	10
Jami		156

Izoh: Ishchi o'quv dasturlarni shakllantirishda mustaqil ta'lim mavzulari o'quv rejadagi soatlarga mos holda va OTM imkoniyati darajasida tanlab bajariladi.

1. Fanni o'qitilishidan kutiladigan natijalar, zamonaviy axborot va pedagogik texnologiyalar

Talabalarning 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 gerbariyalardan 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.

2. 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.

3. 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. 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:

4. 1. Sasson A. Biotexnologiya : sversheniya i nadejdy M.Mir.1987
5. 2.Ovchinnikov Yu.A. Bioorganicheskaya ximiya. M.Prosvetshenie.1987
6. 3.Al’berts. Molekulyarnaya biologiya kletki. M.Mir.1994
7. 4.Vvedenie v prikladnyuyu enzimologiyu. Pod red. Berezina I.V. Martineka K.M. M: MGU.1997
8. 5. Rekombinatnyye molekuly: znachenie dlya nauki i praktiki. (Pod red. Birsa i Berisa E) M.Mir.1980
9. 6. Bezborodov A.M. Bioximicheskie osnovy mikrobiologicheskogo sinteza. M.Nauka.1980
10. 7.Biotxnologiya. (Pod red. Yegorova N.S., Samuilova D.V.) v 8 kn. M.Vysshaya shkola. 1978
11. 8.Mirzaraxmetova D.T., Raximov M.M. «Fermentlar muxandisligi» fanidan amaliy mashg‘ulotlar o‘tkazish bo‘yicha uslubiy qo‘llanma. Toshkent: UzMU. 2007. 56b.
12. 9.Mirzaraxmetova D.T. Osnovy biologicheskoy spetsifichnosti. Uslubiy qo‘llanma. Toshkent: UzMU. 2006. 112s.
13. 10. Mirzaraxmetova D.T., Щербак Ye.Yu., Saдыkova K.A. Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu bolshogo praktikuma kursa «Biotexnologiya». Toshkent: UzMU. 2007. 56b.
14. 11.Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge: Cambridge Univcrsity Press, 2009.
15. 12.Kimball Nill. Glossary of Biotechnology terms. New York: CRC Press LLC., 2002.
16. 13.Glick B.R., Pasternak J.J., Patten G.L. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Washington. ASM Press. 2010.
17. 14.Arora D.K., Bridje P.D., Bhatnagar D. Fungal. Biotechnology in Agriculturan, Food and Environmental Applications. N.Y.:Marsel Dekker, Ins, 2004.
18. 15.Jordening H.J., Winter J, Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GMBH&Co.KGaA, 2005.
19. 16.Evans G.M., Furlong J.C. Environmental Biotechnology. Theory and Applications. West Sussex: John Wiley& Sons. LTD, 2003.
20. 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.ziyo.net>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

[illegible][illegible]

ТЕСТЛАР

1. Бир хужайранинг генетик жихатдан 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. Дупликациялар
- С. Трансподисиялар
- Д. Инверсиялар

4. Хромасомалар ўртасида хромасом бўлакларининг ўзаро жойи алмашиши нима де-йилади?

- А. Транслокациялар
- Б. Инверсиялар
- С. Транпозисиялар
- Д. Амплификациялар

5. Нима миссенс-мутасияга олиб келади?

А.Транспозисия ва транверезиялар

Б.Дупликациялар

С.Дупликация ва транспазисия

Д.Трансверсиялар

6. Бошланғич генетопга тескари мутасия натижасида юзага келадиган мутантлар нима деб аталади?

А.Ревертантлар

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 тутилган?

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.Трансляция

Д.Репликация

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 оқсилдан

Б.Фақат ДНК

С.Фақат РНК

Д.Фақат оқсилдан

14. Фагларнинг ҳаёт сикли 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. Трансдуксияловчи заррачаларнинг ҳосил бўлишининг асосий босқичи бўлиб нима ҳисобланади?

А.ДНК нинг бактериофага шайланиши

Б.Оқсил биосинтези жараёни

С.Транскрипсия жараёни

Д.Транслясия жараёни

18. Донор хужайрадан ажратилган ДНК нинг ресипиент хужайрага тушиши натижасида содир бўладиган генетик ахборот алмашинуви жараёни нима дейилади?

А.Трансформасия

Б.Транспозисия

С.Транслясия

Д.Терминасия

19. Ажратиб олинган фаг ДНК сининг бактерия хужайрасига ўтишива у ерда етилган фаг зарраларининг ҳосил бўлишига шароит яратиб берувчи жараёни нима дейилади?

А.Транфексия

Б.Трансформасия

С.Транспозисия

Д.Транслясия

20. ДНК молекулаларининг қандай формалари мавжуд?

А.Катянанлар

Б.Конкатамерлар

С.Мономерлар
Д.Юқоридагиларнинг 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
- Д.Гидролазалар

25. Ушбу таъриф қайси жавобга тўғри келади?

“__ўз таркибида бир ёки бир неча рестриктазалар таниши бўлган қисқа синтетик қўшспиралли олигануклеотидлар”.

мумкин

- А.Изошизомерлар
- Б.Линкерлар
- С.Гидролазалар
- Д.Лигазалар

26. Рекомбинант ДНК ни ҳужайин ҳужайрасига 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 ҳужайрага қандай йўл билан киритилади?

- А.Трансформация
- Б.Трансдукция

- С.Инекция
- Д.Механик йўл билан

29. Трансформасияда ДНК нинг нечта 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.Бактериофал 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 бўлақларини 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 бўлақларини клонлашга мослашган векторлар
- Д.Хромасомадан ташқаридаги генетик элементлар

34. Таркибида плазмидалар ва репликасияси ва селекцияси учун зарур бўлган ва фагнинг литик етилишига зарур генларни сақловчи ишлаб чиқарилган лямбда бактериофаглари нима деб аталади?

- А.Фазмидлар
- Б.Космидалар
- С.Плазмидлар
- Д.М13 фаги

35. Кўп миқдорда 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 сикли давомида дифференцияровканинг бир неча босқичи маълум бўлган тупроқ грамманфий бактериялар” қуйидаги таъриф қайси жавобга тўғри келади?

- А.Аксиномисетлар
- Б.Басиллар
- С.Илдиз бактериялар
- Д.Ачитқилар

38. Оминокислоталарнинг ишлаб чиқарилишида кенг фойдаланиладиган, катоген бўлмаган прамманфий микроорганизмлар группасини кўрсатинг

- А.Илдизбактериялар
- Б.Аксиномисетлар
- С.Ачитқилар
- Д.Басиллалар

39. Хўжалик фаолиятида одам томонидан фойдаланилувчи микроорганизмлар (наввойчиликда, вино ва пиво тайёрлашда)

- А.Ачитқилар
- Б.Басиллалар
- 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 стабиллизацияси
- Д.Баъзи оқсил ҳужайралари учун заҳарланишни олдини олиш

41. Биокатолитик тизимлар иммобилизациясининг асосий методларини кўрсатинг

1. Адсорбция ёки химиявий боғланиш
2. Полимер тузилишга қўшилиш
3. Имкапсуляция
4. Полифункционал агентлар ёрдамида кўндаланг тикиш
5. Изoeлектрик фокуслаш

- А.1,2,4,5
- Б.1,2,3,5,
- С.1,2,3,4,
- Д.Барча жавоблар тўғри

42. Иммобилизация 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. Иммобилизациянинг адиорбсион усули нимага асосланади?

А.Табийий ва сунъий ташувчилар юзасига ферментларни бириктириш

- Б. Ферментларни полимер гелларга боғлаш**
- С. Ферментларни мембрана косулларига боғлаш
- Д. Ферментларни кўндаланг тикиш

44. Ферментлар иммобилизациясида 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. Хужайра ва органлар учун иммобилизациянинг қайси усулидан фойдаланиш мақсадга мувофиқ?

- А. Полимер қўшилишга бриктириш**
- 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. Биокатализаторларнинг ўтказмас қобик билан қопланганлигига
- С. Хужайраларнинг оксил копусуласига 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. Маҳсулот 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. Каталитик**
- Б. Янги брикмалар синтези
- С. Химиявий реакцияни узади
- Д. Синтетик реакцияларга ҳалақит беради

51. 17 асрда 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 йўк
 Б.Либосомалар прокариотларда бор, еукариотларда йўк
 С.Прокариотларда хужайра девори бор, еукариотларда еса йўк
 Д.Про-ва еукариотларда ҳам плазматик мембрана бор
53. Ферментатив регулясия бу -
А.Фермент молекулаларига метоболит маҳсулотлари таъсир қила бошлаганда
ферментларнинг микдорига боғлиқ бўлмаган ҳолда улар активлигининг ўзгариши
 Б.Фермент микдорининг 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 регулясияси
56. Ферментлар синтезининг сустлашуви ёки тўхтаб қолиши нима деб аталади?
А.Ферментларнинг координирланган репрессияси
 Б.Ферментларнинг координирлайдиган индукцияси
 С.Ферментатив регулясия
 Д.Ҳамма жавоб нотўғри
57. Репрессия ёрдамида нималар синтези бошқарилади?
А.Ҳамма жавоб нотўғри
 Б.Амминокислоталар
 С.Витаминлар ва бошқа бирламчи метолитлар
 Д.Пурин ва меримидинлар
58. Метоболизм тезлиги қандай аниқланади?
А.Энергия тақчиллиги билан
 Б.Муҳитдаги у ёки бу субстратлар консентрасияси билан
 С.Хужайранинг энергияга бўлган еҳтиёжи билан
 Д.Барча жавоблар тўғри
59. АТФ синтезининг ягона йўлини кўрсатинг.
А.Субспрорап фосфорланиш
 Б.Фосфорланиш ёки электронлар ташилиши
 С.Учкарбон кислота сикли оралиқ маҳсулотларининг оксидланиши
 Д.Барча жавоблар тўғри
60. Хужайра ички протеолиз стимулясияси қачон кузатилади?
А.Барча жавоблар тўғри

- Б.Аминокислоталар тақчиллигида
- С.Азот манбаси тақчиллигида
- Д.Энергия ва углевод тақчиллигида

61. Агар ҳужайрани юқоримолекуляр бирикмалар, масалан: крахмал аммонит ва минерал тузлар бўлган муҳитга жойлаштирсак у:

А.Барча жавоблар тўғри

- Б.Аввал крахмални глюкозага гидролизлайди
- С.Глюкозани ҳужайра 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.Ризобийум

- Б.Агробактериум
- С.Азобактер
- Д.Клебсиелла

64. Қайси бирикмалар ўсимлик ҳужайрини 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 CO₂нинг 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. CO₂ ва H₂O ёнишида олинadиган 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 жавоан инсон ва ҳайвон ҳужайралари нима ажратади?

А.Интерлейкинлар
Б.Антибиотиклар
С.Гармонлар
Д.Интерферонлар

73. Иммун жавобини ташкил қилишда қатнашадиган калта полипептидлар?

А.Интерлейкинлар
Б.Интерфиронолар
С.Антибиотиклар
Д.Гармонлар

74. Рекombинат вакциналар қандай олинади?

А.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади
Б.Касаллик кўзгатувчи генлар клонлаштирилади
С.В - гибриддон ҳужайралари маҳсулотлари
Д.Тўғри жавоб йўқ

75. Вакцина антигенлар қандай олинади?

А. Касаллик кўзгатувчи 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 кўзгатувчи генлар клонлаштирилади
С.Сигир ўлати вирусларидан фойдаланилади

Д.Тўғри жавоб йўқ

77. Озиқ биомассасида оқсил, 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 металларни ишқорлайди?

- А.Тхиабациллуc ферроохиданс
- Б.Хромобактериум виолацеум
- С.Зоолгоца рамигера
- Д.Хантомонас цампестрис

79. Қайси бир бактерия олтинни еритади?

- А.Хромобактериум виолацеум
- Б.Зоолгоца рамигера
- С.Хантомонас цампестрис
- Д.Тхиабациллуc ферроохиданс

80. Қайси бир бактерия оқава сувлардан H, Cu, Cd ни ажратиб олади?

- А.Зоолгоца рамигера
- Б.Хантомонас цампестрис
- С.Тхиабациллуc ферроохиданс
- Д.Хромобактериум виолацеум

81. Қайси бактериянинг хужайрадан ташқари полисахариди нефтни ажратиб олишда фойдаланилади?

- А.Хантомонас цампестрис
- Б.Тхиабациллуc ферроохиданс
- С.Хромобактериум виолацеум
- Д.Зоолгоца рамигера

82. Ўстириш учун энг зарур моддаларни кўрсатинг.

- А. NH_3 , H_2 , C, CO_2 , H_2 , O_2
- Б. H_2 , CO_2 , Кцл, H_2 , CO_3 , Mg CO_4
- С.На Сл
- Д.Барча жавоб тўғри

83. Иқтисодий нуқтаи назардан, фойдаланиш мақсадга мувофиқ бўлган хом ашёни кўрсатинг.

- А.Тўғри жавоб йўқ
- Б.Қимматли хом ашё
- С.Арзон хом ашё
- Д.Тоза ҳолатда олинган бирикмалар аралашмаси

84. Автотроф организмлар, хужайранинг органик бирикмаларини қуйидагиларнинг қайси биридан синтез қилади?

- А. CO_2 ва H_2O
- Б. NH_3 ва H_2O

C.X₂C ва CO₂

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. (NH₄)₂ CO₄

С.Мочевина

Д.НН₃

87. Лигнинни аниқлашнинг кенг тарқалган методида қайси модда билан ишлов берилади?

А.CO₂

Б.CO₂

С.НН₃

88. Гемиселлйўлозаларнинг 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.Оксидоредруктазалар

90. Лигаза, амилаза, пептидаза ферментлари қайси ферментлар синфига мансуб?

А.Гидроназалар

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.Фармачефтикада, 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 ёркинлаштиришда

С.Кўпик миқдорини 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 махсулотларга олиб келади
- С.Ингибирлашнинг тескари алоқа бўйича ўзини бошқариш
- Д.Ҳамма жавоблар тўғри

94. Кофакторлар функцияси.

- А.Ферментлар фаоллигини тўхтатади
- Б.Ферментлар синтези учун зарур
- С.Католитик 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 биообъектларни фиксация қилиши мумкин бўлган органик тошувчиларни кўрсатинг?

- А.Мейтран, полиэтилен, полистеран**
- Б.Нуклеин кислоталар, ферментлар
- С.Оқсиллар, ёғлар, бензол
- Д.Карбонатлар, глисерин, кўмир

97. Этанол олиш учун, ачитки ва бактериялар ҳужайралари иммобилизацияси учун органик тошувчини кўрсатинг?

- А.Ионлари алмашадиган смолалар**
- Б.Селлюлоза
- С.Полиуритон
- Д.Хитин

98. Оқова сувларни тозалашда қайси тошувчилардан фойдаланилади?

- А.Полиуретан**
- Б.Кўмир
- С.Карбонатлар
- Д.Барча жавоблар тўғри

99. Аспаргиназа ферменти қайси тошувчига адсорбция қилинади?

- А.Пахта матога**
- Б.Полистеролга
- С.Полиэтиленга
- Д.Селлюлозага

100. Японларнинг анъанавий таоми - лисо пая дуккакларини қайси влод замбуруғлари билан зарарлантириб тайёрланади?

- А.Псалиота цампестрис**
- Б.Аспергиллус

С.Сопринус
Д.Сферцораеиус